(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-503987
(P2025-503987A)
(43)公表日　令和7年2月6日(2025.2.6)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　35/17　(2025.01)		Ａ６１Ｋ	35/17		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ　5/0783(2010.01)		Ｃ１２Ｎ	5/0783	ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)		Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ　35/15　(2025.01)		Ａ６１Ｋ	35/15		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全668頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-544644(P2024-544644)
(86)(22)出願日　令和5年1月27日(2023.1.27)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月26日(2024.9.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/061471
(87)国際公開番号　WO2023/147486
(87)国際公開日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(31)優先権主張番号　63/304,246
(32)優先日　令和4年1月28日(2022.1.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/394,253
(32)優先日　令和4年8月1日(2022.8.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/382,491
最終頁に続く

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

(54)【発明の名称】　ペイロードを発現するように操作された腫瘍浸潤リンパ球

(57)【要約】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法は、（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含む、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含み得る。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）で取得された治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、前記対象に投与するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取された前記ＴＩＬ集団

を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取された前記ＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項４】
修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を

産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取された前記ＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｊ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｉ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項６】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項７】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された前記第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項８】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの前記採取したＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項９】

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

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または患者におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１０】

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

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切

除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｊ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１４】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前またはステップ（ｆ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項１６】
ステップ（ｃ）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、ステップ（ｄ）の前記培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｃ）の前記培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された前記第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前またはステップ（ｅ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項１８】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項２０】
ステップ（ａ）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、ステップ（ｂ）の前記培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ａ）の前記培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーから取得された第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を、前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、
（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた前記第１のＴＩＬ集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第１のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を、前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、
（ｃ）前記第２のＴ細胞集団を採取することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項２２】
Ｔ細胞を拡張する方法であって、
（ａ）ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を、前記第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、
（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた前記第１のＴ細胞集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を、前記第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、
（ｃ）前記第２のＴ細胞集団を採取することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項２３】
前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団に、前記１つ以上のサイトカイン及び細胞膜アンカー部分を含む免疫調節融合タンパク質を発現させる、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
前記１つ以上のサイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦａ、ＩＦＮアルファ、ＩＦＮベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらのバリアントを含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記１つ以上のサイトカインが、ＩＬ－１２またはそのバリアントである、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記遺伝子修飾が、前記ＴＩＬ集団における内因性遺伝子の発現を抑制するＲＮＡ分子の発現を引き起こす、請求項１～２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＲＮＡ分子が、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記内因性遺伝子が、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、及びＢＡＦＦ（ＢＲ３）から選択される免疫チェックポイントをコードする、請求項２６または２７に記載の方法。
【請求項２９】

前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、前記免疫調節融合タンパク質をコードする第１の核酸及び任意選択で前記ＲＮＡ分子をコードする第２の核酸を含む発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項２３～２８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３０】

前記形質導入が、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターを使用して行われる、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項２９に記載の方法。

【請求項３２】

前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団に、ＩＬ－１８を過剰発現させる、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３３】

前記遺伝子修飾がステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、ＮＦＡＴ－ＩＬ１８発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項３２に記載の方法。

【請求項３４】

前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項３３に記載の方法。

【請求項３６】

前記１つ以上の発現サイトカインが、前記対象における前記がんに近接して前記投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進する、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３７】

前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも５倍多い、及び／または前記第３のＴＩＬ集団の数が、前記急速な拡張の開始から７～８日後に、前記第２のＴＩＬ集団よりも少なくとも５０倍多い、請求項５、６または１３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３８】

前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】

前記形質導入が、非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項３７に記載の方法。

【請求項４０】

前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団にＩＬ２融合タンパク質を発現させ、前

記ＩＬ－２融合タンパク質が、前記対象への薬物の後続投与に応答してＩＬ－２を放出する、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）、または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ２－ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含み、前記ＤＲＤが、前記投与された薬物に応答して、ＩＬ－２から分離するように選択される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団にＩＬ－２融合タンパク質を発現させ、前記ＩＬ－２融合タンパク質が、前記対象への薬物の後続投与に応答してＩＬ－２活性を抑制する、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】
前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）、または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ２－ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含み、前記ＤＲＤが、前記投与された薬物に応答して、ＩＬ－２の活性ドメインをマスクするように選択される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記遺伝子修飾が、前記修飾されたＴＩＬに、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８のうちの１つ以上を過剰発現させる、請求項１～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４９】
前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ１５－ＩＬ２１発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項４９に記載の方法。
【請求項５２】
対応するＴＩＬ集団を採取した後、前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、前記移すことが、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すことをさらに含む、請求項１、５～７、または１３～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５３】
凍結保存プロセスを使用して、前記注入バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記第１のＴＩＬ集団を取得することが、
（ａａ）前記腫瘍を、複数の断片に処理することと、
（ａｂ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得することと、を含む、請求項１～３、５、７、１１、１３、１５、または１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項１～５４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５６】
前記第１の拡張が、約３～１１日間行われる、請求項１～５５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５７】
前記第２の拡張が、約７～１１日間行われる、請求項１～５６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５８】
前記ＩＬ－２が、前記第１の拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項１～５７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５９】
前記第２の拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項１～５８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６０】
前記第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項１～５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６１】
前記第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項１～６０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６２】
前記第１の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択され

るサイトカインをさらに含む、請求項１～６１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６３】
前記第２の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項１～６２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６４】
前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６５】
前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドの投与ステップを含む、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記患者への前記ＴＩＬの投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６７】
前記遺伝子修飾されたＴＩＬが、以下の、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲを含む群から選択される、免疫チェックポイント遺伝子のうちの１つ以上の発現を低減する、追加の遺伝子修飾をさらに含む、請求項１～６６のいずれか１項にに記載の方法。
【請求項６８】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む、請求項１～６７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６９】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を機械的に破壊して前記腫瘍試料を解離することをさらに含む、請求項１～６７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７０】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、密度勾配分離を使用して前記解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む、請求項１～６７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７１】
前記酵素培地が、ＤＮａｓｅを含む、請求項６８に記載の方法。
【請求項７２】
前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、請求項６８に記載の方法。
【請求項７３】
前記ＡＰＣが、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む、請求項１～７２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７４】
前記治療的ＴＩＬ集団が、前記第１及び／または第２のＴＩＬ集団と比較して増加したＣＤ８＋細胞の亜集団を示す、請求項１～７２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７５】

前記ＰＢＭＣが、約１：２５　ＴＩＬ：ＰＢＭＣの比で補充される、請求項１～７４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７６】

前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも５０倍多い、請求項１～７５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７７】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）で取得された治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、前記対象に投与するステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合によって活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項７８】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取された前記ＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項７９】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取された前記ＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項８０】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取された前記ＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の前記第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｊ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｉ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項８１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわた

って行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項８２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項８３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い

、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された前記第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項８４】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの前記採取したＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項８５】

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

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から

取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象もしくは患者におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項８６】

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

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項８７】

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

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項８８】

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

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

（ｃ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（ｊ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項８９】

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

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

（ｂ）第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項９０】

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

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前またはステップ（ｆ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。
【請求項９１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項９２】
ステップ（ｃ）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、ステップ（ｄ）の前記培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｃ）の前記培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第

１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された前記第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前またはステップ（ｅ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項９４】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項７７～９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項９６】
ステップ（ａ）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、ステップ（ｃ）の前記培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）の前記培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、請求項８６に記載の方法。
【請求項９７】

Ｔ細胞を拡張する方法であって、
（ａ）ドナーから取得された第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を、前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、
（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた前記第１のＴＩＬ集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第１のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を、前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、
（ｃ）前記第２のＴ細胞集団を採取することと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項９８】
Ｔ細胞を拡張する方法であって、
（ａ）ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を、前記第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、
（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた前記第１のＴ細胞集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を、前記第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、
（ｃ）前記第２のＴ細胞集団を採取することと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、前記サイトカインを活性化する、前記遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。
【請求項９９】
前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団に、ＩＬ－１８を過剰発現させる、請求項７７～９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１００】
前記遺伝子修飾がステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、ＮＦＡＴ－ＩＬ１８発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１００に記載の方法。

【請求項１０３】
前記方法が、有効量の前記リガンドを前記対象に投与することをさらに含み、前記発現したＤＲＤ－サイトカイン構築物が、前記リガンドによって活性化されて、前記対象における前記がんに近接して投与された前記ＴＩＬ集団の拡張を促進する、請求項７７～８３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０４】
前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも５倍多い、及び／または前記第３のＴＩＬ集団の数が、前記急速な拡張の開始から７～８日後に、前記第２のＴＩＬ集団よりも少なくとも５０倍多い、請求項８１、８２または８９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０５】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０７】
前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団にＩＬ２融合タンパク質を発現させ、前記ＩＬ－２融合タンパク質が、前記対象への薬物の後続投与に応答してＩＬ－２を放出する、請求項７７～８３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）、または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ２－ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含み、前記ＤＲＤが、前記投与された薬物に応答して、ＩＬ－２から分離するように選択される、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
前記形質導入が、非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１１】
前記遺伝子修飾が、前記投与されたＴＩＬ集団にＩＬ－２融合タンパク質を発現させ、前記ＩＬ－２融合タンパク質が、前記対象への薬物の後続投与に応答してＩＬ－２活性を抑制する、請求項７７～８３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）、または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ２－ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含み、前記ＤＲＤが、前記投与された薬物に応答して、ＩＬ－２の活性ドメインをマスクするように選択される、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】

前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１１２に記載の方法。

【請求項１１５】

前記遺伝子修飾が、前記修飾されたＴＩＬに、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８のうちの１つ以上を過剰発現させる、請求項７７～９８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１６】

前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ１５－ＩＬ２１発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項１１５に記載の方法。

【請求項１１７】

前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１１６に記載の方法。

【請求項１１８】

前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１１６に記載の方法。

【請求項１１９】

対応するＴＩＬ集団を採取した後、前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、前記移すことが、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すことをさらに含む、請求項７７、８１～８３、または８９～９８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２０】

凍結保存プロセスを使用して、前記注入バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項１２１】

前記第１のＴＩＬ集団を取得することが、

（ａａ）前記腫瘍を、複数の断片に処理することと、

（ａｂ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得することと、を含む、請求項７７～７９、８１、８３、８７、８９、９１、または９３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２２】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項７７～１２１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２３】

前記第１の拡張が、約３～１１日間行われる、請求項７７～１２２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１２４】

前記第２の拡張が、約７～１１日間行われる、請求項７７～１２３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２５】
前記ＩＬ－２が、前記第１の拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項７７～１２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２６】
前記第２の拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項７７～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２７】
前記第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項７７～１２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２８】
前記第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項７７～１２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２９】
前記第１の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項７７～１２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３０】
前記第２の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項７７～１２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３１】
前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項７７～８３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３２】
前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドの投与ステップを含む、請求項７７～８３または１３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３３】
前記患者への前記ＴＩＬの投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項７７～８３、１３１または１３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３４】
前記遺伝子修飾されたＴＩＬが、以下の、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲを含む群から選択される免疫チェックポイント遺伝子のうちの１つ以上の発現を低減する、追加の遺伝子修飾をさらに含む、請求項７７～１３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３５】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を酵素

培地中でインキュベートすることを含む、請求項７７～１３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３６】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を機械的に破壊して前記腫瘍試料を解離することをさらに含む、請求項７７～１３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３７】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、密度勾配分離を使用して前記解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む、請求項７７～１３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３８】
前記酵素培地が、ＤＮａｓｅを含む、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１３９】
前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、請求項１３５に記載の方法。
【請求項１４０】
前記ＡＰＣが、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む、請求項７７～１３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４１】
前記治療的ＴＩＬ集団が、前記第１及び／または第２のＴＩＬ集団と比較して増加したＣＤ８＋細胞の亜集団を示す、請求項７７～１４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４２】
前記ＰＢＭＣが、約１：２５　ＴＩＬ：ＰＢＭＣの比で補充される、請求項７７～１４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４３】
前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも５０倍多い、請求項７７～１４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４４】
前記ＤＲＤ－サイトカインの発現が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下にある、請求項７７～１４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４５】
前記遺伝子修飾が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でサイトカインの発現をさらに引き起こす、請求項７７～１４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４６】
前記サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１４５に記載の方法。
【請求項１４７】
修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴ

ＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）の後の任意の時点で、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、

（ｇ）治療上有効な投与量の前記コンジュゲートを前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１４８】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、

（ｈ）ステップ（ｇ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外

因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の前記コンジュゲートを前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１４９】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取された前記ＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、
（ｈ）ステップ（ｇ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の前記コンジュゲートを前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５０】
修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

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

（ｉ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｈ）の前または後の任意の時点で遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、

（ｊ）ステップ（ｉ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、

（ｊ）治療上有効な投与量の前記コンジュゲートを、前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１５１】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

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

（ｂ）第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を取得するステップであって、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記取得するステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであっ

て、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、

（ｇ）前記コンジュゲートの治療上有効な部分を、前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１５２】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（ａ）前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、

（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、

（ｈ）ステップ（ｇ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、

（ｇ）前記コンジュゲートの治療上有効な部分を、前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１５３】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

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

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第１の拡張が

第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された前記第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、

（ｈ）前記コンジュゲートの治療上有効な部分を、前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項１５４】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの前記採取したＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾することと、

（ｇ）ステップ（ｆ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出する

ことができる前記コンジュゲートを形成することと、を含む、前記方法。
【請求項１５５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象もしくは患者におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５６】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する

密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５７】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５８】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得する、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された前記第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、前記修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる前記１つ以上の結合パートナーに結合する、前記遺伝子修飾するステップと、
（ｉ）ステップ（ｈ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを前記１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１５９】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日

、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１６０】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、前記方法が、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第２の拡張が、前記急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、
（ｈ）ステップ（ｇ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１６１】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴ

ＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された前記治療的ＴＩＬ集団を採取することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成することと、を含む、前記方法。
【請求項１６２】
ステップ（ｃ）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、ステップ（ｄ）の前記培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｃ）の前記培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、請求項１６１に記載の方法。
【請求項１６３】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）任意選択で、前記第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された前記第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が約１４日以内の第２の期間行われて、前記治療的ＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、
（ｇ）ステップ（ｆ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成することと、を含む、前記方法。
【請求項１６４】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項１４７～１６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６５】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団の数が前記第１のＴＩＬ集団よりも多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｂ）前記第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、前記第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取することと、

（ｄ）前記第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成することと、を含む、前記方法。

【請求項１６６】

ステップ（ａ）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含み、ステップ（ｃ）の前記培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）の前記培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、請求項１６５に記載の方法。

【請求項１６７】

Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーから取得された第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を、前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた前記第１のＴＩＬ集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第１のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を、前記第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、

（ｃ）前記第２のＴ細胞集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成することと、を含む、前記方法。

【請求項１６８】

Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を、前記第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた前記第１のＴ細胞集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を、前記第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、

（ｃ）前記第２のＴ細胞集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む前記遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前または後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）の後の任意の時点で、前記修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、前記サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができる前記コンジュゲートを形成することと、を含む、前記方法。

【請求項１６９】

前記方法が、前記第３のＴＩＬ集団にＩＬ－１８を過剰発現させる遺伝子修飾をさらに含む、請求項１４７～１６８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７０】
前記遺伝子修飾がステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、ＮＦＡＴ－ＩＬ１８発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項１６９に記載の方法。
【請求項１７１】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７２】
前記形質導入が、非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１７０に記載の方法。
【請求項１７３】
前記方法が、前記対象に、有効用量の前記修飾されたＴＩＬを投与することをさらに含み、前記修飾されたＴＩＬが、前記サイトカイン担体を放出し、前記サイトカイン担体が、前記対象における前記がんに近接してサイトカインを放出し、放出された前記サイトカインが、前記対象における前記がんに近接して投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進する、請求項１４７～１６８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７４】
前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも５倍多い、及び／または前記第３のＴＩＬ集団の数が、前記急速な拡張の開始から７～８日後に、前記第２のＴＩＬ集団よりも少なくとも５０倍多い、請求項１５１、１５２、または１５９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７５】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１７４に記載の方法。
【請求項１７６】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１７４に記載の方法。
【請求項１７７】
前記方法が、前記投与されたＴＩＬ集団にＩＬ２融合タンパク質を発現させる遺伝子修飾をさらに含み、前記ＩＬ－２融合タンパク質が、前記対象への薬物の後続投与に応答してＩＬ－２を放出する、請求項１４７～１６８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７８】
前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）、または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ２－ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含み、前記ＤＲＤが、前記投与された薬物に応答して、ＩＬ－２から分離するように選択される、請求項１７７に記載の方法。
【請求項１７９】
前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１７８に記載の方法。
【請求項１８０】
前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌ

ｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１７８に記載の方法。

【請求項１８１】

前記方法が、前記投与されたＴＩＬ集団にＩＬ－２融合タンパク質を発現させる遺伝子修飾をさらに含み、前記ＩＬ－２融合タンパク質が、前記対象への薬物の後続投与に応答してＩＬ－２活性を抑制する、請求項１４７～１６８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１８２】

前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）、または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ２－ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含み、前記ＤＲＤが、前記投与された薬物に応答して、ＩＬ－２の活性ドメインをマスクするように選択される、請求項１８１に記載の方法。

【請求項１８３】

前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１８１に記載の方法。

【請求項１８４】

前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１８１に記載の方法。

【請求項１８５】

前記方法が、前記投与されたＴＩＬ集団に、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８のうちの１つ以上を過剰発現させる遺伝子修飾をさらに含む、請求項１４７～１６８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１８６】

前記遺伝子修飾が、ステップ（ｃ）、（ｄ）または（ｅ）の前の任意の時点で、ＩＬ１５－ＩＬ２１発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む、請求項１８５に記載の方法。

【請求項１８７】

前記形質導入ベクターが、レンチウイルスまたはレトロウイルスである、請求項１８６に記載の方法。

【請求項１８８】

前記形質導入が、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス形質導入技法を使用して行われる、請求項１８６に記載の方法。

【請求項１８９】

対応するＴＩＬ集団を採取した後、前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、前記移すことが、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すことをさらに含む、請求項１４７、１５１～１５３、または１５９～１６８のいずれか１項に記

載の方法。
【請求項１９０】
凍結保存プロセスを使用して、前記注入バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項１８９に記載の方法。
【請求項１９１】
前記第１のＴＩＬ集団を取得することが、
（ａａ）前記腫瘍を、複数の断片に処理することと、
（ａｂ）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第１のＴＩＬ集団を取得することと、を含む、請求項１４２～１４９、１５１、１５３、１５７、１５８、１６０、または１６２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９２】
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項１４７～１９１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９３】
前記第１の拡張が、約３～１１日間行われる、請求項１４７～１９２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９４】
前記第２の拡張が、約７～１１日間行われる、請求項１４７～１９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９５】
前記ＩＬ－２が、前記第１の拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項１４７～１９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９６】
前記第２の拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項１４７～１９５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９７】
前記第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項１４７～１９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９８】
前記第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項１４７～１９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９９】
前記第１の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項１４７～１９８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２００】
前記第２の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項１４７～１９９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０１】
前記第３のＴＩＬ集団を前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１４７～１５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０２】
前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドの投与ステップを含む、請求項２０１に記載の方法。

【請求項２０３】
前記患者への前記ＴＩＬの投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１４７～１５３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０４】
前記遺伝子修飾されたＴＩＬが、以下の、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲを含む群から選択される免疫チェックポイント遺伝子のうちの１つ以上の発現を低減する、追加の遺伝子修飾をさらに含む、請求項１４７～２０３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０５】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む、請求項１４７～２０４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０６】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を機械的に破壊して前記腫瘍試料を解離することをさらに含む、請求項１４７～２０４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０７】
前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、密度勾配分離を使用して前記解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む、請求項１４７～２０４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０８】
前記酵素培地が、ＤＮａｓｅを含む、請求項２０５に記載の方法。
【請求項２０９】
前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、請求項２０５に記載の方法。
【請求項２１０】
前記ＡＰＣが、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む、請求項１４７～２０９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１１】
前記治療的ＴＩＬ集団が、前記第１及び／または第２のＴＩＬ集団と比較して増加したＣＤ８＋細胞の亜集団を示す、請求項１４７～２１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１２】
前記ＰＢＭＣが、約１：２５　ＴＩＬ：ＰＢＭＣの比で補充される、請求項１４７～２１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１３】
前記第２のＴＩＬ集団の数が、前記第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも５０倍多い、請求項１４７～２１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１４】
前記遺伝子修飾が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でサイトカインの発現をさらに引き起こす、請求項１４７～２１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１５】
前記サイトカインが、ＩＬ－１８である、請求項２０５に記載の方法。
【請求項２１６】

前記遺伝子修飾が、腫瘍微小環境を調節して投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進する薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現をさらに引き起こし、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合して前記サイトカインを活性化する外因性に投与されたリガンドによって活性化される、請求項１４７～２１５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２１７】

前記ＤＲＤ－サイトカインの発現が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下にある、請求項１４７に記載の方法。

【請求項２１８】

前記サイトカインが、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項２１７に記載の方法。

【請求項２１９】

前記遺伝子修飾が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でのサイトカインの発現、及び腫瘍微小環境を調節して投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進する薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現をさらに引き起こし、前記発現されたＤＲＤ－サイトカインが、前記ＤＲＤ－サイトカインの前記ＤＲＤに結合して前記サイトカインを活性化する外因性に投与されたリガンドによって活性化される、請求項１４７～２１８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２０】

前記サイトカイン担体が、リポソーム、小胞、ナノゲル、またはそれらの組み合わせを含む、請求項１４７～２１９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２１】

前記遺伝子修飾が、前記ＴＩＬの表面上に発現されるサイトカインの発現をさらに引き起こす、請求項１～２２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２２】

前記遺伝子修飾が、前記修飾されたＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するＲＮＡ分子の発現をさらに引き起こす、請求項１～２２０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２３】

前記ＲＮＡ分子が、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）である、請求項２２２に記載の方法。

【請求項２２４】

前記内因性遺伝子が、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、及びＢＡＦＦ（ＢＲ３）から選択される免疫チェックポイントをコードする、請求項２２２または２２３に記載の方法。

【請求項２２５】

前記１つ以上の外因性サイトカイン担体が、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８からなる群から選択される１つ以上のサイトカインを含む、請求項１４７～２２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２６】

前記１つ以上の結合パートナーが、抗体、抗体の抗原結合断片、抗体の一本鎖可変ドメイン、抗原、抗原の抗体結合部位、エピトープ、ビオチン、ストレプトアビジンからなる群から選択される１つ以上の部分を含む、請求項１４７～２２５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２２７】

各コンジュゲートが、以下の式を有し

Ｂ１－Ｃ１－Ｌ１－Ｂ２、

式中、Ｂ１が、前記修飾されたＴＩＬであり、Ｃ１が、不安定な部分であり、Ｌ１が、リンカーであり、Ｂ２が、前記サイトカイン担体であり、Ｃ１が、酵素切断、クリック化学

反応または酸化還元反応が可能であり、前記コンジュゲートからのＬ１－Ｂ２の放出をもたらす、請求項１４７～２２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２８】
各コンジュゲートが、以下の式を有し
Ｂ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｂ２、
式中、Ｂ１が、前記修飾されたＴＩＬであり、Ｌ１が、リンカーであり、Ｃ１が、不安定な部分であり、Ｂ２が、前記サイトカイン担体であり、Ｃ１が、酵素切断、クリック化学反応または酸化還元反応が可能であり、前記コンジュゲートからのＢ２の放出をもたらす、請求項１４７～２２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２９】
各コンジュゲートが、以下の式を有し
Ｂ１－Ｃ１－Ｂ２、
式中、Ｂ１が、前記修飾されたＴＩＬであり、Ｃ１が、不安定な部分であり、Ｂ２が、前記サイトカイン担体であり、Ｃ１が、酵素切断、クリック化学反応または酸化還元反応が可能であり、前記コンジュゲートからのＢ２の放出をもたらす、請求項１４７～２２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３０】
各コンジュゲートが、以下の式を有し
Ｂ１－（Ｌ１）$_{n}$－Ｃ１－（Ｌ２）$_{m}$－Ｂ２、
式中、Ｂ１が、前記修飾されたＴＩＬであり、Ｃ１が、不安定な部分であり、Ｌ１が、リンカーであり、Ｌ２が、リンカーであり、ｎ及びｍが、独立して、０または１であり、Ｂ２が、前記サイトカイン担体であり、Ｃ１が、前記コンジュゲートから（Ｌ２）$_{m}$－Ｂ２を放出することができる、請求項１４７～２２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３１】
Ｃ１が、不安定な化学結合である、請求項２２７～２３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３２】
Ｃ１が、不安定な化学構造である、請求項２２７～２３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３３】
Ｃ１が、酵素切断、クリック化学反応、または酸化還元反応が可能であり、前記コンジュゲートからの（Ｌ２）$_{m}$－Ｂ２の放出をもたらす、請求項２１８に記載の方法。
【請求項２３４】
Ｂ２が、リポソーム、小胞、及びナノゲルのうちの１つ以上を含む、請求項２２７～２３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３５】
Ｂ２が、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２及びＩＬ－１８からなる群から選択される１つ以上のサイトカインを含む、請求項２２７～２３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３６】
前記コンジュゲートからの前記１つ以上の外因性サイトカイン担体の放出が、
（ｉ）クリック化学による漸進的シェディング、
（ｉｉ）酸化還元反応、及び
（ｉｉｉ）酵素切断のうちの１つ以上によるものであり、
（ｉ）～（ｉｉｉ）のうちのいずれかが、前記対象における前記がんに近接して生じる、請求項１４７～２３５のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
Ｉ．関連出願の相互参照

本出願は、２０２２年１月２８日に出願された米国仮出願第６３／３０４，２４６号、２０２２年８月１日に出願された米国仮出願第６３／３９４，２５３号、及び２０２２年１１月４日に出願された米国仮出願第６３／３８２，４９１号の優先権を主張し、これらの開示は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

ＩＩ．

【背景技術】

【０００２】

黒色腫の治療は、特にニボルマブ単剤療法、ペムブロリズマブ単剤療法、ニボルマブとイピリムマブとの組み合わせを使用する療法、イピリムマブ単剤療法、ダブラフェニブとトラメチニブとの組み合わせを使用する療法、ベムラフェニブ単剤療法、またはペグ化インターフェロン（ペグインターフェロン）アルファ－２ｂを含む、一般的に使用される初期療法に応答しない患者にとって、依然として困難である。自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を使用した養子細胞療法は、転移性黒色腫（Ｓａｒｎａｉｋ ＡＡ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ ２０２１）、子宮頸癌（Ｊａｚａｅｒｉ ＡＡ ｅｔ ａｌ．，ＡＳＣＯ ２０１９＃１８２）、及び他の上皮悪性腫瘍を有する患者のサブセットにおいて持続的な応答を示している。

【０００３】

異なるサイトカインの過剰発現は、投与されたＴＩＬの生存、活性及び／または寿命をさらに促進することができる腫瘍微小環境を修飾できることが理解される。例えば、ＩＬ－１５の過剰発現は、長寿命ＣＤ８＋メモリーＴ細胞の恒常性維持を改善し、ＡＩＣＤを阻害し、Ｔ細胞エネルギーを逆転させることができる。同様に、ＩＬ－１８の過剰発現は、ＩＦＮγの産生及び急性Ｔｈ１応答を誘導する。同様に、ＩＬ２１の過剰発現は、ＩＬ－２の非存在下でのＴ細胞生存をサポートし、ＣＭ／ＥＭ表現型を有利にし、ＰＤ１発現を低下させる。追加として、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の構成的共発現は、ＴＩＬの投与時に、インビボで（及びおそらくインビトロで）高い拡張レベルを支持し得、シグナル伝達をＴＩＬに制限し、それらが持続し、毒性を低下させることを可能にすべきである。毒性の低下は、例えば、非骨髄性リンパ枯渇を伴わない養子細胞療法を可能にすることができる。

ＩＩＩ．

【発明の概要】

【０００４】

患者に投与されるＴＩＬのさらなる拡張を促進するように、腫瘍微小環境を修飾するサイトカインを発現することができる遺伝子修飾されたＴＩＬを生成するための方法が、本明細書に提供される。

【０００５】

例えば、ＴＩＬは、ＩＦＮγ及び急性Ｔｈ１応答の産生を誘導することが知られているＩＬ－１８を過剰発現させるように遺伝子修飾され得る。したがって、ＩＬ－１８の誘導性発現は、ＴＩＬ増殖及び抗腫瘍活性を増加させる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴ－ＩＬ１８発現カセットを用いたＴＩＬのレンチウイルスまたはレトロウイルス形質導入を介して、ＩＬ－１８を発現するように誘導され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス技法を介して、ＩＬ－１８を発現するように誘導され得る。

【０００６】

別の態様では、ＴＩＬは、１つ以上のサイトカイン及び細胞ならびに細胞膜アンカー部

分を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＦＮガンマ、ＴＮＦａ、ＩＦＮアルファ、ＩＦＮベータ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のサイトカインは、ＩＬ－１２またはそのバリアントである。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、ＴＩＬ集団における内因性遺伝子の発現を抑制するＲＮＡ分子の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子は、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）である。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、及びＢＡＦＦ（ＢＲ３）から選択される免疫チェックポイントをコードする。

【０００７】

別の態様では、ＴＩＬは、条件付きで内因性ＩＬ－２を発現するように誘導され得る。条件的発現は、ＴＩＬを誘導してＩＬ－２　ＤＲＤ（薬物応答性ドメイン）融合タンパク質を発現させることによって達成することができる。ＤＲＤは、基礎ＯＮまたは基礎ＯＦＦ官能性を提供することができる。ＴＩＬが基礎官能性がＯＦＦになるようにＩＬ－２－ＤＲＤを発現すると、ＩＬ－２とＤＲＤとの間の結合は、プロテオソームによって切断されて、ＩＬ－２を放出することができる。一方、ＴＩＬが、基礎官能性がＯＮになるようにＩＬ－２－ＤＲＤを発現すると、外因性リガンドは、基礎ＯＮ官能性を提供するようにＩＬ－２とＤＲＤとの間の相互作用を制御し得る。有利には、いずれのアプローチも、挿入変異誘発のリスクが低く、漏出系であるリスクが低い。

【０００８】

ＩＬ－１５は、長寿命ＣＲ８＋メモリーＴ細胞の恒常性維持に必要であり、ＡＩＣＤを阻害し、Ｔ細胞エネルギーを逆転させる。ＩＬ－２１は、ＩＬ２の非存在下でのＴ細胞の生存をサポートし、ＣＭ／ＥＭ表現型を有利にし、ＰＤ１の発現を低下させる。したがって、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の構成的共発現は、養子細胞療法時に、インビトロ及びインビボで高い拡張レベルをサポートし得る。有利には、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のそのような構成的共発現はまた、シグナル伝達をＴＩＬに制限し、それらが持続し、毒性を低下させ、ＮＭＡ－ＬＤとともに処分することを可能にし得る。二重ＩＬ－１５／ＩＬ－２１発現は、二重ＩＬ－１５／ＩＬ－２１発現カセットを用いたＴＩＬのレンチウイルスまたはレトロウイルス形質導入によって誘導され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス技法を介して、ＩＬ－１５／ＩＬ－２１を発現するように誘導され得る。

【０００９】

さらなる態様では、ＴＩＬは、ＩＬ－１２／ＩＬ－１５を含む担体を発現するように誘導され得る。担体としては、限定されないが、リポソーム、小胞、ナノゲル粒子、及び結合が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、担体は、（ａ）ＴＩＬ細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる結合パートナーに連結し、（ｂ）（ｉ）クリック化学による段階的なシェディング、または（ｉｉ）腫瘍微小環境（ＴＭＥ）における酸化還元反応または酵素切断による放出によって、担体を放出してもよい。

【００１０】

したがって、本開示の態様では、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）で取得された治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、対象に投与するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００１１】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の注入バッグから対象に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００１２】
したがって、本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の注入バッグから対象に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。
【００１３】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、

ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｊ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｉ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。
【００１４】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。
【００１５】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００１６】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、急速な第２の拡張が約１４日間の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００１７】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中

で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われ、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取したＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００１８】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象もしくは患者におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００１９】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、

ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００２０】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００２１】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示

細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｊ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００２２】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

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

（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００２３】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前またはステップ（ｆ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００２４】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００２５】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

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

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１４日間の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前またはステップ（ｅ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、方法。
【００２６】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われ、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、方法。
【００２７】
本開示の別の態様では、Ｔ細胞を拡張する方法であって、
（ａ）ドナーから取得された第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を、第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、
（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴＩＬ集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を、第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、
（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、方法。
【００２８】
本開示の別の態様では、Ｔ細胞を拡張する方法であって、
（ａ）ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を、第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、
（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を、第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、
（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ

（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００２９】

本開示の別の態様では、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｈ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｊ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｋ）ステップ（ｄ）で取得された治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、対象に投与するステップと、

（ｌ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３０】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の注入バッグから対象に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３１】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の注入バッグから対象に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３２】

本開示の別の態様では、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｊ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｉ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３３】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３４】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。
【００３５】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、急速な第２の拡張が約１４日間の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３６】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われ、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取したＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００３７】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象もしくは患者におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３８】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００３９】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、

第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。
【００４０】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、
（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、
（ｃ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｊ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。
【００４１】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養

培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００４２】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前またはステップ（ｆ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾するステップと、を含む、方法。

【００４３】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ

）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００４４】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

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

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１４日間の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取することと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前またはステップ（ｅ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００４５】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と

接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われ、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００４６】

本開示の別の態様では、Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーから取得された第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を、第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴＩＬ集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を、第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、

（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００４７】

本開示の別の態様では、Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を、第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を、第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、

（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）－サイトカイン構築物の発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点でＴＩＬを遺伝子修飾することであって、発現されたＤＲＤ－サイトカインが、ＤＲＤ－サイトカインのＤＲＤに結合するリガンドの結合時に活性化され、サイトカインを活性化する、遺伝子修飾することと、を含む、方法。

【００４８】

本開示の別の態様では、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）で取得された治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、対象に投与するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００４９】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｆ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｇ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｆ）の注入バッグから対象に投与するステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パート

ナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｉ）ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５０】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

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

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

（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｉ）ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５１】

本開示の別の態様では、修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｂ）腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

（ｃ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、
（ｉ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｈ）の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｊ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｉ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、
（ｋ）ステップ（ｉ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５２】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を取得するステップであって、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、取得するステップと、
（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステッ

プ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｇ）ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５３】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、

（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｉ）ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５４】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、急速な第２の拡張が約１４日間の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、
（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、
（ｈ）ステップ（ｆ）の前の任意の時点で、修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合させて、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。
【００５５】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団をＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地中で培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われ、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取したＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、
（ｇ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成することと、を含む、方法。
【００５６】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から

取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象もしくは患者におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、
（ｉ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。
【００５７】
本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、
（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステッ

プ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｉ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５８】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

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

（ｂ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｇ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００５９】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

（ｃ）複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、任意選択で、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示

細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、任意選択で、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（ｊ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｇ）の前の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｋ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００６０】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

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

（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｆ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００６１】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張する方法であって、この方法は、

（ａ）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任

意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除するステップと、

（ｂ）腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｆ）の前またはステップ（ｆ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップと、

（ｈ）修飾されたＴＩＬを外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成するステップと、を含む、方法。

【００６２】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理すること、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、

（ｇ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｄ）の前またはステップ（ｄ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｈ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイ

ン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成することと、を含む、方法。

【００６３】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

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

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をＯＫＴ－３で再刺激することと、

（ｄ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の細胞培養培地中で修飾された第２のＴＩＬ集団を培養することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することあって、急速な第２の拡張が約１４日間の第２の期間行われて、治療的ＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を採取することと、

（ｆ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｅ）の前またはステップ（ｅ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｇ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成することと、を含む、方法。

【００６４】

本開示の別の態様では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、

（ａ）ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約１～１１日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｂ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われ、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ステップ（ｂ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾するステップであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｅ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成することと、を含む、方法。

【００６５】

本開示の別の態様では、Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーから取得された第１のＴＩＬ集団のプライミングによる第１の拡張を、第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴＩＬ集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を、第１のＴＩＬ集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、

（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｅ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成することと、を含む、方法。

【００６６】

本開示の別の態様では、Ｔ細胞を拡張する方法であって、

（ａ）ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を、第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を、第１のＴ細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、

（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団が、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上で１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたＴＩＬを含むように、ステップ（ｃ）の前またはステップ（ｃ）の後の任意の時点で、ＴＩＬを遺伝子修飾することであって、１つ以上の外因性サイトカイン担体が、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に延びる１つ以上の結合パートナーに結合する、ＴＩＬを遺伝子修飾することと、

（ｅ）修飾されたＴＩＬを１つ以上の外因性サイトカイン担体に結合して、サイトカイン担体をコンジュゲートから放出することができるコンジュゲートを形成することと、を含む、方法。

ＩＶ．

【図面の簡単な説明】

【００６７】

【図１】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）チャート。

【図２Ａ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図２Ｂ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図２Ｃ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。
【図３】凍結保存されたＴＩＬの例示的な製造プロセス（約２２日）の実施形態の図を示す。
【図４】ＴＩＬ製造のための２２日プロセスである、Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態の図を示す。
【図５】ＴＩＬ製造のためのプロセス１Ｃ及びＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の例示的な実施形態からのステップＡ～Ｆの比較表。
【図６】ＴＩＬ製造のためのプロセス１Ｃの実施形態とＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態との詳細な比較。
【図７】例示的なＧｅｎ３型ＴＩＬ製造プロセス。
【図８Ａ】ＴＩＬ製造のための２Ａプロセス（およそ２２日プロセス）とＧｅｎ３プロセス（およそ１４日～１６日プロセス）の実施形態との比較を示す。
【図８Ｂ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセスＧｅｎ３チャート（およそ１４日～１６日プロセス）。
【図８Ｃ】３つのプロセスバリエーションの各々について、ステップＡ～Ｆ（およそ１４日～１６日プロセス）の概要とともに３つの例示的なＧｅｎ３プロセスを提供するチャート。
【図８Ｄ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ２様プロセス（およそ２２日プロセス）。
【図９】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。
【図１０】様々なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３．１プロセス実施形態との比較を示す。
【図１１】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１２】Ｇｅｎ３．１と称される、Ｇｅｎ３プロセスの実施形態のための培地条件の概要。
【図１３】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１４】Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。
【図１５】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。
【図１６】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図１７】Ｇｅｎ３拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からＴ細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。
【図１８】構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂを提供する。円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体から誘導される３つの線形に結合したＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれをＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたＶＨ鎖及びＶＬ鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。
【図１９】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２０】Ｇｅｎ３．１プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。
【図２１】Ｇｅｎ３．１試験プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の概

略図。
【図２２】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２３】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２４】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。
【図２５】Ｇｅｎ３プロセス（１４～１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ａ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ｂ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２７】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図２９】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図３０】Ｇｅｎ３実施形態の構成要素。
【図３１】Ｇｅｎ３実施形態のフローチャート比較（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）。
【図３２】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。
【図３３】承認基準表
【図３４Ａ】６×ＮＦＡＴ　ＩＬ－２最小プロモーター配列を示す。
【図３４Ｂ】ＮＦＡＴ－ＩＬ１８　ＤＮＡ配列を示す。
【図３４Ｃ】ＮＦＡＴ－ＤＲ－ＩＬ１８　ＤＮＡ配列を示す。
【図３５Ａ】ＢＣＮ基を有する脂質クリック分子の構造及び合成の例を示す。
【図３５Ｂ】タグ付けされたＰＥＧ－アジド分子を有するアンカー分子の構造及び合成の例を示す。
【図３６】ＴＩＬにアンカーされた結合パートナーを有する、リポソームまたはサイトカイン装填ナノ粒子をカプセル化する、結合サイトカインの概略図を示す。
【図３７】本明細書で提供される主題のＴＩＬの実施形態において、メンバーアンカーＩＬ－１２（ＴｅＩＬ－１２）及びＰＤ－１　ｓｈＲＮＡの発現を可能にする例示的な核酸を示す。
【００６８】
Ｖ．配列表の簡単な説明
　配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。
【００６９】
　配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。
【００７０】
　配列番号３は、組換えヒトＩＬ－２タンパク質のアミノ酸配列である。
【００７１】
　配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。
【００７２】
　配列番号５は、ＩＬ－２形態である。
【００７３】
　配列番号６は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。
【００７４】
　配列番号７は、ＩＬ－２形態である。
【００７５】
　配列番号８は、ムチンドメインポリペプチドである。
【００７６】
　配列番号９は、組換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。
【００７７】

配列番号１０は、組換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。
【００７８】
配列番号１１は、組換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。
【００７９】
配列番号１２は、組換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。
【００８０】
配列番号１３は、ＩＬ－２配列である。
【００８１】
配列番号１４は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【００８２】
配列番号１５は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【００８３】
配列番号１６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２である。
【００８４】
配列番号１７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２である。
【００８５】
配列番号１８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３である。
【００８６】
配列番号１９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２カバットである。
【００８７】
配列番号２０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２カバットである。
【００８８】
配列番号２１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３カバットである。
【００８９】
配列番号２２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２クロチアである。
【００９０】
配列番号２３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２クロチアである。
【００９１】
配列番号２４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３クロチアである。
【００９２】
配列番号２５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２　ＩＭＧＴである。
【００９３】
配列番号２６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２　ＩＭＧＴである。
【００９４】
配列番号２７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３　ＩＭＧＴである。
【００９５】
配列番号２８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＶＨ鎖である。
【００９６】
配列番号２９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１の重鎖である。
【００９７】
配列番号３０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１カバットである。
【００９８】
配列番号３１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２カバットである。
【００９９】
配列番号３２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３カバットである。
【０１００】
配列番号３３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１　ｃｈｏｔｈｉａである。

【０１０１】
配列番号３４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０１０２】
配列番号３５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３　ｃｈｏｔｈｉａである。
【０１０３】
配列番号３６は、ＶＬ鎖である。
【０１０４】
配列番号３７は、軽鎖である。
【０１０５】
配列番号３８は、軽鎖である。
【０１０６】
配列番号３９は、軽鎖である。
【０１０７】
配列番号４０は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１０８】
配列番号４１は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１０９】
配列番号４２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖である。
【０１１０】
配列番号４３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖である。
【０１１１】
配列番号４４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１１２】
配列番号４５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１１３】
配列番号４６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１１４】
配列番号４７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１１５】
配列番号４８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１１６】
配列番号４９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１１７】
配列番号５０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１１８】
配列番号５１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１１９】
配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖である。
【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

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

【０１２３】

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

【０１２４】

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

【０１２５】

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

【０１２６】

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

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

配列番号６２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。

【０１３０】

配列番号６３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３１】

配列番号６４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３２】

配列番号６５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３３】

配列番号６６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３４】

配列番号６７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３５】

配列番号６８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３６】

配列番号６９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３７】

配列番号７０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３８】

配列番号７１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１３９】

配列番号７２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【０１４０】

配列番号７３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。

【０１４１】
配列番号７４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４２】
配列番号７５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４３】
配列番号７６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１４４】
配列番号７７は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
【０１４５】
配列番号７８は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
【０１４６】
配列番号７９は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１４７】
配列番号８０は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１４８】
配列番号８１は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１４９】
配列番号８２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１５０】
配列番号８３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１５１】
配列番号８４は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１５２】
配列番号８５は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０１５３】
配列番号８６は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。
【０１５４】
配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖である。
【０１５５】
配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖である。
【０１５６】
配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１５７】
配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１５８】
配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１５９】
配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ２である。

【０１６０】
配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１６１】
配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１６２】
配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１６３】
配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１６４】
配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。
【０１６５】
配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。
【０１６６】
配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１６７】
配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１６８】
配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１６９】
配列番号１０２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１７０】
配列番号１０３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１７１】
配列番号１０４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１７２】
配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１７３】
配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１７４】
配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。
【０１７５】
配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。
【０１７６】
配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１７７】
配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０１７８】
配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１７９】
配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１８０】
配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１８１】
配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１８２】
配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１８３】
配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１８４】
配列番号１１７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１８５】
配列番号１１８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１８６】
配列番号１１９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１８７】
配列番号１２０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１８８】
配列番号１２１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１８９】
配列番号１２２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１９０】
配列番号１２３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１９１】
配列番号１２４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１９２】
配列番号１２５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１９３】
配列番号１２６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１９４】
配列番号１２７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖

ＣＤＲ１である。
【０１９５】
配列番号１２８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１９６】
配列番号１２９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１９７】
配列番号１３０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１９８】
配列番号１３１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１９９】
配列番号１３２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２００】
配列番号１３３は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。
【０２０１】
配列番号１３４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。
【０２０２】
配列番号１３５は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替可溶性部分である。
【０２０３】
配列番号１３６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２０４】
配列番号１３７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２０５】
配列番号１３８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２０６】
配列番号１３９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２０７】
配列番号１４０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２０８】
配列番号１４１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２０９】
配列番号１４２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２１０】
配列番号１４３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０２１１】
配列番号１４４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０２１２】

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

【０２１３】

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

【０２１４】

配列番号１４７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２１５】

配列番号１４８は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０２１６】

配列番号１４９は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０２１７】

配列番号１５０は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２１８】

配列番号１５１は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２１９】

配列番号１５２は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０２２０】

配列番号１５３は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０２２１】

配列番号１５４は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２２２】

配列番号１５５は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２２３】

配列番号１５６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。

【０２２４】

配列番号１５７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。

【０２２５】

配列番号１５８は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０２２６】

配列番号１５９は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０２２７】

配列番号１６０は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。

【０２２８】

配列番号１６１は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。

【０２２９】

配列番号１６２は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０２３０】
配列番号１６３は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２３１】
配列番号１６４は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２３２】
配列番号１６５は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２３３】
配列番号１６６は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２３４】
配列番号１６７は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２３５】
配列番号１６８は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２３６】
配列番号１６９は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２３７】
配列番号１７０は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。
【０２３８】
配列番号１７１は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２３９】
配列番号１７２は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２４０】
配列番号１７３は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２４１】
配列番号１７４は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２４２】
配列番号１７５は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２４３】
配列番号１７６は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２４４】
配列番号１７７は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２４５】
配列番号１７８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２４６】
配列番号１７９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２４７】
配列番号１８０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。
【０２４８】
配列番号１８１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２４９】
配列番号１８２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列であ

る。
【０２５０】
配列番号１８３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２５１】
配列番号１８４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２５２】
配列番号１８５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２５３】
配列番号１８６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２５４】
配列番号１８７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２５５】
配列番号１８８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２５６】
配列番号１８９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２５７】
配列番号１９０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。
【０２５８】
配列番号１９１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２５９】
配列番号１９２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２６０】
配列番号１９３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２６１】
配列番号１９４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２６２】
配列番号１９５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２６３】
配列番号１９６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２６４】
配列番号１９７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２６５】
配列番号１９８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２６６】
配列番号１９９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２６７】
配列番号２００は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。
【０２６８】
配列番号２０１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２６９】
配列番号２０２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列であ

る。
【０２７０】
配列番号２０３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２７１】
配列番号２０４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２７２】
配列番号２０５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２７３】
配列番号２０６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２７４】
配列番号２０７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２７５】
配列番号２０８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２７６】
配列番号２０９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２７７】
配列番号２１０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。
【０２７８】
配列番号２１１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２７９】
配列番号２１２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２８０】
配列番号２１３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２８１】
配列番号２１４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２８２】
配列番号２１５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２８３】
配列番号２１６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２８４】
配列番号２１７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２８５】
配列番号２１８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２８６】
配列番号２１９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２８７】
配列番号２２０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ

酸配列である。
【０２８８】
配列番号２２１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２８９】
配列番号２２２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９０】
配列番号２２３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９１】
配列番号２２４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９２】
配列番号２２５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９３】
配列番号２２６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９４】
配列番号２２７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９５】
配列番号２２８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２９６】
配列番号２２９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２９７】
配列番号２３０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域（ＶＨ）アミノ酸配列である。
【０２９８】
配列番号２３１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域（ＶＬ）アミノ酸配列である。
【０２９９】
配列番号２３２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３００】
配列番号２３３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０１】
配列番号２３４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３０２】
配列番号２３５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０３】
配列番号２３６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０４】
配列番号２３７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３０５】
配列番号２３８は、ＣＤ８ａ膜貫通ドメインである。
【０３０６】
配列番号２３９は、Ｂ７－１膜貫通細胞内ドメインである。
【０３０７】
配列番号２４０～２４５は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質において有用である例示的なグリシン－セリンリンカーである。
【０３０８】
配列番号２４６は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質において有用である例示的なリンカーである。
【０３０９】
配列番号２４７は、２Ａペプチド末端配列である。
【０３１０】
配列番号２４８は、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチドである。
【０３１１】
配列番号２４９は、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチドである。
【０３１２】
配列番号２５０は、口蹄疫ウイルス２Ａペプチドである。
【０３１３】
配列番号２５１は、例示的なフリン切断可能な２Ａペプチドである。
【０３１４】
配列番号２５２及び２５３は、ヒトＩｇＥシグナルペプチド配列である。配列番号２５４は、ヒトＩＬ－２シグナルペプチド配列である。
【０３１５】
配列番号２５５は、６×ＮＦＡＴ　ＩＬ－２最小プロモーターである。
【０３１６】
配列番号２５６は、ＮＦＡＴ応答性エレメントである。
【０３１７】
配列番号５５７は、ヒトＩＬ－２プロモーター配列である。
【０３１８】
配列番号２５８は、ヒトＩＬ－１５（Ｎ７２Ｄ変異体）である。
【０３１９】
配列番号２５９は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ－Ｓｕ／Ｆｃドメインである。
【０３２０】
配列番号２６０は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ－Ｓｕ（６５ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０３２１】
配列番号２６１は、ヒトＩＬ－１５アイソフォーム２である。
【０３２２】
配列番号２６２は、ヒトＩＬ－１５アイソフォーム１である。
【０３２３】
配列番号２６３は、ヒトＩＬ－１５（シグナルペプチドを含まない）である。
【０３２４】
配列番号２６４は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ（８５ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０３２５】
配列番号２６５は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ（１８２ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０３２６】
配列番号２６６は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファである。

【０３２７】
配列番号２６７は、ヒトＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットである。
【０３２８】
配列番号２６８は、ヒトＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットである。
【０３２９】
配列番号２６９は、ヒトＩＬ－１８である。
【０３３０】
配列番号２７０は、ヒトＩＬ－１８バリアントである。
【０３３１】
配列番号２７１は、ヒトＩＬ－２１である。
【０３３２】
配列番号２７２は、ヒトＩＬ－２である。
【０３３３】
配列番号２７３は、ヒトＣＤ４０Ｌである。
【０３３４】
配列番号２７４は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ソチガリマブ）である。
【０３３５】
配列番号２７５は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ソチガリマブ）である。
【０３３６】
配列番号２７６は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ソチガリマブ）である。
【０３３７】
配列番号２７７は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ダセツズマブ）である。
【０３３８】
配列番号２７８は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ダセツズマブ）である。
【０３３９】
配列番号２７９は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ダセツズマブ）である。
【０３４０】
配列番号２８０は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ルカツツズマブ）である。
【０３４１】
配列番号２８１は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ルカツツズマブ）である。
【０３４２】
配列番号２８２は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ルカツツズマブ）である。
【０３４３】
配列番号２８３は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（セリクレルマブ）である。
【０３４４】
配列番号２８４は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（セリクレルマブ）である。
【０３４５】
配列番号２８５は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（セリクレルマブ）である。
【０３４６】
配列番号２８６は、標的ＰＤ－１配列である。
【０３４７】
配列番号２８７は、標的ＰＤ－１配列である。
【０３４８】
配列番号２８８は、反復ＰＤ－１左反復配列である。
【０３４９】
配列番号２８９は、反復ＰＤ－１右反復配列である。
【０３５０】
配列番号２９０は、反復ＰＤ－１左反復配列である。
【０３５１】
配列番号２９１は、反復ＰＤ－１右反復配列である。

【０３５２】
配列番号２９２は、ＰＤ－１左ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０３５３】
配列番号２９３は、ＰＤ－１右ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０３５４】
配列番号２９４は、ＰＤ－１左ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０３５５】
配列番号２９５は、ＰＤ－１右ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０３５６】
配列番号２９６は、例示的なｐｉｇｇｙＢａｃ（ＰＢ）トランスポザーゼ酵素アミノ酸配列である。
【０３５７】
配列番号２９７は、例示的なＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ酵素アミノ酸配列である。
【０３５８】
配列番号２９８は、例示的な超活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ１００Ｘ）トランスポザーゼアミノ酸配列である。
【０３５９】
配列番号２９９は、Ｃｌｏ０５１ヌクレアーゼドメインアミノ酸配列である。
【０３６０】
配列番号３００は、６ＸＮＦＡＴ結合モチーフの例示的な核酸配列である。
【０３６１】
配列番号３０１は、ＩＬ－２ｍｉｎプロモーターの例示的な核酸配列である。
【０３６２】
配列番号３０２は、テザリングされたＩＬ－１２（ＴｅＩＬ－１２）である。
【０３６３】
配列番号３０３は、ＩＲＥＳの例示的な核酸配列である。
【０３６４】
配列番号３０４は、Ｕ６プロモーターの例示的な核酸配列である。
【０３６５】
配列番号３０５～配列番号３１１は、ＰＤ－１　ｓｈＲＮＡの例示的な核酸配列である。
【０３６６】
配列番号３１２は、例示的なＭｙｃポリペプチド配列である。
【０３６７】
配列番号３１３は、例示的なＭＹＣ融合タンパク質アミノ酸配列である。
【０３６８】
Ｉ．定義
他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じである。本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。
【０３６９】
本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与すること」、「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」、及び「同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ）」という用語は、対象への２つ以上の医薬品有効成分（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のＴＩＬ）の投与を包含し、医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物の両方が、対象において同時に存在するようにする。同時投与には、別々の組成物での同時投与、別々の組成物での異なる時間での投与、または２つ以上の医薬品有効成分が存在する組成物での投与が含まれる。別々の組成物での同時投与及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。
【０３７０】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。
【０３７１】
「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイには、生きている細胞または死んでいる細胞が用いられる細胞ベースのアッセイが包含され、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも含み得る。
【０３７２】
「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または器官に対する治療または処置の実施を伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／または器官は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。
【０３７３】
「急速拡張」という用語は、１週間の期間にわたって少なくとも約３倍（または４、５、６、７、８、もしくは９倍）、より好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１０倍（または２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、もしくは９０倍）、あるいは最も好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１００倍の抗原特異的ＴＩＬの数の増加を意味する。本明細書では、いくつかの急速拡張プロトコルが説明されている。
【０３７４】
本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４＋Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察される拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、バルクＴＩＬ及び拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」または「ｐｏｓｔ－ＲＥＰ　ＴＩＬ」）が含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬ細胞集団には、遺伝子修飾ＴＩＬが含まれ得る。
【０３７５】
本明細書における「細胞の集団」（ＴＩＬを含む）とは、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。一般に、集団は、概して1×10^{6}～1×10^{10}の数の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は、異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での一次ＴＩＬの初期成長は、およそ1×10^{8}細胞のバルクＴＩＬ集団をもたらす。ＲＥＰ拡張は、一般に、注入用の1.5×10^{9}～1.5×10^{10}細胞の集団を提供するために行われる。
【０３７６】
本明細書における「凍結保存されたＴＩＬ」とは、一次、バルク、または拡張（ＲＥＰ　ＴＩＬ）のいずれかのＴＩＬが、約－１５０℃～－６０℃の範囲で処理及び保管されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法は、実施例を含む本明細書の他の場所にも記載されている。明確にするために、「凍結保存されたＴＩＬ」は、一次ＴＩＬのソースとして使用される可能性のある凍結組織試料と区別することができる。
【０３７７】
本明細書における「解凍された凍結保存ＴＩＬ」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度またはＴＩＬが患者に投与され得る温度を含むがこれらに限定されない、室温以上に戻るように処理されたＴＩＬ集団を意味する。
【０３７８】
ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。追加として及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。
【０３７９】

「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｍｅｄｉａ）」または「凍結保存培地（ｃｒｙｏｐｒｅｓｅｒｖａｔｉｏｎ ｍｅｄｉｕｍ）」という用語は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地は、７％～１０％のＤＭＳＯを含む培地を含むことができる。例示的な培地には、ＣｒｙｏＳｔｏｒ ＣＳ１０、Ｈｙｐｅｒｔｈｅｒｍａｓｏｌ、及びそれらの組み合わせが含まれる。「ＣＳ１０」という用語は、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓまたはＢｉｏｌｉｆｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓから入手した凍結保存培地を指す。ＣＳ１０培地は、商品名「ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０」と称され得る。ＣＳ１０培地は、ＤＭＳＯを含む無血清の動物成分を含まない培地である。

【０３８０】

「セントラルメモリーＴ細胞」という用語は、ヒトではＣＤ４５Ｒ０＋であり、ＣＣＲ７（ＣＣＲ７高）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２高）を構成的に発現するＴ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＣＬ－６、ＢＣＬ－６Ｂ、ＭＢＤ２、及びＢＭＩ１が含まれる。セントラルメモリーＴ細胞は、ＴＣＲトリガー後、エフェクター分子としてＩＬ－２及びＣＤ４０Ｌを主に分泌する。セントラルメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ４コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例して濃縮される。

【０３８１】

「エフェクターメモリーＴ細胞」という用語は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５Ｒ０＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現を失い（ＣＣＲ７低）、ＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるかまたは低い（ＣＤ６２Ｌ低）、ヒトまたは哺乳動物Ｔ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）、及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＬＩＭＰ１が含まれる。エフェクターメモリーＴ細胞は、インターフェロンガンマ、ＩＬ－４、及びＩＬ－５を含む、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーＴ細胞は、血液中のＣＤ８コンパートメントで優勢であり、ヒトでは肺、肝臓、及び腸において比例して濃縮される。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は、大量のパーフォリンを担持する。

【０３８２】

「閉鎖系」という用語は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。細胞培養法に適した任意の閉鎖系を、本発明の方法で用いることができる。閉鎖系には、例えば、密閉Ｇ容器が含まれるが、これに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖系に付加されると、ＴＩＬを患者に投与する準備ができるまで、系は外部環境に開かれない。

【０３８３】

腫瘍を破壊するためのプロセスを説明するために本明細書で使用される「断片化すること」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍組織を破砕、スライス、分割、及び細切するなどの機械的断片化法、ならびに腫瘍組織の物理的構造を破壊するための任意の他の方法を含む。

【０３８４】

「末梢血単核細胞」及び「ＰＢＭＣ」という用語は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含む、丸い核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞として使用される場合（ＰＢＭＣは抗原提示細胞の一種である）、末梢血単核細胞は、好ましくは、放射線照射された同種異系末梢血単核細胞である。

【０３８５】

「末梢血リンパ球」及び「ＰＢＬ」という用語は、末梢血から拡張したＴ細胞を指す。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ドナーからの全血またはアフェレーシス産物から分離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋のＴ細胞表現型などのＴ細胞表現型の正または負の選択によって、ドナー由来の全血またはアフェレーシス産物から分離される。

【０３８６】
「抗ＣＤ３抗体」という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、抗体またはそのバリアント、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３及びＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローンも含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブが含まれる。
【０３８７】
「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを指し、市販の形態、例えば、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、ＭＡＣＳ ＧＭＰ ＣＤ３ ｐｕｒｅ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びムロモナブ、またはそれらのバリアント、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、またはバイオシミラーを含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表１に示す（配列番号１及び配列番号２）。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託され、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）にも寄託され、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。
【０３８８】
【表１】

表 1.ムロモナブのアミノ酸配列(例示的な OKT-3 抗体)

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 1 ムロモナブ重鎖	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG 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
配列番号 2 ムロモナブ軽鎖	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

【０３８９】
「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）という用語は、インターロイキン－２として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－２は、例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７２，３９８３－８８及びＭａｌｅｋ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，４５３－７９に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号３）。例えば、ＩＬ－２という用語は、アルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ、単回使用バイアル当たり２２００万ＩＵで複数の供給業者から市販されている）などのヒト組換えＩＬ－２形態、ならびにＣｅｌｌＧｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ，ＵＳＡ

（ＣＥＬＬＧＲＯ　ＧＭＰ）またはＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡによって市販されている組換えＩＬ－２形態（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、およそ１５ｋＤａの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えＩＬ－２形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を表２に示す（配列番号４）。ＩＬ－２という用語はまた、ペグ化ＩＬ２プロドラッグベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４、平均６個のリジン残基が［（２，７－ビス｛［メチルポリ（オキシエチレン）］カルバモイル｝－９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ］カルボニル）で置換されたＮ６である、配列番号４のようなペグ化ヒト組換えＩＬ－２）を含む、本明細書に記載のＩＬ－２のペグ化形態も包含し、Ｎｅｋｔａｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手可能であるか、または国際特許出願公開第ＷＯ２０１８／１３２４９６　Ａ１号の実施例１９に記載の方法、または米国特許出願公開第２０１９／０２７５１３３　Ａ１号の実施例１に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４）及び他のペグ化ＩＬ－２分子は、米国特許出願公開第２０１４／０３２８７９１　Ａ１号及び国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０６５０８６　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なコンジュゲートされたＩＬ－２の代替形態は、米国特許第４，７６６，１０６号、同第５，２０６，３４４号、同第５，０８９，２６１号、及び同第４，９０２，５０２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なＩＬ－２の製剤は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０３９０】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、Ｓｙｎｔｈｏｒｘ，Ｉｎｃ．から入手可能なＴＨＯＲ－７０７である。本発明での使用に好適なＴＨＯＲ－７０７及びＩＬ－２の追加の代替形態の調製ならびに特性は、米国特許出願公開第２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び同第２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン２（ＩＬ－２）コンジュゲートであり、アミノ酸残基の番号付けは配列番号５に対応する。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｒ３８及びＫ６４から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６１、Ｅ６２、及びＥ６８から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６２である。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミ

ノ酸残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－プロパルギルエトキシ－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２コンジュゲートは、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２受容体α（ＩＬ－２Ｒα）サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２Ｒαに対する結合親和性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または９９％を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、３０倍、５０倍、１００倍、２００倍、３００倍、５００倍、１０００倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２とＩＬ－２Ｒαとの結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリ（サッカライド）、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ＰＥＧを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧは、直鎖状ＰＥＧまたは分岐状ＰＥＧである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、Ｆｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＩｇＧのＦｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＸＴＥＮペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、Ｃ

ＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、複合部分は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと直接的に結合される。いくつかの実施形態では、複合部分は、リンカーを介して単離及び精製されたＩＬ－２ポリペプチドと間接的に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマント試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）ＤＳＰ、３′３′－ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（ＤＴＳＳＰ）、ジスクシンイミジルスベラート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（ＢＳ）、ジスクシンイミジルタータラート（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタータラート（スルホＤＳＴ）、エチレングリコビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）、ジスクシンイミジルグルタラート（ＤＳＧ）、Ｎ，Ｎ′－ジスクシンイミジルカーボナート（ＤＳＣ）、ジメチルアジピミデート（ＤＭＡ）、ジメチルピメリミデート（ＤＭＰ）、ジメチルスベリミデート（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３′－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）、１，４－ジ－（３′－（２′－ピリジルジチオ）プロピオンアミド）ブタン（ＤＰＤＰＢ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ハロゲン化アリール含有化合物（ＤＦＤＮＢ）、例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンまたは１，３－ジフルオロ－４，６－ジニトロベンゼン、４，４′－ジフルオロ－３，３′－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）、ビス－［β－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、ｏ－トルイジン、３，３′－ジメチルベンジジン、ベンジジン、α，α′－ｐ－ジアミノジフェニル、ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ′－エチレン－ビス（ヨードアセトアミド）、またはＮ，Ｎ′－ヘキサメチレンビス（ヨードアセトアミド）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ｓＰＤＰ）、長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＬＣ－ｓＰＤＰ）、水溶性長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（スルホ－ＬＣ－ｓＰＤＰ）、スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ｓＭＰＴ）、スルホスクシンイミジル－６－［α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ｓＭＰＴ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ｓＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ｓＩＡＢ）、スクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ｓＭＰＢ）、スルホスクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＭＰＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（ＧＭＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢ）、スクシンイミジル　６－（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＸ）、スクシンイミジル　６－［６－（（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノイル）アミノ］ヘキサノエート（ｓｌＡＸＸ）、スクシンイミジル　４－（（（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニル　ヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（

Ｍ２Ｃ２Ｈ）、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンズアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ｐ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ）、スルホスクシンイミジル　２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル　７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ｐ－ニトロフェニル　ジアゾピルベート（ｐＮＰＤＰ）、ｐ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、１－（ρ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ｐ－アジドベンゾイル　ヒドラジド（ＡＢＨ）、４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチルアミン（ＡｓＢＡ）、またはｐ－アジドフェニル　グリオキサール（ＡＰＧ）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でジペプチドリンカーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｌａ、またはＶａｌ－Ｌｙｓを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、マレイミドカプロイル（ｍｃ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２コンジュゲートの血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ＩＬ－２コンジュゲートの血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、本明細書に記載のＩＬ－２形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、米国特許出願公開第２０２０／０１８１２２０　Ａ１号及び米国特許出願公開第２０２０／０３３０６０１　Ａ１号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２コンジュゲートであり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ

７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して１残基のＮ末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＩＬ－２Ｒアルファ鎖会合を欠いているが、中間親和性ＩＬ－２Ｒベーターガンマシグナル伝達複合体との正常な結合を保持している。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２コンジュゲートであり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２コンジュゲートであり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２コンジュゲートであり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５と少なくとも９８％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５位、Ｆ４２位、Ｆ４４位、Ｋ４３位、Ｅ６２位、Ｐ６５位、Ｒ３８位、Ｔ４１位、Ｅ６８位、Ｙ４５位、Ｖ６９位、またはＬ７２位でアミノ酸を置換する。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＡＬＫＳ－４２３０（配列番号６）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（６０ＧＧ６１）を介してヒトインターロイキン２断片（６２－１３２）と融合し、ペプチジルリンカー（１３３ＧＳＧＧＧＳ１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖断片（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン２断片（１－５９）、バリアント（Ｃｙｓ１２５＞Ｓｅｒ５１）；Ｇ２ペプチドリンカー（６０－６１）を介してヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（４－７４）－ペプチド（６２－１３２）と融合し、ＧＳＧ３Ｓペプチドリンカー（１３３－１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖（ＩＬ２Ｒサブユニットアルファ、ＩＬ２Ｒα、ＩＬ２ＲＡ）（１－１６５）－ペプチド（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で産生され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（７５－１３３）－ペプチド［Ｃｙｓ１２５（５１）＞Ｓｅｒ］－変異体（１－５９）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号６に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：３１－１１６、１４１－２８５、１８４－２４２、２６９－３０１、１６６－１９７、または１６６－１９９、１６８－１９９または１６８－１９７（配列番号６の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号６の番号付けを使用する、Ｎ１８７、Ｎ２０６、Ｔ２１２。ネムバルイキン　アルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のＩＬ－２は、米国特許出願公開第２０２１／００３８６８４　Ａ１号及び米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９０％の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６で示されるアミ

ノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他のＩＬ－２形態は、米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択で、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第２の融合パートナーと連結された第１の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第１の融合パートナーは、ＩＬ－１Ｒα、またはＩＬ－１Ｒαと少なくとも９８％のアミノ酸配列同一性を有し、ＩＬ－Ｒαの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第２の融合パートナーは、Ｆｃ領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号８、または配列番号８と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第２の融合パートナーとの第１の融合パートナーの融合と比較して改善される。

【０３９２】

【表２－１】

表 2.インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 3 組換えヒト IL-2(rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号 5 IL-2 形態	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 6 ネムバロイキンアルファ	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG 60 GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE 120 LKPLEEVLNL AQGSGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL 180 YMLCTGNSSE SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG 240 HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI 300 CTG 303

【表２－２】

配列番号 7 IL-2 形態	MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG 60 PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGDETR LQLEAVNITD LSENRKQDKR 120 FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQEDESGSGG 180 ASSESSASSD GPEPVITESR ASSESSASSD GPEPVITESR EPKSSDKTET CPPCPAPELL 240 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR 360 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS 420 RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK 452
配列番号 8 ムチンドメイン ポリペプチド	SESSASSDGP EPVITP 16
配列番号 9 組換えヒト IL-4 (rhIL-4)	MEKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
配列番号 10 組換えヒト IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
配列番号 11 組換えヒト IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
配列番号 12 組換えヒト IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

【０３９３】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、米国特許出願公開第２０２０／０

２７０３３４　Ａ１号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させ、抗体は、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラスの軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラスの重鎖、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖からなる群から選択されるＩｇＧクラスの重鎖及びＩｇＧクラスの軽鎖をさらに含む。

【０３９４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＨのＨＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＨのＨＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＨのＨＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＬのＬＣＤＲ１に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＬのＬＣＤＲ２に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子またはその断片は、ＶＬのＬＣＤＲ３に移植され、ＩＬ－２分子は、ムテインである。

【０３９５】

ＩＬ－２分子の挿入は、ＣＤＲのＮ末端領域もしくはその近く、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ２配列はＣＤＲ配列をフレームシフトしない。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、ＣＤＲに組み込まれたＩＬ－２分子を含み、ＩＬ－２配列はＣＤＲ配列のすべてまたは一部を置き換える。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲのＮ末端領域、ＣＤＲの中間領域、またはＣＤＲのＣ末端領域もしくはその近くであり得る。ＩＬ－２分子による置き換えは、ＣＤＲ配列のわずか１個もしくは２個のアミノ酸、またはＣＤＲ配列全体であり得る。

【０３９６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーなしで、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に追加のアミノ酸なしで、ＣＤＲに直接的に移植される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２分子は、ペプチドリンカーを用いて、ＣＤＲ配列とＩＬ－２配列との間に１つ以上の追加のアミノ酸を伴って、ＣＤＲに間接的に移植される。

【０３９７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＩＬ－２分子は、ＩＬ－２ムテインである。いくつかの事例では、ＩＬ－２ムテインは、Ｒ６７Ａ置換を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、配列番号１４または配列番号１５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号の表１のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１６、配列番号１９、配列番号２２及び配列番号２５からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号７、配列番号１０、配列番号１３及び配列番号１６からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１７、配列番号２０、配列番号２３、及び配列番号２６からなる群から選択されるＨＣＤＲ２からなる群から選択

されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１８、配列番号２１、配列番号２４、及び配列番号２７からなる群から選択されるＨＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むＶＨ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２８のアミノ酸配列を含むＶＨ領域及び配列番号３６のアミノ酸配列を含むＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３９のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３８のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３７のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号３８のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号３９のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、米国特許出願公開第２０２０／０２７０３３４　Ａ１号のＩｇＧ．ＩＬ２Ｆ７１Ａ．Ｈ１もしくはＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１、またはそのバリアント、誘導体、もしくは断片、またはその保存的アミノ酸置換体、またはそれと少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９８％の配列同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質の抗体成分は、免疫グロブリン配列、フレームワーク配列、またはパリビズマブのＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキンまたは同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、表３に記載される配列を有する。

【０３９９】

【表３－１】

表 3:例示的なパリビズマブ抗体-IL-2 移植タンパク質の配列

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
配列番号 14 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 15 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
配列番号 17 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 18 HCDR3	SMITNWYFDV 10
配列番号 19 HCDR1_IL-2 カバット	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
配列番号 20 HCDR2 カバット	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 21 HCDR3 カバット	SMITNWYFDV 10

【表３－２】

配列番号 22 HCDR1_IL-2 クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142	60 120
配列番号 23 HCDR2 クロチア	WWDDK	5
配列番号 24 HCDR3 クロチア	SMITNWYFDV 10	
配列番号 25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143	60 120
配列番号 26 HCDR2 IMGT	IWWDDKK	7
配列番号 27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12	
配列番号 28 V_H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSS 253	6 120 180 240

【表３－３】

配列番号 29 重鎖	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 533
配列番号 30 LCDR1 カバット	KAQLSVGYMH 10
配列番号 31 LCDR2 カバット	DTSKLAS 7
配列番号 32 LCDR3 カバット	FQGSGYPFT 9
配列番号 33 LCDR1 クロチア	QLSVGY 6
配列番号 34 LCDR2 クロチア	DTS 3
配列番号 35 LCDR3 クロチア	GSGYPF 6
配列番号 36 V_L	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106
配列番号 37 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号 38 軽鎖	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH 360 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 420 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR 480 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF 540 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 583
配列番号 39 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213

【０４００】

「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）という用語は、インターロイキン４として知られるサイトカインを指し、これは、Ｔｈ２　Ｔ細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって産生される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Ｓｔｅｉｎｋｅ　ａｎｄ　Ｂｏｒｉｓｈ，Ｒｅｓｐｉｒ．Ｒｅｓ．２００１，２，６６－７０。ＩＬ－４によって活性化されると、Ｔｈ２　Ｔ細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４は、Ｂ細胞増殖及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現も刺激し、Ｂ細胞からのＩｇＥ及びＩｇＧ１発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ

－４は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２１１）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＣＴＰ００４３）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号９）。

【０４０１】

「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）という用語は、インターロイキン７として知られるグリコシル化組織由来のサイトカインを指し、これは、間質細胞及び上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Ｆｒｙ　ａｎｄ　Ｍａｃｋａｌｌ，Ｂｌｏｏｄ　２００２，９９，３８９２－９０４。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発達を刺激することができる。ＩＬ－７は、ＩＬ－７受容体アルファ及び共通ガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合し、これは、胸腺内でのＴ細胞発生及び末梢内での生存に重要な一連のシグナルである。本発明での使用に適した組換えヒトＩＬ－７は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２５４）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＰＨＣ００７１）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１０）。

【０４０２】

「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）という用語は、インターロイキン－１５として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－１５は、例えば、Ｆｅｈｎｉｇｅｒ　ａｎｄ　Ｃａｌｉｇｉｕｒｉ，Ｂｌｏｏｄ　２００１，９７，１４－３２に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－１５は、β及びγシグナル伝達受容体サブユニットをＩＬ－２と共有する。組換えヒトＩＬ－１５は、１２．８ｋＤａの分子量を有する１１４個のアミノ酸（及びＮ末端メチオニン）を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－１５は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２３０－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号３４－８１５９－８２）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１１）。

【０４０３】

「ＩＬ－１８」という用語（本明細書では「インターロイキン１８」、「ＩＬ１８」、「ＩＧＩＦ」、「ＩＬ－１ｇ」、「インターフェロン－ガンマ誘導因子」、または「ＩＬ１Ｆ４」とも称される）は、ＩＬ－１８遺伝子（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２４３２１１、ＮＭ＿００１５６２及びＮＭ＿００１３８６４２０）によってコードされるヘテロ二量体サイトカインである、インターロイキンを指す。ＩＬ－１βと構造的に類似するＩＬ－１８は、サイトカインのＩＬ－１スーパーファミリーのメンバーである。多くのヒトリンパ球及び非リンパ球細胞によって発現されるこのサイトカインは、炎症プロセスにおいて重要な役割を果たす。ＩＬ－１２と組み合わせたＩＬ－１８は、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）、ならびにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を活性化して、ＩＦＮ－γを産生することができ、したがって、腫瘍免疫に寄与する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－１８は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。

【０４０４】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１８は、全長ＩＬ－１８

、ＩＬ－１８の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１８は、ヒトＩＬ－１８またはバリアントヒトＩＬ－１８である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１８は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１８バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１８は、野生型ＩＬ－１８と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１８は、表２１のアミノ酸配列を有する。

【０４０５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。図３４は、ＩＬ－１８に連結されたＮＦＡＴプロモーターの配列を示す。

【０４０６】

「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）という用語は、インターロイキン－２１として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２１のすべての形態を含む。ＩＬ－２１は、例えば、Ｓｐｏｌｓｋｉ ａｎｄ Ｌｅｏｎａｒｄ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃ．２０１４，１３，３７９－９５に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－２１は、主にナチュラルキラーＴ細胞及び活性化ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞によって産生される。組換えヒトＩＬ－２１は、１５．４ｋＤａの分子量を有する１３２個のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトＩＬ－２１は、ＰｒｏＳｐｅｃ－ＴａｎｙＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－４０８－ｂ）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－２１組換えタンパク質、カタログ番号１４－８２１９－８０）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号１２）。

【０４０７】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び健康状態の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。一般に、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬまたは遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球）は、体重１ｋｇ当たり１０４～10^{11}細胞（例えば、体重１ｋｇ当たり10^{5}～10^{6}、10^{5}～10^{10}、10^{5}～10^{11}、10^{6}～10^{10}、10^{6}～10^{11}、10^{7}～10^{11}、10^{7}～10^{10}、10^{8}～10^{11}、10^{8}～10^{10}、10^{9}～10^{11}、または10^{9}～10^{10}細胞）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物もまた、これらの投与量で複数回投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子操作したＴＩＬを含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，New Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．１９８８，３１９，１６７６を参照）。特定の患者に最適な投薬量及び治療レジーム（ｒｅｇｉｍｅ）は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜治療を調整することによって、医学分野の技術者によって容易に決定され得る。

【０４０８】

「血液学的悪性腫瘍」、「血液系悪性腫瘍」という用語または相関する意味の用語は、血液、骨髄、リンパ節、及びリンパ系の組織を含むが、これらに限定されない、哺乳動物の造血組織及びリンパ組織のがん及び腫瘍を指す。血液学的悪性腫瘍は、「液体腫瘍」とも称される。血液学的悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、多発性骨髄腫、急性単球性白血病（ＡＭｏＬ）、ホジキンリンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫が含まれ得るが、これらに限定されない。「Ｂ細胞血

液学的悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞を冒す血液学的悪性腫瘍を指す。

【０４０９】

「液体腫瘍」という用語は、本来流体である異常な細胞塊を指す。液体腫瘍癌には、白血病、骨髄腫、及びリンパ腫、ならびに他の血液学的悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。液体腫瘍から取得されたＴＩＬは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）とも称され得る。末梢血中で循環する液体腫瘍を含む液体腫瘍から得られるＴＩＬは、本明細書ではＰＢＬとも称され得る。ＭＩＬ、ＴＩＬ、及びＰＢＬという用語は、本明細書で互換的に使用され、細胞が由来する組織タイプに基づいてのみ異なる。

【０４１０】

本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形もしくは血液学的腫瘍微小環境、または微小環境内の細胞の個々のサブセットを指し得る。本明細書で使用される腫瘍微小環境は、Ｓｗａｒｔｚ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２０１２，７２，２４７３に記載されるように、「腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍成長及び浸潤を支持し、腫瘍を宿主免疫から保護し、治療抵抗性を助長し、かつ優勢な転移を成功させるニッチを提供する、細胞、可溶性因子、シグナル伝達分子、細胞外マトリックス、及び機械的手がかり」の複合混合物を指す。腫瘍はＴ細胞によって認識されるべき抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍クリアランスはまれである。

【０４１１】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団が提供され得、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本発明による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【０４１２】

実験的発見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

【０４１３】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患治療を含むが、これに限定されない、意図された用途を達成するのに十分である、本明細書に記載の化合物または化合物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途（インビトロもしくはインビボ）、または治療される対象及び病状（例えば、対象の体重、年齢、及び性別）、病状の重症度、または投与方法に応じて異なり得る。この用語は、標的細胞において特定の応答（例えば、血小板粘着及び／または細胞遊走の低減）を誘導する用量にも適用される。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投薬レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるか、投与のタイミング、それが投与される組織、及び化合物が運ばれる物理的送達系に応じて異なる。

【０４１４】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（ａ）疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていな

い対象に疾患が生じるのを予防すること、（ｂ）疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または１つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

【０４１５】

「異種」という用語は、核酸またはタンパク質の一部に関して使用される場合、核酸またはタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には、組換え的に産生され、新たな機能的核酸、例えば、ある供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコード領域、または異なる供給源からのコード領域を作製するように配置された無関係の遺伝子由来の２つ以上の配列を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない２つ以上の部分配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

【０４１６】

２つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「同一性パーセント」、及び「配列同一性パーセント」（もしくはそれらの同義語、例えば「９９％同一」）という用語は、同じであるか、または配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大一致のために比較し整列させた場合（必要に応じてギャップを導入する）、特定のパーセンテージの同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する２つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列同一性パーセントの決定に好適なプログラムには、例えば、米国政府の国立生物工学情報センターのＢＬＡＳＴウェブサイトから入手可能なＢＬＡＳＴプログラム一式が含まれる。２つの配列間の比較は、ＢＬＡＳＴＮまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して実行することができる。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するために使用され、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用される。ＤＮＡＳＴＡＲから入手可能なＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、またはＭｅｇＡｌｉｇｎは、配列を整列させるために使用することができる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者であれば、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントに適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

【０４１７】

本明細書で使用される場合、「バリアント」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内または隣接する特定の位置における１つ以上の置換、欠失、及び／または付加により参照抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む抗体または融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。バリアントは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電したまたは非荷電のアミノ酸の置換を含み得る。バリアントは、参照抗体の抗原に特異的に結合する能力を保持している。バリアントという用語は、ペグ化抗体またはタンパク質も含む。

【０４１８】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４＋Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細

書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察されるように拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクＴＩＬ、拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）、ならびに「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」が含まれるが、これらに限定されない。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡張ＴＩＬまたは第２の追加の拡張ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図８のステップＤに記載されているものなど）を含み得る。

【０４１９】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。追加として、及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。ＴＩＬは、効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（ＩＦＮ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。例えば、インターフェロン（ＩＦＮγ）放出が、約５０ｐｇ／ｍＬを超える、約１００ｐｇ／ｍＬを超える、約１５０ｐｇ／ｍＬを超える、または約２００ｐｇ／ｍＬを超える、約３００ｐｇ／ｍＬを超える、約４００ｐｇ／ｍＬを超える、約５００ｐｇ／ｍＬを超える、約６００ｐｇ／ｍＬを超える、約７００ｐｇ／ｍＬを超える、約８００ｐｇ／ｍＬを超える、約９００ｐｇ／ｍＬ、約１０００ｐｇ／ｍＬを超える場合、ＴＩＬは強力であるとみなされ得る。

【０４２０】

「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然及び合成の、未修飾及び修飾デオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、及び／またはオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド間の連結への変更が含まれる。

【０４２１】

「ＲＮＡ」という用語は、少なくとも１つのリボヌクレオチド残基を含む分子を定義する。「リボヌクレオチド」という用語は、ｂ－Ｄ－リボフラノース部分の２′位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを定義する。ＲＮＡという用語には、二本鎖ＲＮＡ、一本鎖ＲＮＡ、部分的に精製されたＲＮＡなどの単離されたＲＮＡ、本質的に純粋なＲＮＡ、合成ＲＮＡ、組換え的に産生されたＲＮＡ、ならびに１つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、及び／または変化によって天然に存在するＲＮＡとは異なる変化したＲＮＡが含まれる。本明細書に記載のＲＮＡ分子のヌクレオチドはまた、非天然に存在するヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含み得る。これらの変化したＲＮＡは、類似体または天然に存在するＲＮＡの類似体と称され得る。

【０４２２】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むよう意図されている。医薬品有効成分のためのかかる薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が医薬品有効成分と適合しない場合を除いて、本発明の治療用組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の医薬品有効成分を、記載された組成物及び方法に組み込むこともできる。

【０４２３】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の１桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、なおより好ましくは１０％以内、さらにより好ましくは５％以内であり得る。「約」

または「およそ」という用語によって包含される許容偏差は、研究中の特定の系に依存し、当業者によって容易に理解され得る。さらに、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、ならびに他の量及び特徴が正確でなく、かつ正確である必要はないが、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、必要に応じて、およそであってもよく、及び／またはそれよりも大きくても小さくてもよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

【０４２４】

添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語は、元の形式及び補正された形式で、存在する場合、列挙されていない追加のクレーム要素またはステップが特許請（複数可）求の範囲から除外されるかに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的または自由形式であるよう意図されており、いずれの追加の列挙されていない要素、方法、ステップ、または材料も除外しない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で指定されたもの以外のいずれの要素、ステップ、または材料も除外し、後者の場合、指定された材料（複数可）に通常関連する不純物も除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定の要素、ステップ、または材料（複数可）、及び特許請求された本発明の基本的及び新規の特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載のすべての組成物、方法、及びキットは、代替の実施形態では、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語のうちのいずれかによってより具体的に定義され得る。

【０４２５】

「抗体」及びその複数形の「抗体」という用語は、免疫グロブリン全体及び任意の抗原結合断片（「抗原結合部分」）またはその一本鎖を指す。「抗体」はさらに、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも２つの重鎖（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではＶＨと略される）及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３の３つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではＶＬと略される）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメイン、ＣＬで構成される。抗体のＶＨ及びＶＬ領域は、相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域（ＨＶＲ）と称され、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が点在し得る、超可変性の領域にさらに細分化することができる。各ＶＨ及びＶＬは、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配列された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲで構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。重鎖及び軽鎖の可変領域は、１つまたは複数の抗原エピトープと相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第１の成分（Ｃｌｑ）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【０４２６】

「抗原」という用語は、免疫応答を誘導する物質を指す。いくつかの実施形態では、抗原は、主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）分子によって提示される場合、抗体またはＴＣＲによって結合されることができる分子である。本明細書で使用される「抗原」という用語はまた、Ｔ細胞エピトープを包含する。抗原は、追加として免疫系によって認識されることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導することができ、Ｂリンパ球及び／またはＴリンパ球の活性化につながる。場合によっては、これは、抗原がＴｈ細胞エピトープを含むか、またはそれに結合されることを必要とし得る。抗原はまた、１つ以上のエピトープ（例えば、Ｂ－及びＴ－エピトープ）を有し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、好ましくは、典型的には非常に特異的

かつ選択的な方法で、対応する抗体またはＴＣＲと反応し、他の抗原によって誘導され得る多数の他の抗体またはＴＣＲとは反応しない。

【０４２７】

「モノクローナル抗体」、「ｍＡｂ」、「モノクローナル抗体組成物」という用語、またはそれらの複数形は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。特定の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、試験対象に好適な抗原を注入し、次いで、所望の配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離するという当該技術分野における知識及び技術を使用して作製することができる。モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるＤＮＡの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、ＤＮＡは、発現ベクターに入れられ、次いで、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を取得することができる。抗体の組換え産生については、以下でより詳細に説明する。

【０４２８】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片である、Ｆａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された２つのＦａｂ断片を含む二価断片である、Ｆ（ａｂ′）２断片、（ｉｉｉ）ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）ＶＨまたはＶＬドメインからなり得るドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９，３４１，５４４－５４６）、ならびに（ｖｉ）単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。Ｆｖ断片の２つのドメイン、ＶＬ及びＶＨは、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え方法を使用して、ＶＬ及びＶＨ領域が対合して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９８８，２４２，４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１９８８，８５，５８７９－５８８３）を参照されたい。かかるｓｃＦｖ抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖタンパク質ドメインは、ＶＨ部分及びＶＬ部分を含む。ｓｃＦｖ分子は、ＶＬドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、ＶＬ－Ｌ－ＶＨ、またはＶＨドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、ＶＨ－Ｌ－ＶＬのいずれかとして示される。ｓｃＦｖ分子を作製し、好適なペプチドリンカーを設計するための方法は、米国特許第４，７０４，６９２号、米国特許第４，９４６，７７８号、Ｒ．Ｒａａｇ　ａｎｄ　Ｍ．Ｗｈｉｔｌｏｗ，“Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｈａｉｎ　Ｆｖｓ．”ＦＡＳＥＢ　Ｖｏｌ　９：７３－８０（１９９５）及びＲ．Ｅ．Ｂｉｒｄ　ａｎｄ　Ｂ．Ｗ．Ｗａｌｋｅｒ，Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｈａｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｒｅｇｉｏｎｓ，ＴＩＢＴＥＣＨ，Ｖｏｌ　９：１３２－１３７（１９９１）に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４２９】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク及びＣＤＲ領域の両

方が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことを意図している。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域はまた、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異）。本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含むことを意図しない。

【０４３０】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワーク領域及びＣＤＲ領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。いくつかの実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから取得されたＢ細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【０４３１】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作成、または単離されるすべてのヒト抗体、例えば（ａ）ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下でさらに説明される）についてトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（マウスなど）から単離された抗体、（ｂ）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（ｃ）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、及び（ｄ）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のＤＮＡ配列にスプライシングすることを含む、任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワーク及びＣＤＲ領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトＩｇ配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され得、したがって、組換え抗体のＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系ＶＨ及びＶＬ配列に由来し、関連しているが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に自然に存在しない可能性がある配列である。

【０４３２】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【０４３３】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と交換可能に使用される。

【０４３４】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、抗体と別の医薬品有効成分または抗体とのコンジュゲートを含む、ヒト抗体の任意の修飾形態を指す。「コンジュゲート」、「抗体薬物コンジュゲート」、「ＡＤＣ」、または「免疫コンジュゲート」という用語は、別の治療部分にコンジュゲートされた抗体またはその断片を指し、これは当該技術分野において使用可能な方法を使用して、本明細書に記載の抗体にコンジュゲートされ得る。

【０４３５】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、及び「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超

可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の１５超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的すべてを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ１９８６，３２１，５２２－５２５、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ１９８８，３３２，３２３－３２９、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１９９２，２，５９３－５９６を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能及び／またはＦｃＲ結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のＦｃバリアントを用いるように修飾され得る。Ｆｃバリアントは、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ１９８８／０７０８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９６／１４３３９Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／０５７８７Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／２３２８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９９／５１６４２Ａ１号、同第ＷＯ９９／５８５７２Ａ１号、同第ＷＯ２０００／０９５６０Ａ２号、同第ＷＯ２０００／３２７６７Ａ１号、同第ＷＯ２０００／４２０７２Ａ２号、同第ＷＯ２００２／４４２１５Ａ２号、同第ＷＯ２００２／０６０９１９Ａ２号、同第ＷＯ２００３／０７４５６９Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０１６７５０Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０２９２０７Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０３５７５２Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０６３３５１Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０７４４５５Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０９９２４９Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０４０２１７Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０７０９６３Ａ１号、同第ＷＯ２００５／０７７９８１Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０９２９２５Ａ２号、同第ＷＯ２００５／１２３７８０Ａ２号、同第ＷＯ２００６／０１９４４７Ａ１号、同第ＷＯ２００６／０４７３５０Ａ２号、及び同第ＷＯ２００６／０８５９６７Ａ２号、ならびに米国特許第５，６４８，２６０号、同第５，７３９，２７７号、同第５，８３４，２５０号、同第５，８６９，０４６号、同第６，０９６，８７１号、同第６，１２１，０２２号、同第６，１９４，５５１号、同第６，２４２，１９５号、同第６，２７７，３７５号、同第６，５２８，６２４号、同第６，５３８，１２４号、同第６，７３７，０５６号、同第６，８２１，５０５号、同第６，９９８，２５３号、及び同第７，０８３，７８４号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか１つを含み得る。

【０４３６】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が１つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことを意図している。

【０４３７】

「二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬまたはＶＬ－ＶＨ）中に軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。同じ鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、２つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第４０４，０９７号、国際特許公開第ＷＯ９３／１１１６１号、及びＢｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１９９３，９０，６４４４－６４４８においてより完全に記載されている。

【０４３８】

「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グ

リコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、１つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、１つ以上のアミノ酸置換を行い、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第５，７１４，３５０号及び同第６，３５０，８６１号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める可能性がある。追加としてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分ＧｌｃＮａｃ構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８（アルファ（１，６）フコシルトランスフェラーゼ）を欠く。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９　ＦＵＴ８－／－細胞株は、２つの置換ベクターを使用したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞中のＦＵＴ８遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第２００４／０１１０７０４号またはＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００４，８７，６１４－６２２を参照）。別の例として、欧州特許第１，１７６，１９５号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ１，６結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のＦｃ領域に結合するＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株ＹＢ２／０（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６６２）についても説明している。国際特許公開第ＷＯ０３／０３５８３５号は、フコースをＡｓｎ（２９７）結合型炭水化物に付着させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリアントＣＨＯ細胞株、Ｌｅｃ１３細胞について説明している（Ｓｈｉｅｌｄｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００２，２７７，２６７３３－２６７４０も参照）。国際特許公開第ＷＯ９９／５４３４２号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示し、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす、細胞株について記載している（Ｕｍａｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９９９，１７，１７６－１８０も参照）。代替的に、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切断でき得る。例えば、フコシダーゼアルファ－Ｌ－フコシダーゼは、Ｔａｒｅｎｔｉｎｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７５，１４，５５１６－５５２３に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

【０４３９】

「ペグ化」は、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（Ｃ１～Ｃ１０）アルコキシ－もしくはアリールオキシ－ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール－マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているＰＥＧの形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される

抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第０１５４３１６号及び同第０４０１３８４号、ならびに米国特許第５，８２４，７７８号（各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

【０４４０】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照バイオ製品と非常に類似しており、製品の安全性、純度、及び効力に関してバイオ製品と参照製品との間に臨床的に意味のある差異がない、バイオ製品を意味する。さらに、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。バイオ製品またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照ＩＬ－２タンパク質がアルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ）である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁（ＥＭＡ）によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正されたＲｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ ７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ ２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ ７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ ２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。既に認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称されることがある。バイオシミラーとみなされる製品に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関するＣＨＭＰガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む製品固有のガイドラインは、ＥＭＡによって製品毎に提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、ＥＭＡによって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品（ＥＥＡ認可されていない「コンパレーター」）と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究及びインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、ＥＥＡ認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合部分）、及び融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾（例えば、アミノ酸の欠失、付加、及び／または置換を含む）を有するアミノ酸配列を有し得る。バイオシミラーは、その参照医薬品のアミノ酸配列に対して９７％以上、例えば、９７％、９８％、９９％、ま

たは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性及び／または有効性の変化をもたらさないならば、１つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。追加として、バイオシミラーは、医薬品の安全性及び有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、製剤、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（ＰＫ）及び／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、ＥＭＡなどの規制当局によって類似のバイオ製品としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

【０４４１】

ＩＩ　．Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製造プロセス

これらの特徴のうちのいくつかを含む、Ｇｅｎ２として知られる（プロセス２Ａとしても知られる）ＴＩＬプロセスの例示的なファミリーが、図１及び２に示される。Ｇｅｎ２の実施形態を図２に示す。

【０４４２】

本明細書で考察されるように、本発明は、患者への移植前に凍結保存されたＴＩＬを再刺激して、それらの代謝活性、ひいては相対的健康を向上させることに関するステップ、及び当該代謝健康を試験する方法を含み得る。本明細書で一般に概説されるように、ＴＩＬは、一般に、患者試料から採取され、患者への移植前にそれらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。

【０４４３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０４４４】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセス、ならびに図１にステップＡとして示されるプロセスを含む）は、３～１４日に短縮され、第２の拡張（ＲＥＰと称されるプロセス、ならびに図１にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張（例えば、図１にステップＢとして記載される拡張）は、１１日に短縮され、第２の拡張（例えば、図１にステップＤとして記載される拡張）は、１１日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第１の拡張と第２の拡張との組み合わせ（例えば、図１にステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）は、２２日に短縮される。

【０４４５】

以下の「ステップ」表記Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図１を参照し、本明細書に記載のある特定の実施形態を参照する。以下及び図１におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【０４４６】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、本明細書

に概説されるように再刺激され、任意選択でＴＩＬ健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０４４７】

患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変サンプリングが使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変サンプリングを含む（すなわち、患者の１つ以上の腫瘍部位及び／または場所、ならびに同じ場所または近接した１つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から得られる。固形腫瘍は、皮膚組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、黒色腫から取得される。

【０４４８】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８ｍｍ^{3}の小片に断片化され、約２～３ｍｍ^{3}が特に有用である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタミン酸、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％ CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０４４９】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【０４５０】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ＨＢＳＳなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【０４５１】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９．２ＰＺ Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、

約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【０４５３】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【０４５４】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは可変であり、濃度を決定する必要があり得る。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ストックの濃度を検証することができる。いくつかの実施形態では、消化カクテルに添加される酵素の最終量は、決定されたストック濃度に基づいて調整される。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍＬの無菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３μＬのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【０４５６】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【０４５７】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。
【０４５８】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。
【０４５９】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０４６０】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０４６１】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【０４６２】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０４６３】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【０４６４】
一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。
【０４６５】
いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、患者から取得された腫瘍試料を消化または断片化することから取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養され得る。
【０４６６】
腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図１に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、１０、２０、３０、４０個またはそれ以上の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、３０または４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態で

は、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７ｍｍ^{3}の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００ｍｍ^3～約１５００ｍｍ^{3}の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～１０ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～８ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。

【０４６８】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小化するために切除される。

【０４６９】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０４７０】

いくつかの実施形態では、第１の拡張ステップの前に採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０４７１】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意選択で凍結され、ステップＢに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明され、図１及

び図８にも例示される。
【０４７２】
１．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ
いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０４７３】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。開示される方法が胸水を利用するいくつかの実施形態では、同じ方法が、ＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で行われてもよい。
【０４７４】
いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。
【０４７５】
いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時

間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０４７６】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【０４７７】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、さらなる処理で使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで使用することができる。

【０４７８】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解系は市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解系には、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）系、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）系、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩ系（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウム系が含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解系は、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【０４７９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【０４８０】

Ｂ．ステップＢ：第１の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、若いＴＩＬを得ることを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１

３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８１】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図１に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図５及び／または図６に例示されるようにプロセス１Ｃと称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０４８２】

例えば、図１のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に３～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、７～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約１１日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}バルクＴＩＬ細胞を生じる。

【０４８３】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載の初期バルクＴＩＬ拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前と称されるプロセスを含み得る、図１のステップＢに記載のものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載の第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意の凍

結保存、続いて以下及び本明細書に記載の第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。

【０４８４】

ＴＩＬ培養物が２４ウェルプレートで開始されるいくつかの実施形態では、例えば、Ｃｏｓｔａｒ　２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）を使用して、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ、Ｃｈｉｒｏｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中の1×10^6個の腫瘍消化細胞または１つの腫瘍断片を、各ウェルに播種することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約$1mm^3$～$10mm^3$である。

【０４８５】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭＨｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ　１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び$10cm^2$ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始されるいくつかの実施形態では、各フラスコに、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の10×10^6個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を装填した。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％　CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。

【０４８６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【０４８７】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ　ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ　Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０４８８】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｅｒｕｍ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－

バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ａｇ＋、Ａｌ３＋、Ｂａ２＋、Ｃｄ２＋、Co_2＋、Ｃｒ３＋、Ｇｅ４＋、Ｓｅ４＋、Ｂｒ、Ｔ、Ｍｎ２＋、Ｐ、Ｓｉ４＋、Ｖ５＋、Ｍｏ６＋、Ｎｉ２＋、Ｒｂ＋、Ｓｎ２＋、及びＺｒ４＋を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０４８９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０４９０】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０４９１】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０４９２】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆ

ｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態

では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０４９３】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【０４９４】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０４９５】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ａｇ＋、Ａｌ３＋、Ｂａ２＋、Ｃｄ２＋、Co_2＋、Ｃｒ３＋、Ｇｅ４＋、Ｓｅ４＋、Ｂｒ、Ｔ、Ｍｎ２＋、Ｐ、Ｓｉ４＋、Ｖ５＋、Ｍｏ６＋、Ｎｉ２＋、Ｒｂ＋、Ｓｎ２＋、及びＺｒ４＋を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダ

ルベッコ培地からなる群から選択される。

【０４９６】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０４９７】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、以下の表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０４９８】

【表４】

表 4:非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメント中の好ましい実施形態 (mg/L) (約)	1×培地中の濃度範囲(mg/L) (約)	1×培地中の好ましい実施形態(mg/L) (約)
グリシン	150	5-200	53
L-ヒスチジン	940	5-250	183
L-イソロイシン	3400	5-300	615
L-メチオニン	90	5-200	44
L-フェニルアラニン	1800	5-400	336
L-プロリン	4000	1-1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1-45	15
L-セリン	800	1-250	162
L-スレオニン	2200	10-500	425
L-トリプトファン	440	2-110	82
L-チロシン	77	3-175	84
L-バリン	2400	5-500	454
チアミン	33	1-20	9
還元型グルタチオン	10	1-20	1.5
アスコルビン酸-2-PO_4(Mg 塩)	330	1-200	50
トランスフェリン(鉄飽和)	55	1-50	8
インスリン	100	1-100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX(登録商標)I	83,000	5000-50,000	12,500

【０４９９】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【０５００】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０５０１】
いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。
【０５０２】
腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、ＡＰＣ細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬは、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６$\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例５に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。
【０５０３】
いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍ

ＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０５０４】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０５０５】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗ＣＤ３アゴニスト抗体、例えば、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【０５０６】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合

わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【０５０７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０５０８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始されるいくつかの実施形態では、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％　ＣＯ$_2$中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日毎に交換した。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例１を参照されたい。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【０５０９】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）プロセスは、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、実施例で考察され、かつ図４及び図５に示されるように、例えば、図１のステップＢに記載される拡張も含む、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、例えば、図１のステップＢに記載される拡張において考察されるように、１１日に短縮される。

【０５１０】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１２日～１４日間続行する

ことができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日間続行することができる。

【０５１１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１よる、かつ本明細書に記載されるステップＢのプロセス中を含む、第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１による、かつ本明細書に記載されるステップＢのプロセス中に含まれ得る。

【０５１２】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセスを含む、例えば、図１によるステップＢ）プロセスは、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、１１日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張、例えば、図１によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０５１３】

１．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０５１４】

代替的に、ＴＩＬの急速拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれ、後者は、多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０５１５】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように

、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中に培養培地で使用されてもよい。

【０５１６】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡張から第２の拡張へと移行

いくつかの事例では、例えば、図１に示されるステップＢから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡張から取得されたＴＩＬ集団は、以下で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）に供され、その後、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）または第２のＴＩＬ集団（いくつかの実施形態では、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡張前または第１の拡張後及び第２の拡張前に、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【０５１７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、第１の拡張から（例えば、図１に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは保管されず、第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、第１の拡張から取得されたＴＩＬは、第１の拡張後及び第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約４日～１０日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから約１４日で起こる。

【０５１８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張

から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１２日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１３日～１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１４日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから２日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから３日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから４日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから５日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから６日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから７日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから８日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから９日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１０日～１１日で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こってから１１日で起こる。

【０５１９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、第１の拡張後及び第２の拡張前に保管されず、ＴＩＬは、第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図１に示されるステップＢからステップＤへの移行中に保管されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで第２の拡張に直接進む。

【０５２０】

いくつかの実施形態では、第１の拡張から第２の拡張への移行、例えば、図１によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００バイオリアクターである。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０５２１】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及び初期バルク処理後、例えば、図１に示される、ステップＡ及びステップＢ、ならびにステップＣと称される移行後に数が拡張される）。このさらなる拡張は、本明細書では第２の拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（ＲＥＰ）と称される拡張プロセス、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含み得る。第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。

【０５２２】

いくつかの実施形態では、第２の拡張または第２のＴＩＬ拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約７日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、

約８日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約９日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１０日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１１日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１２日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１３日～約１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、約１４日間続行することができる。

【０５２３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【０５２４】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０５２５】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８

０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【０５２６】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【０５２７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０５２８】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１による、かつ本明細書に記載されるステップＤのプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図１による、かつ本明細書に記載されるステップＤのプロセス中に含まれ得る。

【０５２９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

【０５３０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬ

のＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０５３１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０５３２】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【０５３３】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコ内で行われる。細胞が代替の成長チャンバに移されるまで、培地交換が行われる（一般に、新鮮な培地との呼吸による３分の２の培地交換）。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０５３４】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、１１日に短縮される。

【０５３５】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、以前に記載されたＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８，３１，７４２－５１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２）またはガス透過性培養器具（Ｇ－ＲＥＸフラス

コ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、１５０ｍＬの培地に懸濁された約１×１０^{6}個のＴＩＬが、各Ｔ－１７５フラスコに添加され得る。ＴＩＬは、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物中で培養され得る。Ｔ－１７５フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換され得る。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ得、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ　Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、０．５～２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの間の細胞数を維持した。

【０５３６】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販されている）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行われ得る。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中、ＰＢＭＣで培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ－１００フラスコ内で連続的に拡張される場合、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ－１００内のＴＩＬが、各フラスコに存在する３００ｍＬの培地に懸濁され得、細胞懸濁液が３つの１００ｍＬアリコートに分割され得、それを使用して、３つのＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに播種することができる。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコが５％　CO_2中３７℃でインキュベートされ得、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコに添加され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。

【０５３７】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、バルクＴＩＬが１５０ｍＬの培地中の１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体、及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合されているフラスコで行われる。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２が、新鮮な培地と呼吸によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０５３８】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される増殖を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【０５３９】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バル

クＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【０５４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、以前に記載されているＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，２００８，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，３１：７４２－７５１及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．２００３，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２６：３３２－３４２）またはガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性Ｇ－ＲＥＸフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、約１×１０^{6}個のＴＩＬが約１５０ｍＬの培地に懸濁され、これが各Ｔ－１７５フラスコに添加される。ＴＩＬは、「フィーダー」細胞として１対１００の比で放射線照射された（５０Ｇｙ）同種異系ＰＢＭＣと培養され、細胞が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物（５０／５０培地）中で培養された。Ｔ－１７５フラスコを、５％ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分が、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換される。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加される。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され得、新鮮な培地が添加されて、約０．５～約２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞数を維持することができる。

【０５４１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）は、１００ｃｍ^{2}のガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）を有する５００ｍＬ容量のフラスコ内で行われ、約５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、４００ｍＬの５０／５０培地中、１対１００の比で放射線照射された同種異系ＰＢＭＣと培養される。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％　ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１ｇ）で１０分間遠心分離される。その後、ＴＩＬペレットが、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な５０／５０培地に再懸濁され、元のＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧ－ＲＥＸ－１００フラスコ内で連続的に拡張されるいくつかの実施形態では、７日目に、各Ｇ－ＲＥＸ－１００内のＴＩＬを、各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し、細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割し、それを使用して３つのＧ－ＲＥＸ－１００フラスコに播種する。その後、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが各フラスコに添加される。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコが５％　ＣＯ$_{2}$中３７℃でインキュベートされ、４日後に、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのＡＩＭ－Ｖが、各Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコに添加される。培養１４日目に、細胞が採取される。

【０５４２】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態で

は、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０５４３】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ^{2}または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０５４４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【０５４５】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０５４６】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、CO_{2}^{+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０５４７】
いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。
【０５４８】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。
【０５４９】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【０５５０】
いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの

２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）

が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【０５５１】
いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。
【０５５２】
いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【０５５３】
いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、CO_2^{+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。
【０５５４】
いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５

ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０５５５】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０５５６】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。

【０５５７】

いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｔｒａｎｓｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。

【０５５８】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。

【０５５９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張、例えば、図１によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０５６０】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、

Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【０５６１】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【０５６２】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。

【０５６３】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。

【０５６４】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【０５６５】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。

【０５６６】

いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。

【０５６７】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【０５６８】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。
【０５６９】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。
【０５７０】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。
【０５７１】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。
【０５７２】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。
【０５７３】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。
【０５７４】
いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。
【０５７５】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【０５７６】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ Ｗ２５などの自動細胞拡張系は、急速な膨張及び供給のために使用される。

【０５７７】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順（例えば、図１のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ ＴＩＬ拡張中及び／または第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【０５７８】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０５７９】

いくつかの実施形態では、１４日目の生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０５８０】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０５８１】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０５８２】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約

１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【０５８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約２．５×10^9フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。

【０５８４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【０５８５】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０５８６】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第２の拡張において使用される。

【０５８７】

２．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０５８８】

代替的に、ＴＩＬの急速拡張及び／または第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０５８９】

いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ中の培養培地で使用されてもよい。

【０５９０】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、１、２、３、４つ、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。

【０５９１】

ＴＩＬは、例えば、遠心分離を含む、任意の適切な滅菌様式で採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、いずれかのかかる既知の方法が本プロセスで用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化系を使用して採取される。

【０５９２】

細胞採取機及び／または細胞処理系は、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯ系（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理系によるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理系」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【０５９３】

いくつかの実施形態では、採取、例えば、図１によるステップＥは、閉鎖系バイオリアクターから行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【０５９４】

いくつかの実施形態では、図１によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。

【０５９５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１日目～１１日目の間のＴＩＬは、実施例における１１日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２４日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、１２日目～２２日目の間のＴＩＬは、実施例における２２日目のＴＩＬ採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。

【０５９６】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図１に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される

。

【０５９７】

いくつかの実施形態では、本開示のＡＰＣを使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【０５９８】

ＩＩＩ．Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製造プロセス

いかなる特定の理論にも限定されることなく、本発明の方法に記載される、Ｔ細胞の活性化をプライミングする、プライミングによる第１の拡張と、それに続くＴ細胞の活性化を促進する急速な第２の拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたＴ細胞の調製が可能になると考えられ、したがって、本発明の拡張されたＴ細胞が、他の方法によって拡張されたＴ細胞よりも高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すことが予想される。特に、本発明の方法によって教示される、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露によってプライミングされ、その後、追加の抗ＣＤ－３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及びＡＰＣへのその後の曝露によって促進されるＴ細胞の活性化が、培養下でＴ細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞集団を産生し、これらのＴ細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、より高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴ細胞を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００　ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ細胞の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【０５９９】
いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも１０^{8}個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも１０^{8}個のＴＩＬ、少なくとも１０^{9}個のＴＩＬ、または少なくとも１０^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも１０^{10}個のＴＩＬを含む。
【０６００】
いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。
【０６０１】
いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。
【０６０２】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、複数のステップに分割される前に、約１～５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、急速拡張の開始後約１日目、２日目、３日目、４日目、または５日目に起こる。
【０６０３】
いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後約８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、または１３日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第１の拡張の開始後約１０日目に起こる。例示的な別の実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１１日目に起こる。
【０６０４】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約４～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。
【０６０５】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。
【０６０６】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。
【０６０７】
いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡

張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【０６０８】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【０６０９】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【０６１０】

いくつかの実施形態では、急速拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ　Ｗ２５などの自動細胞拡張系は、急速な膨張及び供給のために使用される。

【０６１１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。

【０６１２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【０６１３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【０６１４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、正確にまたは約１％～１０％、１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％～８０％、８０％～９０％、または９０％～１００％の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【０６１５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２

１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％減少した後に行われる。

【０６１６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、最大で正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％減少した後に行われる。

【０６１７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化の減少は、抗原による刺激に応答してＴ細胞によって放出されるインターフェロンガンマの量の減少によって決定される。

【０６１８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約７日または約８日の期間中に行われる。

【０６１９】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０６２０】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われる。

【０６２１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１１日の期間中に行われる。

【０６２２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０６２３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約１１日の期間中に行われる。

【０６２４】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、最大で正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間中に行われる。

【０６２５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約

１日～正確にまたは約８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【０６２６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、８日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【０６２７】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、正確にまたは約１日～正確にまたは約９日の期間中に行われる。

【０６２８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞のプライミングによる第１の拡張は、

【０６２９】

７日の期間中に行われ、Ｔ細胞の急速な第２の拡張は、９日の期間中に行われる。

【０６３０】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。

【０６３１】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。

【０６３２】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である。

【０６３３】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患しているドナーから取得される。

【０６３４】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患している患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬである。

【０６３５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、血液系悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から取得されたＭＩＬである。

【０６３６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から取得されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。

【０６３７】

本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフェレーシスによって取得される。アフェレーシス産物は、典型的には、リンパ球、例えば、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフェレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択で、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。代替の実施形態

では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、またはすべてではないが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。

【０６３８】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来のリンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から分離されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、正または負の選択法を使用することによって、すなわち、Ｔ細胞表現型について、マーカー（複数可）、例えば、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋を使用してＰＢＬを除去することによって、または非Ｔ細胞表現型細胞を除去してＰＢＬを残すことによって、リンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス産物から単離される。他の実施形態では、ＰＢＬは、勾配遠心分離によって単離される。ドナー組織からＰＢＬを単離した時点で、ＰＢＬのプライミングによる第１の拡張は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかのプライミングによる第１の拡張ステップに従って、プライミングによる第１の拡張培養下で好適な数の単離されたＰＢＬ（いくつかの実施形態では、およそ１×１０^{7}ＰＢＬ）を播種することによって開始され得る。

【０６３９】

これらの特徴のうちのいくつかを含む、プロセス３として知られる（本明細書ではＧｅｎ３とも称される）例示的なＴＩＬプロセスが、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示され、本発明のこの実施形態の、Ｇｅｎ２を超える利点のうちのいくつかが、図１、２、８、３０、及び３１（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に記載される。Ｇｅｎ３の実施形態は、図１、８、及び３０（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示される。プロセス２ＡまたはＧｅｎ２またはＧｅｎ２Ａはまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／０２８０４３６号にも記載されている。Ｇｅｎ３プロセスはまた、国際特許公開第ＷＯ２０２０／０９６９８８号に記載されている。

【０６４０】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、ＴＩＬは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつＧｅｎ３と称されるＴＩＬ拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、拡張前または拡張後に凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【０６４１】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に

短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～８日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第１の拡張（本明細書において急速拡張前（ＲＥＰ前）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日に短縮され、急速な第２の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ

及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、９～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張と急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図１Ｂ及び／または図８Ｃ）においてステップＢ及びステップＤとして記載される拡張）との組み合わせは、以下ならびに実施例及び図面において詳細に考察されるように、１４～１６日間である。特に、本発明のある特定の実施形態が、ＩＬ－２の存在下での抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３への曝露、または少なくともＩＬ－２及び抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３の存在下での抗原への曝露によってＴＩＬが活性化される、プライミングによる第１の拡張ステップを含むと考えられる。ある特定の実施形態では、上記のようにプライミングによる第１の拡張ステップで活性化されるＴＩＬは、第１のＴＩＬ集団であり、すなわち、一次細胞集団である。

【０６４２】

以下の「ステップ」指定Ａ、Ｂ、Ｃなどは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）における非限定的な例を参照し、本明細書に記載されるある特定の非限定的な実施形態を参照している。以下及び図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【０６４３】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から、またはＴＩＬ様の特徴を有する末梢血リンパ球を含む末梢血リンパ球などの循環リンパ球から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、任意選択でＴＩＬの健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０６４４】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、大腸癌、肺癌、脳

癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのＴＩＬを有することが報告されているため、有用なＴＩＬは、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

【０６４５】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭグルタミン酸、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％ CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【０６４６】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％ CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【０６４７】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％ＣＯ２で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％ＣＯ２で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％ＣＯ２で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組

み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【０６４８】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。

【０６４９】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【０６５０】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【０６５１】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【０６５２】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。

【０６５３】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。

【０６５４】

一般に、腫瘍から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－１２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【０６５５】

いくつかの実施形態では、断片化には、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化が含まれる。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。

【０６５６】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、１０、２０、３０、４０個、またはそれ以上の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、３０個または４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、４０個の断片または小片が、プライミングによる第１の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を伴う約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５

グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。

【０６５７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～１０ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^3～８ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。

【０６５８】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。ある特定の実施形態では、腫瘍の断片化ステップは、インビトロまたはエクスビボ方法である。

【０６５９】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０６６０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張ステップ前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。

【０６６１】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を得た後及び／または腫瘍試料から細胞懸濁液を得た後）、任意選択で凍結され得、ステップＢに記載の拡張

に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図８（特に、例えば図８Ｂ）に例示される。

【０６６２】

１．コア／小生検由来のＴＩＬ

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、最初に、コア生検または同様の手順によって取得された患者腫瘍試料（「一次ＴＩＬ」）から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意で凍結保存され、任意で表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０６６３】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さい腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の１、２、３、または４つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり得る。

【０６６４】

一般に、腫瘍コアまたは断片から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたＴＩＬ細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－２、及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【０６６５】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、かつ原発性病変が過去に効率的に治療／除去された場合、転移性病変のうちの１つの除去が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、皮膚病変、または利用可能な場合、首または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変が除去されるか、またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小生検は、ほくろまたはその一部を含む。

【０６６６】

いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で取得される。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、疑わしいほくろの周りの皮膚に押し込まれた円形の刃で得られる。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で得られ、丸い皮膚片が採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が採取される。

【０６６７】

いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が、正常に見える皮膚の小縁とともに除去される。

【０６６８】

いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、ほくろまたは増殖の最も不規則な部分のみが採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、切開生検は、疑わしいほくろが非常に大きい場合など、他の技法を達成することができない場合に使用される。

【０６６９】
いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって取得される。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔をかけられ、小さい用具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さい用具を使用していくらかの組織を採取する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検が用いられ得る。一般に、経胸腔針生検の場合も、患者は麻酔をかけられ、針が皮膚を通して疑わしい場所に直接挿入されて、小さい組織試料を採取する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入放射線医学（例えば、針をガイドするためのＸ線またはＣＴ走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって取得される。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波内視鏡検査によって得られる（例えば、照明を備えた内視鏡であり、口を通して食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に取得される。
【０６７０】
いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。
【０６７１】
いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。
【０６７２】
「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺の癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。
【０６７３】
いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、１つまたは２つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１００に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－５００に入れられる

。

【０６７４】

ＦＮＡは、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【０６７５】

ＦＮＡは、例えば、ＮＳＣＬＣを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、ＮＳＣＬＣを有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【０６７６】

本明細書に記載のＴＩＬは、ＦＮＡ試料から得られ得る。いくつかの事例では、ＦＮＡ試料は、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲の細いゲージ針を使用して、患者から得られるか、または単離される。細いゲージ針は、１８ゲージ、１９ゲージ、２０ゲージ、２１ゲージ、２２ゲージ、２３ゲージ、２４ゲージ、または２５ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のＦＮＡ試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【０６７７】

いくつかの事例では、本明細書に記載のＴＩＬは、コア生検試料から取得される。いくつかの事例では、コア生検試料は、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得られるか、または単離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ、または１６ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のコア生検試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【０６７８】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【０６７９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【０６８０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％　CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７

℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【０６８１】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を取得することは、多病変サンプリング法を含む。

【０６８２】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）などの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【０６８４】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【０６８５】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣＵ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【０６８６】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅ　Ｉは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、４ＫＵ／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のＤＮａｓｅ　Ｉストックは、約１ＫＵ／ｍＬ～１０ＫＵ／ｍＬ、例えば、約１ＫＵ／ｍＬ、約２ＫＵ／ｍＬ、約３ＫＵ／ｍＬ、約４ＫＵ／ｍＬ

、約５ＫＵ／ｍＬ、約６ＫＵ／ｍＬ、約７ＫＵ／ｍＬ、約８ＫＵ／ｍＬ、約９ＫＵ／ｍＬ、または約１０ＫＵ／ｍＬの範囲である。

【０６８７】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があるため、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに追加される酵素の最終量を修正する。

【０６８８】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約４．７ｍＬの滅菌ＨＢＳＳ中に約１０．２ｕｌの中性プロテアーゼ（０．３６ＤＭＣ　Ｕ／ｍＬ）、２１．３ｕｌのコラゲナーゼ（１．２ＰＺ／ｍＬ）及び２５０ｕｌのＤＮＡｓｅ　Ｉ（２００Ｕ／ｍＬ）を含む。

【０６８９】

２．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０６９０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。本開示が胸水を例示するいくつかの実施形態では、同じ方法が、胸腔内液またはＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で実行されてもよい。

【０６９１】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０６９２】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に

許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、４℃で、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【０６９３】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後２４～４８時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【０６９４】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、接触ステップで使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であり得、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法の接触ステップで使用することができる。

【０６９５】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解系は市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解系には、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）系、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）系（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）系、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩ系（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウム系が含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解系は、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【０６９６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。

【０６９７】

３．末梢血から末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を拡張する方法

ＰＢＬ法１。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、本明細書に記載のプロセスを使用して拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、全血からＰＢＭＣ試料を取得することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。

【０６９８】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法１は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離する。

【０６９９】

ＰＢＬ法２。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、全血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法２を使用して拡張される。ＰＢＭＣ由来のＴ細胞は、ＰＢＭＣを３７℃で少なくとも３時間インキュベートし、その後、非接着細胞を単離することによって濃縮される。

【０７００】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法２は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＭＢＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣ細胞を、ＣＭ－２培地中の６ウェルプレートに６００万細胞／ウェルで播種し、３７℃で３時間インキュベートする。３時間後、ＰＢＬである非接着細胞を取り出し、計数する。

【０７０１】

ＰＢＬ法３。本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、末梢血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法３を使用して拡張される。Ｂ細胞は、ＣＤ１９＋選択を使用して単離され、Ｔ細胞は、ＰＢＭＣ試料の非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して選択される。

【０７０２】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、末梢血から取得された凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、計数する。ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、ＣＤ１９　Ｍｕｌｔｉｓｏｒｔキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して選別する。非ＣＤ１９＋細胞画分のうち、Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して精製する。

【０７０３】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、全血試料から単離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。いくつかの実施形態では、試料は、拡張プロセス前に凍結保存される。他の実施形態では、新鮮な試料が、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている方法を使用してＰＢＭＣから単離される。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ヒトＴ汎細胞単離キット及びＬＳカラムを使用して単離される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、ＣＤ１９の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから単離される。

【０７０４】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、非接着細胞を特定するのに有効な所望の温度である期間インキュベートされる。本発明のいくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、約３時間である。本発明のいくつかの実施形態では、温度は、約３７℃である。その後、非接着細胞は、上記のプロセスを使用して拡張される。

【０７０５】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで任意選択で前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形

態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または１年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、イブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。

【０７０６】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤での治療に不応性である対象または患者由来のものである。

【０７０７】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けていない対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも１ヶ月間、少なくとも２ヶ月間、少なくとも３ヶ月間、少なくとも４ヶ月間、少なくとも５ヶ月間、少なくとも６ヶ月間、または少なくとも１年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＩＴＫ阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも３ヶ月、少なくとも６ヶ月、少なくとも９ヶ月、または少なくとも１年以内に治療されていない患者に由来する。

【０７０８】

本発明のいくつかの実施形態では、０日目に、細胞がＣＤ１９＋について選択され、それに応じて選別される。本発明のいくつかの実施形態では、選択は、抗体結合ビーズを使用して行われる。本発明のいくつかの実施形態では、純粋なＴ細胞が、０日目にＰＢＭＣから単離される。

【０７０９】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療されていない患者の場合、１０～１５ｍＬのバフィーコートは、約５×１０^{9}のＰＢＭＣを産生し、これは、次いで、約５．５×１０^{7}のＰＢＬを産生する。

【０７１０】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療された患者の場合、拡張プロセスは、約２０×１０^{9}のＰＢＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、４０．３×１０^{6}のＰＢＭＣは、約４．７×１０^{5}のＰＢＬを産生する。

【０７１１】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【０７１２】

いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、米国特許出願公開第２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【０７１３】

４．骨髄由来のＰＢＭＣから骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）を拡張する方法

ＭＩＬ法３。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からＰＢＭＣを取得することを含む。０日目に、ＰＢＭＣがＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋について選択され、選別され、非ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加され

る。
【０７１４】
本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。細胞を、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ２０、及びＣＤ１４抗体で染色し、選別されたＳ３ｅ細胞（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはＭＩＬ画分）（ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）及びＡＭＬ芽球画分（非ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）の２つの画分に選別する。
【０７１５】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、アフェレーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、新鮮である。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結保存される。
【０７１６】
本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬは、１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、１０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、２０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、３０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、４０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、５０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。
【０７１７】
本発明のいくつかの実施形態では、約１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から産生されたＰＢＭＣの数は、約５×１０^{7}～約１０×１０^{7}ＰＢＭＣである。他の実施形態では、産生されたＰＭＢＣの数は、約７×１０^{7}ＰＢＭＣである。
【０７１８】
本発明のいくつかの実施形態では、約５×１０^{7}～約１０×１０^{7}ＰＢＭＣが、約０．５×１０^{6}～約１．５×１０^{6}ＭＩＬを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、約１×１０^{6}ＭＩＬが産生される。
【０７１９】
本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液から誘導された１２×１０^{6}ＰＢＭＣは、およそ１．４×１０^{5}ＭＩＬを産生する。
【０７２０】
前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、骨髄から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。
【０７２１】
いくつかの実施形態では、ＭＩＬは、米国特許出願公開第２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。
【０７２２】
Ｂ．ステップＢ：プライミングによる第１の拡張
いくつかの実施形態では、本方法は、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、より若いＴＩＬを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２：４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔ

ｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０７２３】

例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、０日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、１容器当たり最大６０個の断片及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に、約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。

【０７２４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるプロセスを含み得、０日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載される急速な第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意選択の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１ｍｍ^{3}～１０ｍｍ^{3}である。

【０７２５】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭＨｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲ

ＰＭＩ　１６４０からなる。

【０７２６】

いくつかの実施形態では、２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、６０個以下の腫瘍断片が１つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、１容器当たり５００ｍＬ以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７２７】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好み、かつ０日目の培養開始からＴＩＬプライミング及び加速された成長を可能にする条件下で、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む培地中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３とインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×10^8のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×10^8のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例Ｃに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ

／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０７２８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０７２９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培

養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０７３０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。

【０７３１】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０７３３】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培地または初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

【０７３４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無

血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【０７３５】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０７３６】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、CO_2^{+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０７３７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０７３８】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清

または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０７３９】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７４０】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓ

ｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７４１】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【０７４２】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【０７４３】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／

１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、CO_2^{+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０７４４】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０７４５】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【０７４６】
いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。
【０７４７】
いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，ＣｌｉｎＴｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。
【０７４８】
いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。
【０７４９】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考

察されるように、７～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７日間である。

【０７５０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／または

プライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日間続行することができる。

【０７５１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日間続行することができる。

【０７５２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＢプロセス中を含む、プライミングによる第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）による、及び本明細書に記載されるステップＢプロセス中に含まれ得る。

【０７５３】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張、例えば、図８によるステップＢ（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）は、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１０である。

【０７５４】
１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞
いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６

～７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７または８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ８日目の間の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。

【０７５５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時及びプライミングによる第１の拡張中にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要する。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１０当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１００当たり2.5×10^{8}のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。

【０７５６】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０７５７】

いくつかの実施形態では、１４日目の総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０７５８】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０７５９】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細

胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０７６０】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【０７６１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張は、約２．５×10^8フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５、または半分を必要とする。

【０７６２】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、容器当たり２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ

１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ－３、及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。

【０７６３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、第２の拡張中にＴＩＬを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【０７６４】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０７６５】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、プライミングによる第１の拡張において使用される。

【０７６６】

２．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０７６７】

代替的に、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。例えば、表２を参照されたい。

【０７６８】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【０７６９】

Ｃ．ステップＣ：プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行

場合によっては、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるようにステップＢから取得されるＴＩＬ集団を含む、プライミングによる第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ母集団（ＲＥＰ前と称され

ることもある拡張を含み得る）は、急速な第２の拡張（これは、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで、以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、プライミングによる第１の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団または急速な第２の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団は、拡張ステップ前またはプライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【０７７０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは保管されず、急速な第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から取得されたＴＩＬは、プライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約８日で起こる。

【０７７１】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始された

ときから１日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日で起こる。

【０７７２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、初期第１の拡張後、及び急速な第２の拡張前に保存されず、ＴＩＬは、急速な第２の拡張に直接進行する（例えば、いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるようにステップＢからステップＤへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで急速な第２の拡張に直接進む。

【０７７３】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、ＧＲＥＸ－１０またはＧＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクタ

ーである。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、ＧＲＥＸ－１００内で行われ、急速な第２の拡張は、ＧＲＥＸ－５００内で行われる。

【０７７４】

Ｄ．ステップＤ：急速な第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及びプライミングによる第１の拡張後、ステップＡ及びステップＢ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるように、ステップＣと称される移行後に数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では急速な第２の拡張または急速拡張と称され、これは、当該技術分野で概して急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはＲＥＰ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。急速な第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含む、いくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張開始の１日、２日、３日、または４日後（すなわち、Ｇｅｎ３プロセス全体の８、９、１０、または１１日目）に、ＴＩＬは、より大容量の容器に移される。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの急速な第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日間続行すること

ができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１０日間続行することができる。

【０７７６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での急速な第２の拡張において拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞の存在下での急速な第２の拡張において拡張され、フィーダー細胞は、プライミングによる第１の拡張において存在するフィーダー細胞の濃度の２倍、２．４倍、２．５倍、３倍、３．５倍、または４倍である最終濃度まで追加される。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【０７７７】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００Ｉ

Ｕ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０７７８】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇの間、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬ～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【０７７９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７８０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器当たり５００ｍＬの培養培地、ならびに６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び５×10^8～７．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０７８１】
いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。
【０７８２】
いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０７８３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＤプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）による、及び本明細書に記載されるステップＤプロセス中に含まれ得る。
【０７８４】
いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。
【０７８５】
いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１４０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、または約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－１５をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。
【０７８６】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約４ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約３ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、または約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２１をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０７８７】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：１０、約１：１５、約１：２０、約１：２５、約１：３０、約１：３５、約１：４０、約１：４５、約１：５０、約１：７５、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【０７８８】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または急速な第２の拡張は、バルクＴＩＬを１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞と混合してフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、１５０ｍＬ培地中のプライミングによる第１の拡張、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１×）、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．８倍、２倍、２．１倍、２．２倍、２．３倍、２．４倍、２．５倍、２．６倍、２．７倍、２．８倍、２．９倍、３．０倍、３．１倍、３．２倍、３．３倍、３．４倍、３．５倍、３．６倍、３．７倍、３．８倍、３．９倍または４．０倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の３分の２の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、３分の２培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０７８９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で論じられるように、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、７日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、８日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、９日間である。

【０７９０】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－

１００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充された４００ｍＬの５０／５０培地中でＰＢＭＣとともに培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％ CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離される。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧＲＥＸ－１００フラスコで連続して拡張される場合、１０日目または１１日目に、ＴＩＬは、ＧＲＥＸ－５００などのより大きいフラスコに移され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。培養１５日目に、細胞が採取され得る。培養１６日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、ＧＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０７９１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【０７９２】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【０７９３】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ、ＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の抗生物質、及び１つ以上の微量元素のうちの１つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、CO_2^{+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－

グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【０７９４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＣＴＳ（商標）ＡＩＭ－Ｖ Ｍｅｄｉｕｍ、ＣＳＴ（商標）ＡＩＭ－Ｖ ＳＦＭ、ＬｙｍｐｈｏＯＮＥ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｘｅｎｏ－Ｆｒｅｅ Ｍｅｄｉｕｍ、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

【０７９５】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（ｖｏｌ％）は、総無血清または合成培地の約１体積％、２体積％、３体積％、４体積％、５体積％、６体積％、７体積％、８体積％、９体積％、１０体積％、１１体積％、１２体積％、１３体積％、１４体積％、１５体積％、１６体積％、１７体積％、１８体積％、１９体積％、または２０体積％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約３％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約５％である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。

【０７９６】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。

【０７９７】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２

ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。

【０７９８】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約０．１ｍＭ～約１０ｍＭ、０．５ｍＭ～約９ｍＭ、１ｍＭ～約８ｍＭ、２ｍＭ～約７ｍＭ、３ｍＭ～約６ｍＭ、または４ｍＭ～約５ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約２ｍＭの濃度でグルタミン（すなわち、ＧｌｕｔａＭＡＸ（登録商標））が補充されている。

【０７９９】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５ｍＭ～約１５０ｍＭ、１０ｍＭ～約１４０ｍＭ、１５ｍＭ～約１３０ｍＭ、２０ｍＭ～約１２０ｍＭ、２５ｍＭ

～約１１０ｍＭ、３０ｍＭ～約１００ｍＭ、３５ｍＭ～約９５ｍＭ、４０ｍＭ～約９０ｍＭ、４５ｍＭ～約８５ｍＭ、５０ｍＭ～約８０ｍＭ、５５ｍＭ～約７５ｍＭ、６０ｍＭ～約７０ｍＭ、または約６５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約５５ｍＭの濃度で２－メルカプトエタノールが補充されている。

【０８００】

いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第ＷＯ１９９８／０３０６７９号及び米国特許出願公開第２００２／００７６７４７　Ａ１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ａｇ＋、Ａｌ３＋、Ｂａ２＋、Ｃｄ２＋、Co_2＋、Ｃｒ３＋、Ｇｅ４＋、Ｓｅ４＋、Ｂｒ、Ｔ、Ｍｎ２＋、Ｐ、Ｓｉ４＋、Ｖ５＋、Ｍｏ６＋、Ｎｉ２＋、Ｒｂ＋、Ｓｎ２＋、及びＺｒ４＋を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【０８０１】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【０８０２】
いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地中の濃度範囲」という見出しの下の列にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表４の「１×培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表４の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下の列にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。
【０８０３】
いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約２６０～３５０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約２８０～３１０ｍＯｓｍｏｌである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約３．７ｇ／Ｌ、または約２．２ｇ／Ｌの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、Ｌ－グルタミン（最終濃度約２ｍＭ）、１つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（ＮＥＡＡ、最終濃度約１００μＭ）、２－メルカプトエタノール（最終濃度約１００μＭ）がさらに補充されていてもよい。
【０８０４】
いくつかの実施形態では、Ｓｍｉｔｈ，ｅｔ　ａｌ．，ＣｌｉｎＴｒａｎｓｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４（１）２０１５（ｄｏｉ：１０．１０３８／ｃｔｉ．２０１４．３１）に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、ＲＰＭＩまたはＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）を基礎細胞培地として使用し、０、２％、５％、または１０％のいずれかのＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔを補充した。
【０８０５】
いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。
【０８０６】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。
【０８０７】
任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、急速な第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。
【０８０８】
Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いく

つかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０８０９】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、CM^2または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、CM^2または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに7.5×10^8の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、CM^2または第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、CM^2または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに5×10^8の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０８１０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【０８１１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００　ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【０８１２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴ

ＩＬの一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。
【０８１３】
いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。
【０８１４】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。
【０８１５】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約５日間培養することによって急速なまたは第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移されたＴＩＬの一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。
【０８１６】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分割時に、各第２の容器は、少なくとも10^8個のＴＩＬ、少なくとも10^9個のＴＩＬ、または少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。例示的な一実施形態では、各第２の容器は、少なくとも10^{10}個のＴＩＬを含む。
【０８１７】
いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２～５亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、複数の約２、３、４、または５亜集団に配分される。
【０８１８】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。
【０８１９】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。
【０８２０】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。
【０８２１】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われ

る。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【０８２２】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【０８２３】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【０８２４】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【０８２５】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地を、ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【０８２６】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される急速な第２の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰＴＩＬ拡張中及び／または急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【０８２７】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用され、これは、放射線照射された同種異系ＰＢＭＣの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【０８２８】

いくつかの実施形態では、７日目または１４日目の総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び

／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【０８２９】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０８３０】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０８３１】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：１０、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【０８３２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×10^8フィーダー細胞：約１００×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×10^8フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×10^8フィーダー細胞：約５０×10^6ＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×10^8フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×10^8フィーダー細胞：約２５×10^6ＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、急速な第２の拡張の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載

のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約７．５×１０^{8}フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張の２倍（２．０×）、２．５倍、３．０倍、３．５倍または４．０倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【０８３３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順は、急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、プライミングによる第１の拡張に追加されたＰＢＭＣの２倍の濃度で、急速な第２の拡張に追加される。

【０８３４】

一般に、同種異系ＰＢＭＣは、放射線照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。

【０８３５】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、急速な第２の拡張において使用される。

【０８３６】

２．サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の急速な第２の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。

【０８３７】

代替的に、ＴＩＬの急速な第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。

【０８３８】

いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄから）中の培養培地で使用されてもよい。

【０８３９】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する
急速な第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、１、２、３、４、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、２つの拡張ステップ、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、１回のプライミングによる第１の拡張及び１回の急速な第２の拡張の後に採取される。

【０８４０】
ＴＩＬは、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、任意のかかる既知の方法が本プロセスとともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化系を使用して採取される。

【０８４１】
細胞採取機及び／または細胞処理系は、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃを含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯ系（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理系によるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理系」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理系は、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【０８４２】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【０８４３】
いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような閉鎖系が用いられる。

【０８４４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１４～１６日目のＴＩＬが本明細書に記載の方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１４日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１５

日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１６日目に採取される。

【０８４５】

Ｆ．ステップＦ：最終製剤及び輸液容器への移行

図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【０８４６】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【０８４７】

ＩＶ．さらなるＧｅｎ２、Ｇｅｎ３、及び他のＴＩＬ製造プロセスの実施形態

Ａ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体、例えばＯＫＴ－３を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ′）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０８４８】

いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣフィーダー層の数は、以下のように計算される：

Ａ．Ｔ細胞の体積（１０μｍ直径）：Ｖ＝（４／３）　πr^3＝５２３．６μm^3

Ｂ．４０μｍ（４細胞）の高さを有するＧ－ＲＥＸ－１００（Ｍ）のカラム：Ｖ＝（４／３）　$\pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu m^3$

Ｃ．カラムＢを充填するために必要な細胞数：$4 \times 10^{12} \mu m^3$／５２３．６μm^3＝$7.6 \times 10^8 \mu m^3$＊０．６４＝4.86×10^8

Ｄ．四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数：4.86×10^8／２４＝20.25×10^6

Ｅ．Ｇ－ＲＥＸ－５００に外挿されるフィーダー及びＴＩＬの数：ＴＩＬ：100×10^6及びフィーダー：2.5×10^9

【０８４９】

この計算では、$100 cm^2$の底部を有するシリンジ中でのＴＩＬの活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、Ｊｉｎ，ｅｔ．ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，３５，２８３－２９２に記載されているように、ＮＣＩ実験データを密接に反映するＴ細胞の閾値活性化について、約5×10^8の実験結果を導き出す。（Ｃ）では、乗数（０．６４）は、Ｊａｅｇｅｒ　ａｎｄ　Ｎａｇｅｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９２，２５５，１５２３－３によって計算された等価球のランダム充填密度である。（Ｄ）では、除数２４は、Ｍｕｓｉｎ，Ｒｕｓｓ．Ｍａｔｈ．Ｓｕｒｖ．，２００３，５８，７９４－７９５に記載される、四次元空間内の同様のオブジェクトと接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。

【０８５０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダ

ー細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、急速な第２の拡張の細胞培養培地と比較しておよそ５０％少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第１の拡張を行うことを含む。

【０８５１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数よりも多い。

【０８５２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【０８５３】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０８５４】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【０８５５】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【０８５６】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【０８５７】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【０８５８】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０８５９】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【０８６０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【０８６１】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０８６２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまた

は約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【０８６３】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【０８６４】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【０８６５】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【０８６６】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【０８６７】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【０８６８】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【０８６９】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【０８７０】
他の実施形態では、急速な第１．１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。
【０８７１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【０８７２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【０８７３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【０８７４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【０８７５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０８７６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【０８７７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【０８７８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【０８７９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【０８８０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【０８８１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【０８８２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【０８８３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【０８８４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【０８８５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【０８８６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数

は、正確にまたは約１×１０^{8}、１．１×１０^{8}、１．２×１０^{8}、１．３×１０^{8}、１．４×１０^{8}、１．５×１０^{8}、１．６×１０^{8}、１．７×１０^{8}、１．８×１０^{8}、１．９×１０^{8}、２×１０^{8}、２．１×１０^{8}、２．２×１０^{8}、２．３×１０^{8}、２．４×１０^{8}、２．５×１０^{8}、２．６×１０^{8}、２．７×１０^{8}、２．８×１０^{8}、２．９×１０^{8}、３×１０^{8}、３．１×１０^{8}、３．２×１０^{8}、３．３×１０^{8}、３．４×１０^{8}、または３．５×１０^{8}ＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}、４×１０^{8}、４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}ＡＰＣである。

【０８８７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０８８８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０８８９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣである。

【０８９０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に追加されるＰＢＭＣの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、方法の７日目）に追加される抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。

【０８９１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数よりも多い。

【０８９２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０８９３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０８９４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０８９５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０８９６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０８９７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０８９８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０８９９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９００】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。
【０９０１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され

る密度で培養フラスコに播種される。

【０９０２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９０３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９０４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９０５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【０９０６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０９０７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【０９０８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０９０９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【０９１０】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【０９１１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【０９１２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【０９１３】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０９１４】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【０９１５】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【０９１６】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０９１７】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【０９１８】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【０９１９】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【０９２０】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【０９２１】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【０９２２】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【０９２３】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【０９２４】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【０９２５】

他の実施形態では、急速な第１．１の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。

【０９２６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【０９２７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【０９２８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【０９２９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【０９３０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【０９３１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【０９３２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【０９３３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【０９３４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【０９３５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【０９３６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【０９３７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【０９３８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【０９３９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【０９４０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【０９４１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、7.3×10^{8}、7.4×10^{8}、7.5×10^{8}、7.6×10^{8}、7.7×10^{8}、7.8×10^{8}、7.9×10^{8}、8×10^{8}、8.1×10^{8}、8.2×10^{8}、8.3×10^{8}、8.4×10^{8}、8.5×10^{8}、8.6×10^{8}、8.7×10^{8}、8.8×10^{8}、8.9×10^{8}、9×10^{8}、9.1×10^{8}、9.2×10^{8}、9.3×10^{8}、9.4×10^{8}、9.5×10^{8}、9.6×10^{8}、9.7×10^{8}、9.8×10^{8}、9.9×10^{8}、または$1\text{x}10^{9}$ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０９４２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約3.5×10^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲

から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約１×１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０９４３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～約３×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、約４×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～約７．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０９４４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０９４５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０９４６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、急速な第２の拡張の７日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞層を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞層の数は、７日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【０９４７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数よりも多い。

【０９４８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９４９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第３の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平

均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、２、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【０９５７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される。

【０９５８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。

【０９５９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。

【０９６０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。

【０９６１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。

【０９６２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【０９６３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【０９６４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢ

ＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される。

【０９６５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。

【０９６６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。

【０９６７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。

【０９６８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。

【０９６９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【０９７０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭ

Ｃを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される。

【０９７１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【０９７２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される。

【０９７３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：２．

【０９７４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第１のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数の第２のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数に対する比は、約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【０９７５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１

０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。
【０９７６】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。
【０９７７】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。
【０９７８】
Ｂ．任意選択の細胞培地成分
１．抗ＣＤ３抗体
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図１及び８（特に、例えば図８Ｂ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ′）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。
【０９７９】
当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。表１を参照されたい。
【０９８０】
当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。
【０９８１】
２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び／または急速な第２の拡張の細胞培養培地は、ＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒトまたは哺乳動物４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれ

かのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬＯＳ Ｏｎｅ ２０１３，８，ｅ６９６７７。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、もしくはバイオシミラーである。

【０９８２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、融合タンパク質である場合もある。いくつかの実施形態では、三量体または六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【０９８３】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【０９８４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト４－１ＢＢ（配列番号４０）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢに結合する結合分子である（配列番号４０）。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢに結合する結合分子である（配列番号４１）。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表５に要約する。

【０９８５】
【表５】

表 5. 4-1BB 抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 40 ヒト 4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9(ホモサピエンス)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号 41 マウス 4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9(ハツカネズミ)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN 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

【０９８６】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３０ｐＭ以下のＫＤで結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０９８７】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。
【０９８８】
いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくは

マウス４－１ＢＢに約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．８×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．９×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９８９】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１０ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０９９０】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ガンマ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表６に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２にグリコシル化部位、２２－９６位（ＶＨ－ＶＬ）、１４３－１９９位（ＣＨ１－ＣＬ）、２５６－３１６位（ＣＨ２）、及び３６２－４２０位（ＣＨ３）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２′－８７′位（ＶＨ－ＶＬ）及び１３６′－１９５′位（ＣＨ１－ＣＬ）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１９－１３０（２）、２２２－２２２、及び２２５－２２５位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋、ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３′（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３′位、及び１３０－２１３′位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３′（２）位に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、及び同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ．＆Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【０９９１】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号４２によって示される重鎖及び配列番号４３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０９９２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号４４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号４５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０９９３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４６、配列番号４７、及び配列番号４８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４９、配列番号５０、及び配列番号５１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【０９９４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬

品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

【０９９５】

【表６－１】

表 6.ウトミルマブに関連する 4-1BB アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 42 ウトミルマブの 重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
配列番号 43 ウトミルマブの 軽鎖	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
配列番号 44 ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 45 ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
配列番号 46 ウトミルマブの 重鎖 CDR1	STYWIS 6

【表６－２】

配列番号47 ウトミルマブの 重鎖CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号48 ウトミルマブの 重鎖CDR3	RGYGIFDY	8
配列番号49 ウトミルマブの 軽鎖CDR1	SGDNIGDQYA H	11
配列番号50 ウトミルマブの 軽鎖CDR2	QDKNRPS	7
配列番号51 ウトミルマブの 軽鎖CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【０９９６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３及び２０Ｈ４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．及びＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表７に示す。ウレルマブは、２９８位（及び２９８’’）にＮ－グリコシル化部位、２２－９５位（ＶＨ－ＶＬ）、１４８－２０４位（ＣＨ１－ＣＬ）、２６２－３２２位（ＣＨ２）、及び３６８－４２６位（ＣＨ３）（２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’、及び３６８’’－４２６’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（ＶＨ－ＶＬ）及び１３６’－１９６’位（ＣＨ１－ＣＬ）（２３’’’－８８’’’及び１３６’’’－１９６’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２７－２２７’’位及び２３０－２３０’’位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋ならびに１３５－２１６’及び１３５’’－２１６’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び同第８，９６２，８０４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【０９９７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号５２によって示される重鎖及び配列番号５３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列を有する重鎖及

び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０９９８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号５４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号５５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０９９９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０００】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミ

ラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

【１００１】

【表７－１】

表 7.ウレルマブに関連する 4-1BB アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 52 ウレルマブの重鎖	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
配列番号 53 ウレルマブの軽鎖	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
配列番号 54 ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
配列番号 55 ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
配列番号 56 ウレルマブの重鎖 CDR1	GYYWS 5

【表７－２】

配列番号 57 ウレルマブの重鎖 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号 58 ウレルマブの重鎖 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号 59 ウレルマブの軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 60 ウレルマブの軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 61 ウレルマブの軽鎖 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【１００２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくはＢＭＳ－４６９４９２、３Ｈ３もしくはＢＭＳ－４６９４９７、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７７８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、及び同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【１００３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／００３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１０／０７８９６６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第２０１５

／０１２６７０９Ａ１号、同第２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第２０１５／０１１０７３４Ａ１号、及び同第２０１５／０１２６７１０Ａ１号、ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１００４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、もしくはバイオシミラーである（、図１８を参照）。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢリガンド、ＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＳＦ９））または４－１ＢＢに結合する抗体に由来する３つの直線的に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたＶＨ鎖及びＶＬ鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１００５】

図１８に示される構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表８に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。

【１００６】

【表８】

表 8.C 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質設計(構造 I-A)を有する、4-1BB アゴニスト融合タンパク質を含む、TNFRSF アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 62 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
配列番号 63 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号 64 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
配列番号 65 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号 66 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
配列番号 67 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号 68 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
配列番号 69 リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
配列番号 70 リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
配列番号 71 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
配列番号 72 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

【１００７】

図１８に示される構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１００８】

【表９】

表 9.N 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質設計(構造 I-B)を有する、4-1BB アゴニスト融合タンパク質を含む、TNFRSF アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 73 Fc ドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG 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
配列番号 74 リンカー	SGSGSGSGSG S 11
配列番号 75 リンカー	SSSSSSGSGS GS 12
配列番号 76 リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

【１００９】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表１０に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１０１０】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７８による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１０１１】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１０に示されるＶＨ配列及びＶＬ配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ配列及びＶＬ配列を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインはリンカーによって結合されている。

【１０１２】

【表１０－１】

表 10.融合タンパク質における 4-1BB 結合ドメインとしてまたは scFv　4-1BB アゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 77 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 RLGVHLETEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
配列番号 78 4-1BBL 可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
配列番号 79 4B4-1-1 バージョン 1 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
配列番号 80 4B4-1-1 バージョン 1 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
配列番号 81 4B4-1-1 バージョン 2 の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
配列番号 82 4B4-1-1 バージョン 2 の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 10^{8}

【表１０－２】

配列番号 83 H39E3-2 の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
配列番号 84 H39E3-2 の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

【１０１３】
いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつか実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、４－１ＢＢ結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。
【１０１４】
いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。
【１０１５】
いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のＶＬドメインのうちのいずれかに連結された前述のＶＨドメインのうちのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。
【１０１６】
いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。
【１０１７】
３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト
いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物のＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ′）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは

、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

【１０１８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質である場合もある。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【１０１９】

アゴニストＯＸ４０抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｃｕｒｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，７３，７１８９－９８。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を無効にするアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【１０２０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号８５）に高い親和性及びアゴニスト活性で結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８５）。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８６）。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１１に要約する。

【１０２１】

【表１１】

表 11. OX40 抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 85 ヒト OX40 (ホモサピエンス)	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
配列番号 86 マウス OX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

【１０２２】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１０２３】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１０２４】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．１×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．２×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．４×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．５×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．６×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．７×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．８×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．９×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３×１０$^{-5}$１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【１０２５】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１０ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１ｎＭ以下のＩＣ５０で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【１０２６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表１２に示す。タボリキシズマブは、３０１及び３０１’’位にＮ－グリコシル化部位（フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを有する）、２２－９５位（ＶＨ－ＶＬ）、１４８－２０４位（ＣＨ１－ＣＬ）、２６５－３２５位（ＣＨ２）、及び３７１－４２９位（ＣＨ３）（及び２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６５’’－３２５’’、及び３７１’’－４２９’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（ＶＨ－ＶＬ）及び１３４’－１９４’位（ＣＨ１－ＣＬ）（及び２３’’’－８８’’’及び１３４’’’－１９４’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３０－２３０”及び２３３－２３３”位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに２２４－２１４’及び２２４’’－２１４’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【１０２７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号８７によって示される重鎖及び配列番号８８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１０２８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号８９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号９０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１０２９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、及び配列番号９３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９４、配列番号９５、及び配列番号９６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０３０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【１０３１】

【表１２－１】

表 12.タボリキシズマブに関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 87 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYH 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTV 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQ 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELL 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQ 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSR 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKS 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 88 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVP 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTL 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 89 タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYH 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
配列番号 90 タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVP 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 91 タボリキシズマブの重鎖 CDR1	GSFSSGYWN 9

【表１２－２】

配列番号 92 タボリキシズマブの重鎖 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
配列番号 93 タボリキシズマブの重鎖 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
配列番号 94 タボリキシズマブの軽鎖 CDR1	QDISNYLN	8
配列番号 95 タボリキシズマブの軽鎖 CDR2	LLIYYTSKLH S	11
配列番号 96 タボリキシズマブの軽鎖 CDR3	QQGSALPW	8

【１０３２】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１３に示す。
【１０３３】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号９７によって示される重鎖及び配列番号９８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。
【１０３４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号９９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１００に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。
【１０３５】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０１、配列番号１０２、及び配列番号１０３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１０４、配列番号１０５、及び配列番号１０^{6}に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。
【１０３６】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイ

オ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。

【１０３７】

【表１３－１】

表 13. 11D4 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 97 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
配列番号 98 11D4 の軽鎖	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
配列番号 99 11D4 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 100 11D4 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
配列番号 101 11D4 の重鎖 CDR1	SYSMN 5

【表１３－２】

配列番号 102 11D4 の重鎖 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号 103 11D4 の重鎖 CDR3	ESGWYLFDY	9
配列番号 104 11D4 の軽鎖 CDR1	RASQGISSWL A	11
配列番号 105 11D4 の軽鎖 CDR2	AASSLQS	7
配列番号 10^{6} 11D4 の軽鎖 CDR3	QQYNSYPPT	9

【１０３８】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表１４に示す。

【１０３９】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号10^{7}によって示される重鎖及び配列番号10^{8}によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号10^{7}及び配列番号10^{8}に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号10^{7}及び配列番号10^{8}に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号10^{7}及び配列番号10^{8}に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号10^{7}及び配列番号10^{8}に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号10^{7}及び配列番号10^{8}に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号10^{7}及び配列番号10^{8}に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１０４０】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号10^{9}に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１１０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号10^{9}及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０^{9}及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０^{9}及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０^{9}及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０^{9}及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【１０４１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１１、配列番号１１２、及び配列番号１１３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１１４、配列番号１１５、及び配列番号１１６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０４２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１８Ｄ８である。

【１０４３】

【表１４】

表 14. 18D8 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 107 18D8 の重鎖	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 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 108 18D8 の軽鎖	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
配列番号 109 18D8 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
配列番号 110 18D8 の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
配列番号 111 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH 5
配列番号 112 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
配列番号 113 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV 15
配列番号 114 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 115 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 116 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT 8

【１０４４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１５に示す。

【１０４５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖

ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１１７に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１１８に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【１０４６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１９、配列番号１２０、及び配列番号１２１に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１２２、配列番号１２３、及び配列番号１２４に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０４７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１１９－１２２である。

【１０４８】

【表１５】

表 15. Hu119-122 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 117 Hu119-122 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号 118 Hu119-122 の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 119 Hu119-122 の重鎖 CDR1	SHDMS	5
配列番号 120 Hu119-122 の重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 121 Hu119-122 の重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 122 Hu119-122 の軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 123 Hu119-122 の軽鎖 CDR2	LASNLES	7
配列番号 124 Hu119-122 の軽鎖 CDR3	QHSRELPLT	9

【１０４９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ．から入手可能なヒト化抗体であるＨｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表１６に示す。

【１０５０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１２５に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１２６に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領

域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【１０５１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１２７、配列番号１２８、及び配列番号１２９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１３０、配列番号１３１、及び配列番号１３２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１０５２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Ｈｕ１０６－２２２である。

【１０５３】

【表１６】

表 16. Hu106-222 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 125 Hu106-222 の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
配列番号 126 Hu106-222 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
配列番号 127 Hu106-222 の重鎖 CDR1	DYSMH 5
配列番号 128 Hu106-222 の重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
配列番号 129 Hu106-222 の重鎖 CDR3	PYYDYVSYYA MDY 13
配列番号 130 Hu106-222 の軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A 11
配列番号 131 Hu106-222 の軽鎖 CDR2	SASYLYT 7
配列番号 132 Hu106-222 の軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT 9

【１０５４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５に記載されているように、Ｂｉｏｖｅｓｔ　Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に寄託された９Ｂ１２ハイブリドーマによって産生された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【１０５５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６　ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇ

ｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ　Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。

【１０５６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ９５／１２６７３号、同第ＷＯ９５／２１９２５号、同第ＷＯ２００６／１２１８１０号、同第ＷＯ２０１２／０２７３２８号、同第ＷＯ２０１３／０２８２３１号、同第ＷＯ２０１３／０３８１９１号、及び同第ＷＯ２０１４／１４８８９５号、欧州特許出願第０６７２１４１号、米国特許出願公開第２０１０／１３６０３０号、同第２０１４／３７７２８４号、同第２０１５／１９０５０６号、及び同第２０１５／１３２２８８号（クローン２０Ｅ５及び１２Ｈ３を含む）、ならびに米国特許第７，５０４，１０１号、同第７，５５０，１４０号、同第７，６２２，４４４号、同第７，６９６，１７５号、同第７，９６０，５１５号、同第７，９６１，５１５号、同第８，１３３，９８３号、同第９，００６，３９９号、及び同第９，１６３，０８５号に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択され、その各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１０５７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂの特性は、上記及び米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図１８に示される構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。同様に、図１８に示される構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表１０に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１０５８】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖及び可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１０６－２２２の可変重鎖及び可変軽鎖、表１７に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリアント、及びバイオシミラーからなる群

から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１０５９】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３５による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１０６０】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１０^{9}及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２７及び配列番号１２８に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１７に示されるＶＨ配列及びＶＬ配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ配列及びＶＬ配列を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ＶＨドメイン及びＶＬドメインはリンカーによって結合されている。

【１０６１】

【表１７－１】

表 17.融合タンパク質(例えば、構造 I-A 及び I-B)における OX40 結合ドメインとしてまたは scFv　OX40 アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 133 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
配列番号 134 OX40L 可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
配列番号 135 OX40L 可溶性ドメイン(代替)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
配列番号 136 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号 137 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
配列番号 138 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
配列番号 139 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108

【表１７－２】

配列番号 140 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
配列番号 141 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
配列番号 142 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号 143 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
配列番号 144 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
配列番号 145 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 146 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
配列番号 147 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 148 ヒト化抗体の重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122

【表１７－３】

配列番号149　ヒト化抗体の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
配列番号150　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
配列番号151　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
配列番号152　ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
配列番号153　ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
配列番号154　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
配列番号155　ヒト化抗体の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号156　重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
配列番号157　軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

【１０６２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含

むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、ＯＸ４０結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【１０６３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【１０６４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３は、ＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第６，３１２，７００号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０６５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、前述のＶＬドメインのうちのいずれかに連結された前述のＶＨドメインのうちのいずれかを含むＯＸ４０アゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【１０６６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡから市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５である。

【１０６７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販されているＯＸ４０アゴニスト抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。

【１０６８】

４．Ｍｙｃ融合タンパク質

いくつかの実施形態では、第１の拡張及び／または第２の拡張の細胞培養培地は、Ｍｙｃ融合タンパク質を含む。Ｍｙｃ融合タンパク質は、米国特許第１１，３６９，６７８号に記載されており、その内容は参照によりその全体が組み込まれる。

【１０６９】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示するのは、（ａ）トランスポーターペプチド配列、及び（ｂ）ＭＹＣ配列を含むＭＹＣ融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、式（Ｉ）のペプチドである：

トランスポーターペプチド配列－ＭＹＣ配列。

【１０７０】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）トランスポーターペプチド配列、（ｂ）ＭＹＣ配列、及び（ｃ）トランスポーターペプチド配列とＭＹＣ配列とを連結する１つ以上の分子を含む。いくつかの実施形態では、ｆｕｓｉＭＹＣ融合タンパク質は、式（ＩＩ）のペプチドであり、

トランスポーターペプチド配列－Ｘ－ＭＹＣ配列

式中、－Ｘ－は、トランスポーターペプチド配列とＭＹＣ配列とを連結する分子である。いくつかの実施形態では、－Ｘ－は、アミノ酸である。いくつかの実施形態では、－Ｘ－は、少なくとも１つのアミノ酸である。

【１０７１】
本明細書で使用される場合、「トランスポーターペプチド」は、ペプチドが細胞及び組織に浸透することを促進するペプチド配列を意味する。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＨＩＶ－１のＴＡＴタンパク質導入ドメイン（ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ）（配列番号３０６）のＮ末端９アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＴＡＴ[４８－５７]である。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＴＡＴ[５７－４８]である。
【１０７２】
本明細書で使用される場合、「ＭＹＣ配列」は、ＭＹＣアミノ酸ペプチド配列である。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチドは、完全なＭｙｃポリペプチド配列である。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチドは、部分Ｍｙｃポリペプチド配列である。いくつかの実施形態では、ＭＹＣは、ｃ－ＭＹＣである。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチド配列は、配列番号３１２を含む：
ＭＤＦＦＲＶＶＥＮＱＱＰＰＡＴＭＰＬＮＶＳＦＴＮＲＮＹＤＬＤＹＤＳＶＱＰＹＦＹＣＤＥＥＥ
ＮＦＹＱＱＱＱＱＳＥＬＱＰＰＡＰＳＥＤＩＷＫＫＦＥＬＬＰＴＰＰＬＳＰＳＲＲＳＧＬＣＳＰＳＹＶＡ
ＶＴＰＦＳＬＲＧＤＮＤＧＧＧＧＳＦＳＴＡＤＱＬＥＭＶＴＥＬＬＧＧＤＭＶＮＱＳＦＩＣＤＰＤＤ
ＥＴＦＩＫＮＩＩＩＱＤＣＭＷＳＧＦＳＡＡＡＫＬＶＳＥＫＬＡＳＹＱＡＡＲＫＤＳＧＳＰＮＰＡＲＧ
ＨＳＶＣＳＴＳＳＬＹＬＱＤＬＳＡＡＡＳＥＣＩＤＰＳＶＶＦＰＹＰＬＮＤＳＳＳＰＫＳＣＡＳＱＤＳＳ
ＡＦＳＰＳＳＤＳＬＬＳＳＴＥＳＳＰＱＧＳＰＥＰＬＶＬＨＥＥＴＰＰＴＴＳＳＤＳＥＥＥＱＥＤＥＥＥＩＤ
ＶＶＳＶＥＫＲＱＡＰＧＫＲＳＥＳＧＳＰＳＡＧＧＨＳＫＰＰＨＳＰＬＶＬＫＲＣＨＶＳＴＨＱＨＮ
ＹＡＡＰＰＳＴＲＫＤＹＰＡＡＫＲＶＫＬＤＳＶＲＶＬＲＱＩＳＮＮＲＫＣＴＳＰＲＳＳＤＴＥＥＮ
ＶＫＲＲＴＨＮＶＬＥＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＦＦＡＬＲＤＱＩＰＥＬＥＮＮＥＫＡＰＫＶＶＩＬＫＫ
ＡＴＡＹＩＬＳＶＱＡＥＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＬＲＫＲＲＥＱＬＫＨＫＬＥＱＬＲＫＧＥＬＮＳＫＬＥ．
【１０７３】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[４８－５７]及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[５７－４８]及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。
【１０７４】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[４８－５７]、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[５７－４８]、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。
【１０７５】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、融合タンパク質の精製を容易にする少なくとも１つのアミノ酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、タンパク質タグを含む。いくつ

かの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、ポリヒスチジンタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、エピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、ポリヒスチジンタグ及びエピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、６－ヒスチジンタグ及びＶ５エピトープタグを含む。

【１０７６】

いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、６－ヒスチジンタグである。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、配列ＨＨＨＨＨＨ（配列番号３０３）を含む。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、任意の好適な方法によって、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質に添加される。いくつかの実施形態では、ＴＡＴ－Ｍｙｃポリペプチド配列は、ポリＨｉｓ－タグをコードする発現ベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、ポリヒスチジンタグは、ＰＣＲによって添加される（すなわち、ＰＣＲプライマーは、ポリヒスチジン配列を含む）。

【１０７７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、少なくとも１つのタンパク質タグをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、エピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、Ｖ５エピトープタグをさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、以下のアミノ酸を含む：ＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ（配列番号３０４）。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、以下のアミノ酸を含む：ＩＰＮＰＬＬＧＬＤ（配列番号３０５）。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、任意の好適な方法によって、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質に添加される。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質配列は、Ｖ５タグをコードする発現ベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、ＰＣＲによって添加される（すなわち、ＰＣＲプライマーは、Ｖ５配列を含む）。

【１０７８】

いくつかの実施形態では、アミノ酸は、Ｄ形態である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、Ｌ形態である。いくつかの実施形態では、第１の複数のアミノ酸は、Ｄ形態であり、第２の複数のアミノ酸は、Ｌ形態である。

【１０７９】

いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、配列番号３１３を含む：

ＭＲＫＫＲＲＱＲＲＲＭＤＦＦＲＶＶＥＮＱＱＰＰＡＴＭＰＬＮＶＳＦＴＮＲＮＹＤＬＤＹＤＳＶ
ＱＰＹＦＹＣＤＥＥＥＮＦＹＱＱＱＱＱＳＥＬＱＰＰＡＰＳＥＤＩＷＫＫＦＥＬＬＰＴＰＰＬＳＰＳＲＲ
ＳＧＬＣＳＰＳＹＶＡＶＴＰＦＳＬＲＧＤＮＤＧＧＧＧＳＦＳＴＡＤＱＬＥＭＶＴＥＬＬＧＧＤＭＶ
ＮＱＳＦＩＣＤＰＤＤＥＴＦＩＫＮＩＩＩＱＤＣＭＷＳＧＦＳＡＡＡＫＬＶＳＥＫＬＡＳＹＱＡＡＲＫ
ＤＳＧＳＰＮＰＡＲＧＨＳＶＣＳＴＳＳＬＹＬＱＤＬＳＡＡＡＳＥＣＩＤＰＳＶＶＦＰＹＰＬＮＤＳＳＳ
ＰＫＳＣＡＳＱＤＳＳＡＦＳＰＳＳＤＳＬＬＳＳＴＥＳＳＰＱＧＳＰＥＰＬＶＬＨＥＥＴＰＰＴＴＳＳＤＳＥ
ＥＥＱＥＤＥＥＥＩＤＶＶＳＶＥＫＲＱＡＰＧＫＲＳＥＳＧＳＰＳＡＧＧＨＳＫＰＰＨＳＰＬＶＬＫＲ
ＣＨＶＳＴＨＱＨＮＹＡＡＰＰＳＴＲＫＤＹＰＡＡＫＲＶＫＬＤＳＶＲＶＬＲＱＩＳＮＮＲＫＣＴＳ
ＰＲＳＳＤＴＥＥＮＶＫＲＲＴＨＮＶＬＥＲＱＲＲＮＥＬＫＲＳＦＦＡＬＲＤＱＩＰＥＬＥＮＮＥＫＡ

ＰＫＶＶＩＬＫＫＡＴＡＹＩＬＳＶＱＡＥＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬＬＲＫＲＲＥＱＬＫＨＫＬＥＱＬＲＫ
ＧＥＬＮＳＫＬＥＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴＲＴＧＨＨＨＨＨＨ
【１０８０】
Ｃ．任意選択の細胞生存率分析
任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第１の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。
【１０８１】
１．細胞計数、生存率、フローサイトメトリー
いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、例えば、ＢＤ　Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８２６９４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８０４３６号または国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／０８１４７３号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。
【１０８２】
いくつかの事例では、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。代替的に、以下で論じられるように、バルクＴＩＬ集団がＲＥＰに供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、バルクまたはＲＥＰ　ＴＩＬ集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。
【１０８３】
２．細胞培養
いくつかの実施形態では、上で考察され、図１及び８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に例示されたものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び第２の拡張（急速な第２の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、わずか１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、及び１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードするこ

とを含み得る。ガス透過性容器内で細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【１０８４】

いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培養培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【１０８５】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～８日間、例えば約７日間、またはプライミングによる第１の拡張として約８日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む。

【１０８６】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約１～７日間、例えば、約７日間にわたって培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１４日間、または約７～９日間、例えば、約７日間、約８日間、または約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【１０８７】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を、約１～７日、例えば、約７日の期間培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第の２ガス透過性容器内でＴＩＬの数を、約７～１１日、例えば、約７日、約８日、約９日、約１０日、または約１１日の期間拡張することと、を含む。

【１０８８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７Ａ１号に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、及びデバイスを使用して、ＰＢＭＣを使用してＴＩＬを拡張するために使用されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｗ２５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などのガス透過性バッグ内のＴＩＬを拡張する細胞拡張系を使用して拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ　Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｗ５（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）としても知られるＷＡＶＥ　Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ　Ｓｙｓｔｅｍなどのガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡張する細胞拡張系を使用して拡張される。いくつかの実施形態では、細胞拡張系は、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、及び約１０Ｌからなる群から選択される体積を有

するガス透過性細胞バッグを含む。

【１０８９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－ＲＥＸフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０５細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^6～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}まで拡張するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地がＧ－ＲＥＸフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、１つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボーラスとして追加され得る。かかる容器、装置、及び方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／０１３６２２８Ａ１号、米国特許第８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第２０１５／０１７５９６６Ａ１号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスはまた、Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【１０９０】

Ｄ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系

本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中に閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止及び／または低減を可能にし、より少数のフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、２つの容器を使用する。

【１０９１】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍ及びｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見つけることができる。

【１０９２】

滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

【１０９３】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は密閉Ｇ容器であり、ＴＩＬ集団が遠心分離され、第１の密閉Ｇ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【１０９４】
いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約１００％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１０％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１５％～約８５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％である。
【１０９５】
閉鎖系は、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、ＴＩＬの成長を可能にする。
【１０９６】
さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、ＴＩＬ増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖細胞培養系を提供する。
【１０９７】
いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態でＴＩＬの成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。さらに、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。
【１０９８】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖に最適な培養成分を置換または追加することができ、ＩＬ－２及び／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを追加することができる。
【１０９９】
Ｅ．ＴＩＬにおける改変されたタンパク質発現の方法
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、変化したタンパク質発現は、遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を変化させることができるベクター及び／または他の分子で形質導入される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する。
【１１００】
いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の

ＴＩＬ集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【１１０１】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＡから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、ステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団である、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから取得され、ステップＤでのその拡張前のＴＩＬ集団を含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤでの拡張から取得されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第２の拡張後に起こる。

【１１０２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、図３０及び図３１に示される方法に従って実施される。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１０３】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なＴＩＬ製品の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のＴ細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している（Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ ２００９，２０１１、Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，２０１２、Ｃｉｅｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ２０１３）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団中のＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【１１０４】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【１１０５】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【１１０６】
いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１またはＣＤ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない遺伝子を

標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１０を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤを標的とする。

【１１０７】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤを介して、及び／またはｍＤＬＬ１などの他のＮＯＴＣＨリガンドを介して、ＮＯＴＣＨシグナル伝達経路を標的とする（例えば、Ｋｏｎｄｏ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，ＮＯＴＣＨ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ　ｏｆ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎｔｏ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　ｍｅｍｏｒｙ－ｌｉｋｅ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｆｏｒ　ａｄｏｐｔｉｖｅ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｖｏｌ．８，Ａｒｔｉｃｌｅ　ｎｕｍｂｅｒ：１５３３８（２０１７）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【１１０８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現

の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【１１０９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１、ならびにＮＯＴＣＨ　１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）も含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤを介して、及び／またはｍＤＬＬ１などの他のＮＯＴＣＨリガンドを介して、ＮＯＴＣＨシグナル伝達経路を標的とする（例えば、Ｋｏｎｄｏ，Ｔ．ｅｔ　ａｌ．，ＮＯＴＣＨ－ｍｅｄｉａｔｅｄ　ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ　ｏｆ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎｔｏ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　ｍｅｍｏｒｙ－ｌｉｋｅ　Ｔ　ｃｅｌｌｓ　ｆｏｒ　ａｄｏｐｔｉｖｅ　ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｖｏｌ．８，Ａｒｔｉｃｌｅ　ｎｕｍｂｅｒ：１５３３８（２０１７）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。

【１１１０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、１つ以上の結合パートナーを介してＴＩＬへの外因性に投与されたサイトカイン担体の結合を可能にする、１つ以上の結合パートナーの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１１１１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２、及び／またはＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１１１２】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのＴＩＬの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、及び／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１１１３】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及び／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたら

す。
【１１１４】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤを介して、及び／またはｍＤＬＬ１などの他のＮＯＴＣＨリガンドを介して、ＮＯＴＣＨシグナル伝達経路を標的とする（例えば、Ｋｏｎｄｏ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．，ＮＯＴＣＨ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ ｏｆ ａｃｔｉｖａｔｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｉｎｔｏ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｍｅｍｏｒｙ－ｌｉｋｅ Ｔ ｃｅｌｌｓ ｆｏｒ ａｄｏｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｖｏｌ．８，Ａｒｔｉｃｌｅ ｎｕｍｂｅｒ：１５３３８（２０１７）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２ ＩＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｍＤＬＬ１などのＮＯＴＣＨリガンドの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。
【１１１５】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。
【１１１６】
いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される２つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせのうちの１つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＧＩＴの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少

をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＴＬＡ－４及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴ及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴ及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴ及びＴＩＭ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１１１７】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【１１１８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【１１１９】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１１２０】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％増加する。

【１１２１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子でのＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。転写因子を含むタンパク質を、Ｔ細胞（Ｓｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１３、ならびにＳｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬＯＳ　ＯＮＥ　２０１５及びＧｒｅｉｓｂｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｖｏｌ．１９５，２０１５）を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を実証する方法は、ＴＦまたは他の分子が細胞に入るようなマイクロ流体収縮を使用して細胞を変形させるための迅速な方法を含み、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、または同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１号、または同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号（これらはすべて参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、または同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１号、または同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号に記載されるかかる方法は、ＴＩＬ集団を、転写因子（ＴＦ）及び／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該ＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、それ故に、ＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ開始集団またはＴＩＬ前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞の亜集団の増加をもたらす。

【１１２２】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）には、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、及び／またはＭＹＢが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの誘導多能性幹細胞培養物（ｉＰＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつ

かの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％ＴＳＣＭの増加をもたらす。

【１１２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ｉ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｉｉ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｉｖ）第２及び／または第３のＴＩＬ集団を、転写因子（ＴＦ）及び／またはタンパク質発現を一過的に変化させることができる他の分子に曝露することであって、ＴＦ及び／またはタンパク質発現を一過的に変化させることができる他の分子が、腫瘍抗原の発現の変化及び／または治療的ＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する、曝露することと、を含む。

【１１２４】

いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８から選択されるが、これらに限定されない。特に、いくつかの実施形態では、ＴＦは、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２及びＩＬ－１８のうちの１つ以上の発現を変化させて、それらの発現を増加させる。

【１１２５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現を変化させることができるＴＦ及び／または分子への曝露は、滅菌エレクトロポレーションまたはＳＱＺマイクロ流体膜破壊によって媒介される。

【１１２６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現を変化させることができるＴＦ及び／または分子としては、少なくとも１つの短い干渉ＲＮＡまたは１つのメッセンジャーＲＮＡが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現を阻害するための短干渉ＲＮＡ。いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ＴＦ及び／またはタンパク質発現を変化させることができる分子に加えて、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。接着分子は、例えば、レトロウイルス（例えば、ガンマレトロウイルス）、またはレンチウイルス法によって挿入され得る。

【１１２７】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，

ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ ａｎｄ Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ ２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１２８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの２′－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ３）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄ－ＲＮＡ）によって誘導された発現の減少であり、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３′末端でコレステロールにコンジュゲートされた、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。ｓｄ－ＲＮＡを使用する方法は、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７，３５，２３８－２４８、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２９，８５５－８６４、及びＬｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，ｉｎ ｐｒｅｓｓ（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄ－ＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ、または他の方法を使用せず、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄ－ＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄ－ＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄ－ＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄ－ＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄ－ＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄ－ＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄ－ＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｄ－ＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄ－ＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成され、ｓｄ－ＲＮＡへの曝露は、培地に新鮮なｓｄ－ＲＮＡを添加することによって２、３、４、または５回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第２０１１／００３９９１４Ａ１号、同第２０１３／０１３１１４１Ａ１号、及び同第２０１３／０１３１１４２Ａ１号、ならびに米国特許第９，０８０，１７１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１１２９】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、図３２によるプロセスを使用して、製造中にＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ、及び／またはＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／またはｑＰＣＲによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１１３０】

１．ｓｄ－ＲＮＡ法

ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、ｓｄ－ＲＮＡをＴＩＬに首尾よく送達することができる。非対称ｓｉＲＮＡ構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、Ｌｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８及び米国特許公開第２０１６／０３０４８７３号を参照）は、ｓｄ－ＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単純に添加することによって、追加の製剤及び方法なしに、ｓｄ－ＲＮＡが培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性により、単に培地中のｓｄ－ＲＮＡの活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルのＲＮＡｉを介した減少を支援することができる。理論に拘束されることはないが、ｓｄ－ＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞で数ヶ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

【１１３１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの９５％を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定のｓｄ－ＲＮＡによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むｓｄ－ＲＮＡは、ＲＮＡｉ効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日間、６日間、７日間、または８日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、ＴＩＬのｓｄ－ＲＮＡ処理後１０日以上で低下する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持されるＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の減少により、ＴＩＬがより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡによるＰＤ－１の発現の減少は、ＴＩＬ増殖の増加をもたらす。

【１１３２】

ａ．ｓｄ－ＲＮＡの選択及び特徴

ｉ．ｓｄ－ＲＮＡオリゴヌクレオチド構造

短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮ

Ａ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。

【１１３３】

二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般に、ＲＮＡの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。ｓｉＲＮＡとは対照的に、ｄｓＲＮＡという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【１１３４】

ｓｄ－ＲＮＡ（自己送達可能なＲＮＡ）は、共有結合的に修飾された新たなクラスのＲＮＡｉ化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要とせず、従来のｓｉＲＮＡと比較して改善された薬理学的性質を有する。「自己送達可能なＲＮＡ」または「ｓｄ－ＲＮＡ」は、疎水的に修飾されたＲＮＡ干渉－アンチセンスハイブリッドであり、初代細胞においてインビトロで、及び局所投与時にインビボで非常に有効であることが実証されている。毒性のない強力な取り込み及び／またはサイレンシングが実証されている。ｓｄ－ＲＮＡは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。ｓｄ－ＲＮＡ分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。追加として、ｓｄ－ＲＮＡ分子は、本明細書に記載されるように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性コンジュゲートに結合することができる。ｓｄ－ＲＮＡ（及び／またはｓｄ－ＲＮＡと同様の方法で用いることができるＲＮＡ）及びかかるｓｄ－ＲＮＡを作製するための関連方法はまた、例えば、米国特許公開第２０１６／０３０４８７３号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１０／０３３２４６号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１７／０７０１５１号、国際特許出願公開第ＷＯ２００９／１０２４２７号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１／１１１９８８７号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１０／０３３２４７号、国際特許出願公開第ＷＯ２００９／０４５４５７号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１１／１１９８５２号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１１／１１９８７１号、米国特許公開第２０１１／０２６３６８０号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１０／０３３２４８号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１０／０７８５３６号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１０／０９０７６２号、米国特許公開第２０１１／００３９９１４号、国際公開第ＷＯ２０１１／１０９６９８号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１０／０９０７６２号、米国特許第８，８１５，８１８号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１６／０９４８４５号、国際特許出願公開第ＷＯ２０１７／１９３０５３号、米国特許公開第２００６／０２７６６３５号、国際特許出願公開第ＷＯ２００１／００９３１２号、米国特許公開第２０１７／００４３０２４号、米国特許公開第２０１７／０３１２３６７号、米国特許公開第２０１６／０３１９２７８号、米国特許公開第２０１７／０３６９８８２号、米国特許第８，５０１，７０６号、米国特許公開第２００４／０２２４４０５号、米国特許第８，２５２，７５５号、米国特許公開第２００７／００３１８４４号、米国特許公開第２００７／００３９０７２号、米国特許公開第２００７／０２０７９７４号、米国特許公開第２００７／０２１３５２０号、米国特許公開第２００７／０２１３５２１号、米国特許公開第２００７／０２１９３６２号、米国特許公開第２００７／０２３８８６８号、米国特許公開第２０１４／０１４８３６２号、米国特許公開第２０１６／０１９３２４２号、米国特許公開第２０１６／０１９４６４６１号、米国特許公開第２０１６／０２０１０５８号、米国特許公開第２０１６／０２０１０６５号、米国特許公開第２０１７／０３４９９０４号、米国特許公開第２０１８／０１１９１４４号、米国特許第７，８３４，１７０号、米国特許第８，０９０，５４２号、及び米国特許公開第２０１２／００５２４８７号（これらのすべてはあらゆる目的で参照によりそれら全体が本明細書組み込まれる）に包括的に記載されており、またｓｄ－ＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から商業入手可能である。ｓｄ－ＲＮＡ構造、化学、標的化位置、配列の好みなどを最適化するために、ｓｄ－ＲＮＡ力価予測用の専用ア

ルゴリズムが開発及び利用されている（例えば、ＵＳ２０１６／０３０４８７３を参照）。これらの分析に基づいて、機能的なｓｄ－ＲＮＡ配列は、一般に、１μＭの濃度で７０％を超える発現の減少を有すると定義されており、確率は４０％を超える。

【１１３５】

ｉｉ．ｓｄ－ＲＮＡオリゴヌクレオチド構造

いくつかの実施形態では、本発明で使用するための１つ以上のｓｄ－ＲＮＡは、直鎖二本鎖ＤＮＡテンプレートから生成することができる。いくつかの実施形態では、１つ以上のｓｄ－ＲＮＡを生成するための線形二本鎖ＤＮＡテンプレートは、米国特許第８，８５９，２２９号に記載されているもの、及び以下に記載されているものである。

【１１３６】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって取得され、ｍＲＮＡのインビトロ転写に適した線形二本鎖ＤＮＡテンプレートは、５’～３’：二本鎖ＤＮＡのコード鎖上のＲＮＡポリメラーゼプロモーター、長さが３，０００ヌクレオチド未満であり、真核細胞へのトランスフェクション後のｍＲＮＡの検出可能なポリペプチドへの翻訳に有効な５’非翻訳領域、ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ポリペプチドは、トランスフェクトされる細胞に対して異種であり、ポリペプチドは、免疫細胞のリガンドまたは受容体、免疫系の機能を刺激または阻害するポリペプチド、及び発がん性ポリペプチドの機能を阻害するポリペプチドから選択される）、真核細胞へのトランスフェクション後のｍＲＮＡの検出可能なポリペプチドへの翻訳に有効な３’非翻訳領域、ならびに二本鎖ＤＮＡのコード鎖上の５０～５，０００ヌクレオチドのポリ（Ａ）ストレッチを含み、プロモーターは、オープンリーディングフレームに対して異種であり、ＤＮＡテンプレートは、ＤＮＡベクター内に含まれず、ポリ（Ａ）ストレッチの３’末端で終端する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、Ｔ７、Ｔ３またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼからなる群から選択されるＲＮＡポリメラーゼのコンセンサス結合配列を含む。いくつかの実施形態では、このオープンリーディングフレームは、融合ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、オープンリーディングフレームは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、線形二本鎖は、内部リボソーム侵入部位をさらに含む。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）ストレッチは、３００～４００ヌクレオチド長である。

【１１３７】

いくつかの実施形態では、請求項１に記載の線形二本鎖ＤＮＡテンプレートであり、５’～３’テンプレートは、二本鎖ＤＮＡのコード鎖上のＲＮＡポリメラーゼプロモーター、長さが３，０００ヌクレオチド未満であり、真核細胞へのトランスフェクション後のｍＲＮＡの検出可能なポリペプチドへの翻訳に有効な５’非翻訳領域、ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム（ポリペプチドは、トランスフェクトされる細胞に対して異種であり、ポリペプチドは、免疫細胞のリガンドまたは受容体、免疫系の機能を刺激または阻害するポリペプチド、及び発がん性ポリペプチドの機能を阻害するポリペプチドから選択される）、真核細胞へのトランスフェクション後のｍＲＮＡの検出可能なポリペプチドへの翻訳に有効な３’非翻訳領域、ならびに二本鎖ＤＮＡのコード鎖上の５０～５，０００ヌクレオチドのポリ（Ａ）ストレッチからなり、プロモーターは、オープンリ

ーディングフレームに対して異種であり、ＤＮＡテンプレートは、ＤＮＡベクター内に含まれず、ポリ（Ａ）ストレッチの３’末端で終端する。いくつかの実施形態では、３’非翻訳領域は、少なくとも１００ヌクレオチド長である。

【１１３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、上記の線形二本鎖ＤＮＡテンプレートを生成する方法を提供し、方法は、順方向プライマー及び逆方向プライマーを生成することを含み、順方向プライマーは、目的の標的二本鎖ＤＮＡの非コード鎖に実質的に相補的な複数のヌクレオチドと、ＲＮＡポリメラーゼの結合部位として機能する複数のヌクレオチドとを含み、逆方向プライマーは、目的の標的二本鎖ＤＮＡのコード鎖に実質的に相補的な複数のヌクレオチドと、複数のデオキシチミジンヌクレオチドとを含み、順方向プライマー及び逆方向プライマーを使用して標的ＤＮＡのポリメラーゼ連鎖反応増幅を行い、線形二本鎖ＤＮＡテンプレートを形成する。いくつかの実施形態では、本発明は、上記の線形二本鎖ＤＮＡテンプレートを生成する方法を提供し、方法は、順方向プライマー及び逆方向プライマーを生成することを含み、順方向プライマーは、目的の標的二本鎖ＤＮＡの直接上流のヌクレオチド領域に実質的に相補的である複数のヌクレオチドを含み、逆方向プライマーは、目的の標的二本鎖ＤＮＡの直接下流のヌクレオチド領域に実質的に相補的である複数のヌクレオチドを含み、順方向プライマー及び逆方向プライマーを使用して標的ＤＮＡのポリメラーゼ連鎖反応増幅を行い、線形二本鎖ＤＮＡテンプレートを形成する。いくつかの実施形態では、プライマーは、目的の二本鎖ＤＮＡの５’及び３’非翻訳領域におけるヌクレオチドのストレッチに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、プライマーは、目的の二本鎖ＤＮＡのオープンリーディングフレーム内のヌクレオチドのストレッチに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、プライマーは、目的の二本鎖ＤＮＡのオープンリーディングフレーム内のヌクレオチドのストレッチに実質的に相補的なヌクレオチド配列を含み、プライマーは、５’及び３’非翻訳領域を含むヌクレオチドのストレッチをさらに含み、５’非翻訳領域を含む順方向プライマー内のヌクレオチドのストレッチは、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むヌクレオチドと、目的の標的二本鎖ＤＮＡの非コード鎖に実質的に相補的なヌクレオチドとの間にあり、３’非翻訳領域を含む逆方向プライマー内のヌクレオチドのストレッチは、複数のデオキシチミジンヌクレオチドと、目的の標的二本鎖ＤＮＡのコード鎖に実質的に相補的なヌクレオチドとの間にある。いくつかの実施形態では、順方向プライマー及びオープンリーディングフレームは、コンセンサスＫｏｚａｋ配列を含む。

【１１３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞のトランスフェクションのための１つ以上のＲＮＡを生成する方法であって、線形二本鎖ＤＮＡテンプレートからインビトロ転写を行うことを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、ポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用して、ＲＮＡのポリ（Ａ）尾部を、１つ以上のアデニンヌクレオチドまたはその類似体で伸長することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、転写中に、転写されたＲＮＡの５’キャップとして機能するヌクレオチドを添加することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドを標的とする。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドを標的とする。

【１１４０】

いくつかの実施形態では、本発明は、線形二本鎖ＤＮＡテンプレートから産生される、１つ以上のオープンリーディングフレームを含む１つ以上の単離されたＲＮＡの使用を用いる。いくつかの実施形態では、本発明は、線形二本鎖ＤＮＡテンプレートから産生される１つ以上のＲＮＡと細胞を接触させることを含む、細胞内で１つ以上のＲＮＡを発現させるための方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、細胞内のＲＮＡの別個の発現レベルを提供するために、不等なモル量で存在する。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡは、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドを標的とする。いくつかの実施形態では、１つ以上のＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるポリペプチドを標的とする。

【１１４１】

非翻訳領域

安定性及び／または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造を使用してもよい。ＲＮＡは、好ましくは、５’及び３’　ＵＴＲを有する。以下の実施例は、５’ＵＴＲのわずか６塩基対を含有するＰＣＲテンプレートと比較して、５’ＵＴＲの４４塩基対をＰＣＲテンプレートに含めることにより、転写されたＣＦＰ　ＲＮＡのより高い翻訳効率を可能にしたことを実証する。実施例はまた、３，ＵＴＲの１１３個の塩基対の添加が、３，ＵＴＲの１１個の塩基対のみを含有するＰＣＲテンプレートと比較して、転写されたＧＦＰ　ＲＮＡのより高い翻訳効率を可能にすることを実証する。概して、３’ＵＴＲの長さは１００ヌクレオチドを超えるため、１００ヌクレオチドより長い３’ＵＴＲが好ましい。いくつかの実施形態では、３’ＵＴＲ配列は、１００～５０００ヌクレオチドである。５’ＵＴＲの長さは、３’ＵＴＲの長さほど重要ではなく、より短くすることができる。いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、０～３０００ヌクレオチド長である。コード領域に付加される５’及び３’ＵＴＲ配列の長さは、限定されないが、ＵＴＲの異なる領域にアニールするＰＣＲのプライマーを設計することを含む、異なる方法によって変化させることができる。このアプローチを使用して、当業者は、転写されたＲＮＡのトランスフェクション後の最適な翻訳効率を達成するために必要な５’及び３’ＵＴＲ長を修飾することができる。

【１１４２】

５’及び３’ＵＴＲは、目的の遺伝子についての天然に存在する内在性５’及び３’ＵＴＲであり得る。代替的に、目的の遺伝子に内在性でないＵＴＲ配列は、ＵＴＲ配列を順方向プライマー及び逆方向プライマーに組み込むことによって、またはテンプレートの任意の他の修飾によって付加することができる。目的の遺伝子に内在性ではないＵＴＲ配列の使用は、ＲＮＡの安定性及び／または翻訳効率を修飾するために有用であり得る。例えば、３’ＵＴＲ配列におけるＡＵリッチエレメントがｍＲＮＡの安定性を減少させることができることは、公知である。したがって、３’ＵＴＲは、当該技術分野において周知であるＵＴＲの特性に基づいて転写されたＲＮＡの安定性を増加させるように選択または設計することができる。

【１１４３】

いくつかの実施形態では、５’ＵＴＲは、内在性遺伝子のＫｏｚａｋ配列を含有し得る。代替的に、目的の遺伝子に内在性ではない５’ＵＴＲが上記のＰＣＲによって付加されている場合、コンセンサスＫｏｚａｋ配列は、５’ＵＴＲ配列を付加することによって再設計することができる。Ｋｏｚａｋ配列は、いくつかのＲＮＡ転写物の翻訳の効率を増加

させることができるが、すべてのＲＮＡに対して効率的な転写を可能にするために必要とされるわけではないようである。多くのｍＲＮＡのＫｏｚａｋ配列の要件は、当該技術分野で知られている。他の実施形態では、５’ＵＴＲは、ＲＮＡウイルスに由来し得、そのＲＮＡゲノムは、細胞において安定である。他の実施形態では、様々なヌクレオチド類似体を３’または５’ＵＴＲにおいて使用して、ｍＲＮＡのエキソヌクレアーゼ分解を妨げることができる。

【１１４４】

ＲＮＡポリメラーゼプロモーター

遺伝子クローニングを必要とせずにＤＮＡテンプレートからのＲＮＡの合成を可能にするために、転写のプロモーターを、転写される配列の上流のＤＮＡテンプレートに付着させるべきである。バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼプロモーター配列は、ＤＮＡライゲーションなどの異なる遺伝子操作方法によってＳｔ　ＵＴＲに付着することができるか、または標的ＤＮＡに実質的に相補的である配列の順方向プライマー（５’）に付加することができる。ＲＮＡポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列が、順方向プライマーの５’末端に付加されると、ＲＮＡポリメラーゼプロモーターは、転写されるオープンリーディングフレームの上流のＰＣＲ生成物に組み込まれる。１つの好ましい実施形態では、プロモーターは、上記のようなＴ７ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとしては、Ｔ３及びＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。Ｔ７、Ｔ３及びＳＰ６プロモーターについてのコンセンサスヌクレオチド配列は、当該技術分野で知られている。

【１１４５】

ポリ（Ａ）尾部及び５’キャップ

好ましい実施形態では、ｍＲＮＡは、５’末端のキャップ及び３’ポリ（Ａ）尾部の両方を有し、これは、細胞におけるリボソーム結合、翻訳の開始、及び安定性ｍＲＮＡを決定する。環状ＤＮＡテンプレート、例えば、プラスミドＤＮＡでは、ＲＮＡポリメラーゼは、真核細胞における発現に好適でない長いコンカタマー生成物を産生する。３’ＵＴＲの末端で線状化されたプラスミドＤＮＡの転写は、転写後にポリアデニル化されていても真核生物トランスフェクションに有効ではない正常サイズのｍＲＮＡをもたらす。

【１１４６】

線形ＤＮＡテンプレート上で、ファージＴ７　ＲＮＡポリメラーゼは、転写産物の３’末端をテンプレートの最後の塩基を超えて伸長することができる（Ｓｃｈｅｎｂｏｒｎ ａｎｄ Ｍｉｅｒｅｎｄｏｒｆ，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，１３：６２２３－３６（１９８５、Ｎａｃｈｅｖａ ａｎｄ Ｂｅｒｚａｌ－Ｈｅｒｒａｎｚ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２７０：１４８５－６５（２００３）。これは、第２のＤＮＡ鎖とのテンプレート交換またはＲＮＡ自体の転写に続く流出転写物屈曲（Ｔｒｉａｎａ－Ａｌｏｎｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０：６２９８－３０７（１９９５）、Ｄｕｎｎ ａｎｄ Ｓｔｕｄｉｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６：４７７－５３５（１９８３）、Ａｒｎａｕｄ－Ｂａｒｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２６：３５５０－５４（１９９８）、Ｍａｃｄｏｎａｌｄ ｅｔ ａｌ．，１９９３）、次いで、遺伝子発現を阻害することができる二本鎖ＲＮＡの逆方向及び蓄積への異常転写をもたらし得る。ＤＮＡ線形化自体は、正しい転写には十分ではなく（Ｔｒｉａｎａ－Ａｌｏｎｓｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７０：６２９８－３０７（１９９５）、Ｄｕｎｎ ａｎｄ Ｓｔｕｄｉｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６：４７７－５３５（１９８３）、Ａｒｎａｕｄ－Ｂａｒｂｅ ｅｔ ａｌ．，１９９８ Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２６：３５５０－５４（１９９８）、Ｍａｃｄｏｎａｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３２：１０３０－４７（１９９３）、Ｎａｋａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，６４：１９４－９９（１９９９）、６４～１００ヌクレオチドのポリ（Ａ／Ｔ）ストレッチのプラスミドＤＮＡ線形化下流は、良好なテンプレートをもたらす（Ｓａｅｂｏｅ－Ｌａｒｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．，２５９：１９１－２０３（２００２）、

Ｂｏｃｚｋｏｗｓｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６０：１０２８－３４（２０００）、Ｅｌａｎｇｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｒｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ．，３３０：９５８－９６６ ２００５）。Ｔ７ ＲＮＡポリメラーゼの内因性終端シグナルは、ステムループ構造に折り畳むことができるＲＮＡ、続いてウリジン残基のトラックをコードする（Ｄｕｎｎ ａｎｄ Ｓｔｕｄｉｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１６６：４７７－５３５（１９８３）、Ａｒｎａｕｄ－Ｂａｒｂｅ ｅｔ ａｌ．，１９９８ Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２６：３５５０－５４（１９９８））。ヘアピンがなくても、合成されたウリジンのトラックは転写を減衰し得る（Ｋｉｙａｍａ ａｎｄ Ｏｉｓｈｉ，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２４：４５７７－４５８３（１９９６）。ポリ（Ａ／Ｔ）ストレッチの下流のプラスミドＤＮＡの線形化は、おそらく潜在的な異常転写を防止する一種の「動的」ターミネーターを形成したと仮定され、ポリ（Ａ／Ｔ）ストレッチ及び逆方向の転写を介したＲＮＡ転写物の３’伸長は、伸長されたポリ（Ｕ）ストレッチ及びポリ（Ａ／Ｕ）ヘアピンという成長している終端様シグナルを生成する。したがって、ＧＦＰ遺伝子の下流の３’アンカー配列及びポリ（Ｔ）の５’１００塩基ストレッチを有する逆ＰＣＲプライマーを設計した（図３８）。

【１１４７】

ＤＮＡテンプレートへのポリＡ／Ｔストレッチの組み込みの従来の方法は、分子クローニングである。しかしながら、プラスミドＤＮＡに組み込まれたポリＡ／Ｔ配列は、プラスミドの不安定性を引き起こす可能性があり、そのため、細菌細胞から得られたプラスミドＤＮＡテンプレートは、欠失及び他の異常で高度に汚染されることが多い。これにより、クローン化手順は、手間と時間がかかるだけでなく、しばしば信頼性が低くなる。そのため、非常に望ましいクローン化なしに、ポリＡ／Ｔ ３’ストレッチを有するＤＮＡテンプレートの構築を可能にする方法である。

【１１４８】

転写ＤＮＡテンプレートのポリＡ／Ｔセグメントは、ＰＣＲ中に、１００Ｔ尾部（サイズは５０～５０００Ｔであり得る）などのポリＴ尾部を含有する逆方向プライマーを使用することによって、またはＤＮＡライゲーションもしくはインビトロ組換えを含むがこれらに限定されない任意の他の方法によるＰＣＲ後に生成することができる。ポリ（Ａ）尾部はまた、ＲＮＡに安定性を提供し、それらの分解を低減する。一般に、ポリ（Ａ）尾部の長さは、転写されたＲＮＡの安定性と正の相関がある。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）尾部は、１００～５０００個のアデノシンである。以下の実施例は、ポリ（Ａ）の１００塩基対のストレッチが、ＲＮＡ転写物の効率的な翻訳を可能にするのに十分であることを実証する。

【１１４９】

ＲＮＡのポリ（Ａ）尾部は、Ｅ．ｃｏｌｉポリＡポリメラーゼ（Ｅ－ＰＡＰ）などのポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用して、インビトロ転写後にさらに伸長することができる。以下の実施例は、ポリ（Ａ）尾部の長さを１００ヌクレオチドから３００～４００ヌクレオチドの間に増加させると、ＲＮＡの翻訳効率が約２倍増加することを実証する。追加として、３’末端への異なる化学基の付着は、ｍＲＮＡの安定性を増加させることができる。かかる付着は、修飾／人工ヌクレオチド、アプタマー、及び他の化合物を含むことができる。例えば、ＡＴＰアナログは、ポリ（Ａ）ポリメラーゼを使用して、ポリ（Ａ）尾部に組み込むことができる。ＡＴＰ類似体は、ＲＮＡの安定性をさらに増加させることができる。好適なＡＴＰ類似体としては、コルジオシピン及び８－アザアデノシンが挙げられるが、これらに限定されない。

【１１５０】

５’キャップはまた、ＲＮＡ分子に安定性を提供することができる。好ましい一実施形態では、本明細書に開示される方法によって産生されるＲＮＡは、５’キャップを含む。５’キャップは、例えば、すべて市販されているｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ｇ、ｍ７Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａ、Ｇ（５’）ｐｐｐ（５’）ＧまたはＧ（５’）ｐｐｐ（５’）Ａキャップ類似体であってもよい。５’キャップはまた、抗リバースキャップ類似体（ＡＲＣ

Ａ）（Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ，７：１４６８－９５（２００１））または任意の他の好適な類似体であり得る。５’キャップは、当該技術分野で知られており、本明細書に記載されている技法を使用して提供される（Ｃｏｕｇｏｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．，２９：４３６－４４４（２００１）、Ｓｔｅｐｉｎｓｋｉ，ｅｔ ａｌ．，ＲＮＡ，７：１４６８－９５（２００１）、Ｅｌａｎｇｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，３３０：９５８－９６６（２００５））。

【１１５１】

本明細書に開示される方法によって産生されるＲＮＡはまた、内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）配列を含有し得る。ＩＲＥＳ配列は、ｍＲＮＡへのキャップ非依存性リボソーム結合を開始し、翻訳の開始を促進する任意のウイルス配列、染色体配列、または人工的に設計された配列であり得る。糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤、及び界面活性剤などの細胞透過性及び生存率を促進する因子を含むことができる細胞エレクトロポレーションに好適な任意の溶質を含むことができる。

【１１５２】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約１０μＭ、いくつかの実施形態では、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、

標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約５．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約６．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約７．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約８．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約９．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１０．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約１０μＭ／１０，０００ＴＩＬ、または約０．２５μＭ～約４μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約４．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約５．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約６．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約７．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明

で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約８．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約９．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１０．０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約０．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約２．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．２５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約３．７５μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約４．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約５．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約６．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列

は、約７．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約８．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約９．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場

合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄ－ＲＮＡ配列は、約１０．０μＭ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

【１１５３】

ｓｄ－ＲＮＡの修飾

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２′－Ｏ－メチル修飾、２′－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２′Ｆ修飾ヌクレオチド、２′－Ｏ－メチル修飾、及び／または２′デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。追加の特定の実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２′－Ｏ－アルキル（２′－Ｏ－メチル及び２′－０－エチルを含む）、すなわち、２′－アルコキシ、２′－アミノ、２′－Ｓ－アルキル、２′－ハロ（２′－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２′－アリルオキシ（－ＯＣＨ２ＣＨ＝ＣＨ２）、２′－プロパルギル、２′－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、記載されるオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る（Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．，１８：４７１１（１９９２）を参照）。

【１１５４】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第２の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【１１５５】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５のミスマッチを含む。

【１１５６】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、３’連結または５’連結を修飾することによって（例えば、米国特許第５，８４９，９０２号及びＷＯ９８／１３５２６）、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれ

かとして（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（ＣＨ２－ＣＨ２－ＣＨ３）、グリコール（－Ｏ－ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ－）ホスフェート（ＰＯ３２’’）、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５’及び３’末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【１１５７】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、代替の連結、例えば、ホスホロチオエート連結によって結合されている。

【１１５８】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、または５００増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｃ残基またはＵ残基の少なくとも一方が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵのすべてが疎水性修飾を含む。

【１１５９】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡは、プロトン化可能なアミンの組み込みによりｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子の増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｄ－ＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣ侵入に必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｄ－ＲＮＡ化合物は、安定性を提供し、かつＲＩＳＣ侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。

【１１６０】

ガイド鎖は、例えば、ＲＩＳＣ侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２’Ｆが修飾され、かつ５’末端がリン酸化されたＣ及びＵヌクレオチドの大部分を含む。

【１１６１】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％

、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【１１６２】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満または１２ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【１１６３】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたｓｄ－ＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間以上、または２４時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ｒｘＲＮＡは、１２時間以上の培地中での半減期を有する。

【１１６４】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得る一方で、２′－フルオロ（２′Ｆ）修飾の２′－０－メチル（２′ＯＭｅ）修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２′Ｆ含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、２′Ｆ修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【１１６５】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ１８～１９ヌクレオチド長であり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４個、または１４個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３′末端にあるか、５′末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３′末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る２′Ｆ及び／または２′ＯＭｅ修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５′側のヌクレオチド）は、２′ＯＭｅ修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾

されている場合もある。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も３′側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣ及びＵの大部分は２′Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置１及び位置１１～１８のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２′Ｆ修飾されている。

【１１６６】

ｓｄ－ＲＮＡの送達

自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくＲＮＡｉ剤で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、及び使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、ｓｄ－ＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄ－ＲＮＡｉ法により、化学合成された化合物をエクスビボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載のｓｄ－ＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１１６７】

ｓｄ－ＲＮＡ分子の一般的な構造を図３６に示す。ｓｄ－ＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ－ンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され、例えば、Ｂｙｒｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２０１３，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，２９（１０）：８５５－８６４（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【１１６８】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡオリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載のＴＩＬに送達され得る。

【１１６９】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達系と組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達系は、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。

【１１７０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＲＮＡまたはｓｄ－ＲＮＡなどのオリゴヌクレオチドは、異なる方法、例えば、エレクトロポレーション（Ａｍａｘａ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ－ＩＩ（Ａｍａｘａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃｏｌｏｇｎｅ，Ｇｅｒｍａｎｙ））、（ＥＣＭ ８３０（ＢＴＸ）（Ｈａｒｖａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）、ＮｅｏｎＴＭトランスフェクション系（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、及び／またはＧｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ ＩＩ（ＢｉｏＲａｄ，Ｄｅｎｖｅｒ，ＣＯ）、Ｍｕｌｔｉｐｏｒａｔｏｒ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｔ，Ｈａｍｂｕｒｇ Ｇｅｒｍａｎｙ）、リポフェクションを使用したカチオン性リポソーム媒介トランスフェクション、ポリマーカプセル化、ペプチド媒介トランスフェクション、または「遺伝子銃」などの生物学的粒子送達系（例えば、Ｎｉｓｈｉｋａｗａ，ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，１２（８）：８６１－７０（２００１）（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を含むが、これらに限定されない市販の方法を使用して、標的細胞に導入することができる。また、米国特許第８，８５９，２２９号、米国特許出願第２０１６／０２３０１８８号、ならびにＡｍａｘａ Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（登録商標）ＩＩマニュアル（ワールドワイドウェブ上、ｈｔｔｐ：

／／ｉｃｏｂ．ｓｉｎｉｃａ．ｅｄｕ．ｔｗ／ｐｕｂｗｅｂ／ｂｉｏ－ｃｈｅｍ／Ｃｏｒｅ％２０Ｆａｃｉｌｉｔｉｅｓ／Ｄａｔａ／Ｒ４０１－ｃｏｒｅ／Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ＿Ｍａｎｕａｌ＿ＩＩ＿Ａｐｒ０６．ｐｄｆで入手可能）も参照されたい。

【１１７１】

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、製造業者の推奨に従って、Ａｍａｘａ ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ．ＴＭ．－ＩＩを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ．ＴＭ．－ＩＩ溶液Ｖ及びエレクトロポレーションのための推奨レジームのセットを使用してトランスフェクトされ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、溶液Ｖ、Ｔ及びＲ、ならびにエレクトロポレーションの異なるレジメンを使用してトランスフェクトされ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｔ細胞ＮＵＣＬＥＯＦＥＣＴＯＲ．ＴＭ．－ＩＩ溶液及び異なるエレクトロポレーションレジームを使用してトランスフェクトされ得る。核酸送達の代替方法もまた、使用される本明細書に記載のオリゴヌクレオチドをトランスフェクトするために用いることができ、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクションは、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮまたはＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して実施した。エレクトロポレーションはまた、ＥＣＭ ８３０（ＢＴＸ）（Ｈａｒｖａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）、Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ ＩＩ（ＢｉｏＲａｄ，Ｄｅｎｖｅｒ，ＣＯ）、Ｍｕｌｔｉｐｏｒａｔｏｒ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ，Ｈａｍｂｕｒｇ Ｇｅｒｍａｎｙ）、及び／またはＮｅｏｎＴＭトランスフェクション系（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡから市販されている）でも実施した。いくつかの実施形態では、ｐｍａｘＧＦＰプラスミドＤＮＡ（Ａｍａｘａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）をＤＮＡ対照として用いることができる。いくつかの実施形態では、トランスフェクションの効率（ＥＴ）は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）によるトランスフェクションのおよそ３、６、９、１２、１５、及び／または１８時間後に決定することができる。いくつかの実験では、ＧＦＰ対照に対してＧＦＰがもはや検出されなくなるまで、トランスフェクタントを１２時間～２４時間毎にさらに分析することができる。いくつかの実施形態では、細胞生存率は、トリパンブルー染料の除外によって決定され得る。

【１１７２】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄ－ＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または拡張中（例えば、ステップＤの前またはステップＤ中）、ステップＤ後及びステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終製剤化及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップＦにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄ－ＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄ－ＲＮＡ標的遺伝子が、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、及び１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄ－ＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、または１０μＭ ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００

μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄ－ＲＮＡ標的遺伝子は、ＲＥＰ前段階またはＲＥＰ段階中に１日２回、１日１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄ－ＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、０．５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、０．７５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、１μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、１．２５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、１．５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、２μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、または１０μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬからなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄ－ＲＮＡ標的遺伝子は、第１、第２、及びまたは追加の拡張ステージ中に１日２回、１日１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。

【１１７３】

ｓｄ－ＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にｓｄ－ＲＮＡを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡張プロセス中に本明細書に記載のＴＩＬと接触することができる。いくつかの実施形態では、高濃度は、０．１μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、０．５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、０．７５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、１μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、１．２５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，００ＴＩＬ、１．５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、２μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、または１０μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、高濃度は、２μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ、または１０μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、高濃度は、５μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬまたは最大１０μＭ　ｓｄ－ＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬを含む。

【１１７４】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、または例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、ＷＯ９０／１４０７４、ＷＯ９１／１６０２４、ＷＯ９１／１７４２４、米国特許第４，８９７，３５５号、Ｂｅｒｇａｎ　ｅｔ　ａｌ　１９９３．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２１：３５６７）を使用したカチオン性、アニオン性、または中性脂質組成物またはリポソームを使用するトランスフェクションによって増強され得る。

【１１７５】

ｓｄ－ＲＮＡの組み合わせ

いくつかの実施形態では、１つを超えるｓｄ－ＲＮＡが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨを標的とするｓｄ－ＲＮＡのうちの１つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１　ｓｄ－ＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３　ｓｄ－ＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、ＣＩＳＨを標的とするｓｄ－ＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつか

の実施形態では、本明細書におけるＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｄ－ＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｄ－ＲＮＡは、図３６または図３７に示される構造を有する。

【１１７６】

いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３のうちの１つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＴＬＡ－４を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－Ｒ

ＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄ－ＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。

【１１７７】

共刺激受容体または接着分子の過剰発現

追加の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中にＴＩＬのタンパク質発現を変化させることは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させることもできる。例えば、タンパク質発現を変化させると、刺激受容体の発現が増強され得、これは、遺伝子修飾されていない刺激受容体の発現と比較して、それが過剰発現されることを意味する。本発明のＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることによって増強された発現を示し得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１などのある特定のケモカイン受容体及びインターロイキンが含まれる。

【１１７８】

ＣＣＲ及びＣＣＬ

養子Ｔ細胞免疫療法が有効であるためには、Ｔ細胞をケモカインによって腫瘍内に適切に輸送する必要がある。腫瘍細胞によって分泌されるケモカイン、末梢に存在するケモカイン、及びＴ細胞によって発現されるケモカイン受容体との間の一致は、Ｔ細胞の腫瘍床への輸送を成功させるために重要である。

【１１７９】

特定の実施形態によれば、本発明のタンパク質発現方法の変更を使用して、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及び／またはＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上などのＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増加させてもよい。ＣＣＲの過剰発現は、エフェクター機能及び養子移植後のＴＩＬの増殖を促進するのに役立ち得る。いくつかの実施形態では、本発明のタンパク質発現方法の変更を使用して、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７のＴＩＬにおける発現を増加させてもよい。

【１１８０】

特定の実施形態によれば、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及び／またはＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、または図２０及び２１に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部分を、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及び／またはＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上の発現を増強することによって遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ケモカイン受容体遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増強することができる。

【１１８１】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子は、本明細書に記載のガンマ－レトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ＣＸＣＲ２接着分子は、Ｆｏｒｇｅｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０１７，８，９０８またはＰｅｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，５４５８（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようなガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。

【１１８２】
インターロイキン及びその他
追加の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１、及びまた、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）のうちの１つ以上などのある特定のインターロイキンの発現を増加させてもよい。ある特定のインターロイキンは、Ｔ細胞のエフェクター機能を増加させ、腫瘍制御を媒介することが実証されている。
【１１８３】
遺伝子編集プロセス
概要：ＴＩＬ拡張＋遺伝子編集
本発明の実施形態は、ＴＩＬ集団を拡張するための方法に関し、本方法は、それらの治療効果を増強するために、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、ＤＮＡが細胞のゲノム内で永続的に修飾され、例えば、ＤＮＡが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）または阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）させる。他の実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現を増強させる（例えば、過剰発現を引き起こすことによって）。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は、ＴＩＬの治療的集団の有効性を増強するために使用される。
【１１８４】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って実行することができ（例えば、プロセス２Ａとして知られる例示的なＴＩＬ拡張法を以下に記載する）、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。さらなる実施形態によれば、ＴＩＬを治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３（これらは参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法のいずれかの実施形態に従って実行され、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。したがって、本発明のある実施形態は、本明細書に記載される任意の実施形態に従って拡張された治療的ＴＩＬ集団を提供し、治療的集団の少なくとも一部は遺伝子編集されており、例えば、注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、永続的に遺伝子編集される。遺伝子編集プロセスの特定の実施形態は、本明細書、ならびにＰＣＴ／２０１９／０２９２８６及びＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０１２７２９に詳細に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【１１８５】
ＴＩＬ拡張中の遺伝子編集のタイミング
いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団

を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｇ）方法中の任意の時点で、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することと、を含む。

【１１８６】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、腫瘍微小環境を調節して、投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進する１つ以上のサイトカインの発現を引き起こす、ＴＩＬの遺伝子修飾をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＮＦＡＴ－ＩＬ－１８発現カセットを用いたＴＩＬの形質導入を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬにＩＬ－１８を過剰発現させる遺伝子修飾をもたらす。ＮＦＡＴ－ＩＬ－１８発現カセットのＤＮＡ配列の例を図３４に示す。

【１１８７】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬにオルト－ＩＬ２受容体を発現させる遺伝子修飾をもたらす。

【１１８８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬに、投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進するように腫瘍微小環境を調節する薬物応答性ドメイン（ＤＲＤ）サイトカイン構築物を発現させる遺伝子修飾をもたらし、発現されたＤＲＤサイトカインは、ＤＲＤサイトカインのＤＲＤに結合してサイトカインを活性化する外因性に投与されたリガンドによって活性化される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２であり得る。

【１１８９】

したがって、いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬにＩＬ２－融合タンパク質を発現させる遺伝子修飾をもたらし、ＩＬ－２融合タンパク質は、対象への薬物のその後の投与に応答してＩＬ－２を放出する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＩＬ－２－ＤＲＤであってもよく、ＤＲＤは、投与された薬物に応答してＩＬ－２から分離するように選択される。

【１１９０】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬにＩＬ２－融合タンパク質を発現させる遺伝子修飾をもたらし、ＩＬ－２融合タンパク質は、対象への薬物のその後の投与に応答してＩＬ－２活性を抑制する。いくつかの実施形態では、ＤＲＤは、投与された薬物に応答してＩＬ－２の活性ドメインをマスクするように選択される。

【１１９１】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬに二重ＩＬ－１５－ＩＬ－２１タンパク質を発現させる遺伝子修飾をもたらす。

【１１９２】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＴＩＬに、１つ以上の結合パートナーを介して、ＴＩＬへの外因性に投与されたサイトカイン担体の結合を可能にする１つ以上の結合パートナーを発現させる遺伝子修飾をもたらす。いくつかの実施形態では、結合パートナーは、ＴＩＬのために細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に伸長してもよい。

【１１９３】

いくつかの実施形態では、結合パートナーは、（ｉ）セグメントがＴＩＬの細胞膜に固定されるように、Ｃ末端またはＣ末端に近接する疎水性アミノ酸のセグメント、及び（ｉ

ｉ）セグメントから細胞外に伸長する抗原またはエピトープ結合ドメインを有するタンパク質またはペプチドを含む。

【１１９４】

例えば、いくつかの実施形態では、結合パートナーは、抗体の抗原結合断片を含み、サイトカイン担体は、結合パートナーが抗原を認識し、サイトカイン担体に結合するように、抗体によって認識される抗原の少なくとも一部分を含み得る。いくつかの実施形態では、結合パートナーは、ｓｃＦｖの可変断片であり得る。そのような実施形態では、サイトカイン担体は、結合パートナーがエピトープを認識し、結合するように、そこから伸長するエピトープ（例えば、ペプチドエピトープ）を含み得る。

【１１９５】

いくつかの実施形態では、結合パートナーは、抗体の抗原結合断片によって認識される抗原を含み、サイトカイン担体は、抗原結合断片が抗原を認識し、サイトカイン担体をＴＩＬ細胞表面の結合パートナーに結合するように、少なくとも抗体の抗原結合断片を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗原結合断片は、ｓｃＦｖの可変断片であり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞は、ｓｃＦｖの可変断片がエピトープを認識し、結合するように、そこから伸長するエピトープ（例えば、ペプチドエピトープ）を含んでもよい。

【１１９６】

いくつかの実施形態では、結合パートナーは、結合パートナーがＴＩＬの細胞膜に細胞外に固定されることを可能にするグリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーを含んでもよい。そのような実施形態では、結合パートナーは、結合パートナーがサイトカイン担体と結合することを可能にするサイトカイン担体上に提供される抗体によって認識され得るＴＩＬ上に表示される抗原を含み得る。Ｂｒｏｗｎ　ａｎｄ　Ｗａｎｅｃｋ（３（４）Ｊ．Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｎｅｐｈｒ．１９９２，８９５－９０６）は、ＧＰＩ固体タンパク質の詳細なレビューを提供する。

【１１９７】

本明細書に記載の遺伝子編集技法のうちのいずれかは、ＴＩＬに本明細書に記載の１つ以上の結合パートナーを発現させるように、ＴＩＬにおける遺伝子修飾を誘導するために使用され得る。

【１１９８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、以下の、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）を含む群から選択される免疫チェックポイント遺伝子のうちの１つ以上の発現を減少させる遺伝子修飾をもたらす。

【１１９９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、投与されたＴＩＬに、腫瘍微小環境を調節して、投与されたＴＩＬ集団の拡張を促進する、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上でサイトカイン担体を発現させる遺伝子修飾を引き起こし、担体は、修飾されたＴＩＬの細胞膜に固定された疎水性尾部から細胞外に伸長する結合パートナーに連結し、（ｉ）クリック化学による漸進的シェディング、及び（ｉｉ）腫瘍微小環境における酸化還元反応または酵

素切断の一方または両方によって、その内容物を放出する。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせの群から選択され得る。

【１２００】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【１２０１】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１２０２】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子編集は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。別の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【１２０３】

別の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１２０４】

別の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１２０５】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例

えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【１２０６】

ＯＫＴ－３に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＯＫＴ－３を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＯＫＴ－３に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

【１２０７】

４－１ＢＢアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始する４－１ＢＢを含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中で４－１ＢＢアゴニストに曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢが細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

【１２０８】

ＩＬ－２に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＩＬ－２を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＩＬ－２に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

【１２０９】

上述のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはＩＬ－２は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれる。ある実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。別の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト、及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上を、拡張プロセス中の１つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

【１２１０】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩ

Ｌ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含む。

【１２１１】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法を使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたＴＩＬ集団を提供することができる。

【１２１２】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、製造中にＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ、及び／またはＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／またはｑＰＣＲによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１２１３】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％の

減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

【１２１４】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２’Ｆ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－メチル修飾、及び／または２’デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。追加の特定の実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２’－Ｏ－アルキル（２’－Ｏ－メチル及び２’－０－エチルを含む）、すなわち、２’－アルコキシ、２’－アミノ、２’－Ｓ－アルキル、２’－ハロ（２’－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２’－アリルオキシ（－ＯＣＨ２ＣＨ＝ＣＨ２）、２’－プロパルギル、２’－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、記載されるオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る（Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１８：４７１１（１９９２））。

【１２１５】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第２の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【１２１６】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５のミスマッチを含む。

【１２１７】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、３’連結または５’連結を修飾することによって（例えば、米国特許第５，８４９，９０２号及びＷＯ９８／１３５２６）、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（ＣＨ２－ＣＨ２－ＣＨ３）、グリコール（－Ｏ－ＣＨ２－ＣＨ２－Ｏ－）ホスフェート（ＰＯ３２’’）、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５’及び３’末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【１２１８】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、代替の連結、例えば、ホスホロチオエート連結によって結合されている。

【１２１９】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、または５００増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｃ残基またはＵ残基の少なくとも一方が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵのすべてが疎水性修飾を含む。

【１２２０】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡは、プロトン化可能なア

ミンの組み込みによりｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子の増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣ侵入に必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間連結が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｄＲＮＡ化合物は、安定性を提供し、かつＲＩＳＣ侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。

【１２２１】

ガイド鎖は、例えば、ＲＩＳＣ侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２′Ｆが修飾され、かつ５′末端がリン酸化されたＣ及びＵヌクレオチドの大部分を含む。

【１２２２】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【１２２３】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満または１２ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【１２２４】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたｓｄＲＮＡまたはｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間以上、または２４時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、ｓｄ－ｒｘＲＮＡは、１２時間以上の培地中での半減期を有する。

【１２２５】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得る一方で、２′－フルオロ（２′Ｆ）修飾の２′－０－メチル（２′ＯＭｅ）修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２′Ｆ含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、２′Ｆ修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【１２２６】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ１８～１９ヌクレオチド長であり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４個、または１４個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３′末端にあるか、５′末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３′末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る２′Ｆ及び／または２′ＯＭｅ修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５′側のヌクレオチド）は、２′ＯＭｅ修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されている場合もある。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も３′側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣ及びＵの大部分は２′Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置１及び位置１１～１８のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２′Ｆ修飾されている。

【１２２７】

自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくＲＮＡｉ剤で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、及び使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄＲＮＡｉ法により、化学合成された化合物をエクスビボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載のｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１２２８】

ｓｄＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ－ンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され、例えば、Ｂｙｒｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ　２０１３，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，２９（１０）：８５５－８６４（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）

に開示されている。

【１２２９】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載のＴＩＬに送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためにＴＩＬ集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【１２３０】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達系と組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達系は、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団にｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達系の使用を含む。

【１２３１】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または拡張中（例えば、ステップＤの前またはステップＤ中）、ステップＤ後及びステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終製剤化及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップＦにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子が、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、及び１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、または１０μＭ　ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、ＲＥＰ前段階またはＲＥＰ段階中に１日２回、１日１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。

【１２３２】

ｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にｓｄＲＮＡを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡張プロセス中に本明細書に記載のＴＩＬと接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ＴＩＬ集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、ｓｄＲＮＡを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をＴＩＬ集団と接触させることとを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１２３３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、

ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法（例えば、ＷＯ９０／１４０７４、ＷＯ９１／１６０２４、ＷＯ９１／１７４２４、米国特許第４，８９７，３５５号、Ｂｅｒｇａｎ　ｅｔ　ａｌ　１９９３．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ．２１：３５６７）を使用したカチオン性、アニオン性、または中性脂質組成物またはリポソームを使用するトランスフェクションによって増強され得る。

【１２３４】

いくつかの実施形態では、１つを超えるｓｄＲＮＡが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨを標的とするｓｄＲＮＡのうちの１つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１　ｓｄＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３　ｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、ＣＩＳＨを標的とするｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１２３５】

いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３のうちの１つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。

【１２３６】

２．トランスポゾン／トランスポザーゼ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に

記載されるように実行することができ、この方法は、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のｐｉｇｇｙＢａｃ法の使用は、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部の細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こす。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ拡張プロセス中のｐｉｇｇｙＢａｃ法の使用は、１つ以上の結合パートナーを介して、外因的に投与されたサイトカイン担体のＴＩＬへの結合を可能にする、１つ以上の結合パートナーの発現を引き起こす。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のｐｉｇｇｙＢａｃ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、修飾される（例えば、抑制または増強される）１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１２３７】

ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンは、ドナーベクターと宿主染色体との間で効率的に転置する移動性遺伝子要素である。この系は、カーゴ制限がほとんどなく、完全に可逆的であり、切除後にゲノムに足跡を残さない。ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン／トランスポザーゼ系は、トランスポゾンカセットの両側に位置するｐｉｇｇｙＢａｃ特異的逆位末端反復配列（ＩＴＲ）を認識するトランスポザーゼからなる。トランスポザーゼは、転置因子を切除して、哺乳動物ゲノムの真染色体領域に優先的に位置するＴＴ／ＡＡ染色体部位に組み込む（Ｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．２００５、Ｃａｄｉｎａｎｏｓ ａｎｄ Ｂｒａｄｌｅｙ ２００７、Ｗｉｌｓｏｎ ｅｔ ａｌ．２００７、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００８、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．２０１１）。

【１２３８】

例示的なｐｉｇｇｙＢａｃ系としては、ＷＯ２０１９／０４６８１５号に記載されているものが挙げられ、その内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃ系は、トランスポゾン／トランスポザーゼ系を含む。

【１２３９】

いくつかの実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃ法は、ＴＩＬに、（ａ）トランスポザーゼ酵素をコードする配列を含む核酸またはアミノ酸配列、及び（ｂ）トランスポゾンをコードするＤＮＡ配列を含む組換えＤＮＡ配列及び非天然に存在するＤＮＡ配列を送達することを含む。

【１２４０】

いくつかの実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、ｍＲＮＡ配列である。いくつかの実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、ＤＮＡ配列である。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ配列である。いくつかの実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、アミノ酸配列である。タンパク質スーパーｐｉｇｇｙｂａｃトランスポザーゼ（ＳＰＢ）は、トランスポゾンＤＮＡとのプレインキュベーションの後に送達されてもよい。

【１２４１】

本明細書に記載の対象ＴＩＬを遺伝子修飾するために使用され得る例示的なトランスポゾン／トランスポザーゼ系には、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゾン及びト

ランスポザーゼ、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒトランスポゾン及びトランスポザーゼ、ならびにＴｏｌ２トランスポゾン及びトランスポザーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【１２４２】

ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼは、トランスポゾンの末端にあるトランスポゾン特異的反転末端反復配列（ＩＴＲ）を認識し、ＩＴＲ間の内容物をＴＴＡＡ染色体部位に移動させる。ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン系は、ＩＴＲ間に含まれ得る関心対象の遺伝子のペイロード制限を有していない。いくつかの実施形態では、トランスポゾンは、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾンである。

【１２４３】

ｐｉｇｇｙＢａｃ及びｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼ及びトランスポゾンの例としては、例えば、ＷＯ２０１９／０４６８１５に開示されるものが挙げられ、その内容は参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼは、高活性である。高活性ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼは、それが由来する天然に存在するバリアントよりも活性が高いトランスポザーゼである。いくつかの実施形態では、高活性ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼ酵素は、Ｂｏｍｂｙｘ ｍｏｒｉから単離されるか、または誘導される。高活性アミノ酸置換のリストは、米国特許第１０，０４１，０７７号に見出すことができ、その内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼは、組み込み欠損である。いくつかの実施形態では、組み込み欠損ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼは、その対応するトランスポゾンを切除することができるが、対応する野生型トランスポザーゼよりも低い頻度で切除されたトランスポゾンを組み込むトランスポザーゼである。組み込み欠損アミノ酸置換のリストは、米国特許第１０，０４１，０７７号に見出すことができ、その内容は、参照によりそれら全体が組み込まれる。

【１２４４】

いくつかの実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾンは、ｐｉｇｇｙＢａｃまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼによって、標的核酸内の配列５′－ＴＴＡＴ－３に挿入することができる。いくつかの実施形態、特に、トランスポゾンがｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼである。いくつかの実施形態、特に、トランスポゾンがｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、ｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼである。いくつかの実施形態、及び特に、トランスポゾンがｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）またはＳｕｐｅｒ ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）（ＳＰＢ）トランスポザーゼである。いくつかの実施形態、及び特に、トランスポザーゼがＳｕｐｅｒ ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）（ＳＰＢ）トランスポザーゼである実施形態では、トランスポザーゼをコードする配列は、ｍＲＮＡ配列である。

【１２４５】

ｓｌｅｅｐｉｎｇ ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ）トランスポゾンは、ＩＴＲを認識するＳｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼによって標的ゲノムに転置され、ＩＴＲ間の内容物をＴＡ染色体部位に移動させる。いくつかの実施形態では、トランスポゾンは、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゾンである。いくつかの実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ酵素である（例えば、米国特許第９，２２８，１８０号（その内容は、その全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。いくつかの実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼは、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ１００Ｘ）トランスポザーゼである。

【１２４６】

Ｈｅｌｒａｉｓｅｒトランスポゾンは、Ｈｅｌｉｔｒｏｎトランスポザーゼによって転

置される。他のトランスポザーゼとは異なり、Ｈｅｌｉｔｒｏｎトランスポザーゼは、ＲＮａｓｅ－Ｈ様触媒ドメインを含まず、代わりに、複製開始ドメイン（Ｒｅｐ）及びＤＮＡヘリカーゼドメインからなるＲｅｐＨｅｌモチーフを含む。Ｒｅｐドメインは、ＨＵＨスーパーファミリーのヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインである。いくつかの実施形態では、トランスポゾンは、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒトランスポゾンである。Ｈｅｌｒａｉｓｅｒトランスポゾン配列のいくつかの実施形態では、トランスポザーゼは、ＬＴＳ及びＲＴＳと呼ばれる左及び右の末端配列に隣接している。いくつかの実施形態では、これらの配列は、保存された５′－ＴＣ／ＣＴＡＧ－３′モチーフで終了する。いくつかの実施形態では、ヘアピン終端構造を形成する可能性を有する１９ｂｐ回文配列は、ＲＴＳの１１ヌクレオチド上流に位置し、配列ＧＴＧＣＡＣＧＡＡＴＴＣＧＴＧＣＡＣＣＧＧＧＣＣＡＣＴＡＧを含む。いくつかの実施形態では、特に、トランスポゾンがＨｅｌｒａｉｓｅｒトランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、Ｈｅｌｉｔｒｏｎトランスポザーゼ酵素である。

【１２４７】

Ｔｏｌ２トランスポゾンは、単離されてもよく、またはメダカのゲノムに由来してもよく、ｈＡＴファミリーのトランスポゾンに類似していてもよい。本開示の例示的なＴｏｌ２トランスポゾンは、約４．７キロベースを含む配列によってコードされ、４つのエクソンを含有するＴｏｌ２トランスポザーゼをコードする遺伝子を含有する。いくつかの実施形態では、トランスポゾンは、Ｔｏｌ２トランスポゾンである。本開示の方法のある特定の実施形態では、特に、トランスポゾンがＴｏｌ２トランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、Ｔｏｌ２トランスポザーゼ酵素である。

【１２４８】

いくつかの実施形態では、ベクターは、トランスポゾンをコードする組換えＤＮＡ配列及び非天然に存在するＤＮＡ配列を含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、任意の形態のＤＮＡを含み、ベクターは、少なくとも１００ヌクレオチド（ｎｔｓ）、５００ｎｔｓ、１０００ｎｔｓ、１５００ｎｔｓ、２０００ｎｔｓ、２５００ｎｔｓ、３０００ｎｔｓ、３５００ｎｔｓ、４０００ｎｔｓ、４５００ｎｔｓ、５０００ｎｔｓ、６５００ｎｔｓ、７０００ｎｔｓ、７５００ｎｔｓ、８０００ｎｔｓ、８５００ｎｔｓ、９０００ｎｔｓ、９５００ｎｔｓ、１０，０００ｎｔｓ、またはそれらの間の任意の数のヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、一本鎖または二本鎖ＤＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、環状ＤＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、プラスミドベクター、ナノプラスミドベクター、ミニサークルである。いくつかの実施形態では、ベクターは、線形または線形化ＤＮＡを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、二本鎖ｄｏｇｇｙｂｏｎｅ（商標）ＤＮＡ配列である。

【１２４９】

いくつかの実施形態では、トランスポゾンをコードする組換えＤＮＡ配列及び非天然に存在するＤＮＡ配列は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子をコードする配列をさらに含む。

【１２５０】

いくつかの実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする核酸配列は、ＤＮＡ配列であり、トランスポザーゼ酵素をコードするＤＮＡ配列の量及びトランスポゾンをコードするＤＮＡ配列の量は、エレクトロポレーションまたはヌクレオフェクション反応の１００μＬ当たり１０．０μｇ以下、１００μＬ当たり７．５μｇ未満、１００μＬ当たり６．０μｇ未満、１００μＬ当たり５．０μｇ未満、１００μＬ当たり２．５μｇ未満、または１００μＬ当たり１．６７μｇ未満、１００μＬ当たり０．５５μｇ未満、１００μＬ当たり０．１９μｇ未満、１００μＬ当たり０．１０μｇ未満である。ある特定のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションまたはヌクレオフェクション反応におけるトランスポザーゼ酵素をコードするＤＮＡ配列の量及びトランスポゾンをコードするＤＮＡ配列の量の濃度は、１００μｇ／ｍＬ以下、７５μｇ／ｍＬ以下、６０μｇ／ｍＬ以下、５０μｇ／ｍＬ以下、２５μｇ／ｍＬ以下、１６．７μｇ／ｍＬ以下、５．５μｇ／ｍ

Ｌ以下、１．９μｇ／ｍＬ以下、１．０μｇ／ｍＬ以下である。
【１２５１】
いくつかの実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする核酸配列は、ＲＮＡ配列であり、トランスポザーゼ酵素をコードするＲＮＡ配列の量及びトランスポゾンをコードするＲＮＡ配列の量は、エレクトロポレーションまたはヌクレオフェクション反応の１００μＬ当たり１０．０μｇ以下、１００μＬ当たり７．５μｇ未満、１００μＬ当たり６．０μｇ未満、１００μＬ当たり５．０μｇ未満、１００μＬ当たり２．５μｇ未満、または１００μＬ当たり１．６７μｇ未満、１００μＬ当たり０．５５μｇ未満、１００μＬ当たり０．１９μｇ未満、１００μＬ当たり０．１０μｇ未満である。ある特定の実施形態では、エレクトロポレーションまたはヌクレオフェクション反応におけるトランスポザーゼ酵素をコードするＲＮＡ配列の量及びトランスポゾンをコードするＲＮＡ配列の量の濃度は、１００μｇ／ｍＬ以下、７５μｇ／ｍＬ以下、６０μｇ／ｍＬ以下、５０μｇ／ｍＬ以下、２５μｇ／ｍＬ以下、１６．７μｇ／ｍＬ以下、５．５μｇ／ｍＬ以下、１．９μｇ／ｍＬ以下、１．０μｇ／ｍＬ以下である。
【１２５２】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載のものを含むが、これらに限定されない第２の遺伝子編集ツールによってさらに修飾される。いくつかの実施形態では、第２の遺伝子編集ツールは、挿入された配列またはその任意の部分を再切除するためのｅｘｃｉｓｉｏｎ－ｏｎｌｙ　ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼを含み得る。例えば、ｅｘｃｉｓｉｏｎ－ｏｎｌｙ　ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼを使用して、トランスポゾンを「再切除」することができる。
【１２５３】
いくつかの実施形態によれば、ｐｉｇｇｙＢａｃ系は、トランスポゾン／トランスポザーゼ系を含み、トランスポザーゼは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子をコードするカーゴを含むトランスポゾンカセットの両側に位置するＩＴＲを認識し、転置因子を切除して、それをＴＴ／ＡＡ染色体部位に統合し、トランスポゾンカセットのゲノム挿入及び１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をもたらす。いくつかの実施形態によれば、カーゴは、２つ以上の免疫チェックポイント分子をコードする。
【１２５４】
ｐｉｇｇｙＢａｃ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。
【１２５５】
ｐｉｇｇｙＢａｃ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、ならびに本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、ＷＯ２０１９／０４６８１５、ＷＯ２０１５／００６７００、ＷＯ２０１０／０８５６９９、ＷＯ２０１０／０９９３０１、ＷＯ２０１０／０９９２９６、ＷＯ２００６／１２２４４２、ＷＯ２００１／０８１５６５、及びＷＯ１９９８／０４０５１０に記載されており、それらの内容は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。
【１２５６】
トランスポゾン／トランスポザーゼを発現するためのプラスミドなどのｐｉｇｇｙＢａｃ法を実行するための資源は、Ｄｅｍｅｅｔｒａ及びＨｅｒａ　Ｂｉｏｌａｂｓなどの企業から市販されている。
【１２５７】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップは、ｐｉｇｇｙＢａｃ系を含む少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質発現を調節する。
【１２５８】
いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことな

く起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップは、ｐｉｇｇｙＢａｃ系を含む少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１２５９】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）などの非ウイルス技法の使用を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、ＴＩＬに、（ａ）トランスポザーゼ酵素をコードする配列を含む核酸またはアミノ酸配列、及び（ｂ）トランスポゾンをコードするＤＮＡ配列を含む組換えＤＮＡ配列及び非天然に存在するＤＮＡ配列を送達することを含む。本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、ｍＲＮＡ配列である。トランスポザーゼ酵素をコードするｍＲＮＡ配列は、インビトロで産生され得る。本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、ＤＮＡ配列である。トランスポザーゼ酵素をコードするＤＮＡ配列は、インビトロで産生され得る。ＤＮＡ配列は、ｃＤＮＡ配列であり得る。本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素をコードする配列は、アミノ酸配列である。トランスポザーゼ酵素をコードするアミノ酸配列は、インビトロで産生され得る。タンパク質スーパーｐｉｇｇｙｂａｃトランスポザーゼ（ＳＰＢ）は、トランスポゾンＤＮＡとのプレインキュベーションの後に送達されてもよい。ある特定の実施形態では、トランスポゾンは、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾンである。ある特定の実施形態、特に、トランスポゾンがｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼである。ある特定の実施形態、特に、トランスポゾンがｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、ｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポザーゼである。ある特定の実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポザーゼは、配列番号２３８を含むアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態、及び特に、トランスポゾンがｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンである実施形態では、トランスポザーゼは、ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）またはＳｕｐｅｒ ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）（ＳＰＢ）トランスポザーゼである。ある特定の実施形態、及び特に、トランスポザーゼがＳｕｐｅｒ ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）（ＳＰＢ）トランスポザーゼである実施形態では、トランスポザーゼをコードする配列は、ｍＲＮＡ配列である。本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、ｐｉｇｇｙＢａｃ（商標）（ＰＢ）トランスポザーゼ酵素である。ｐｉｇｇｙＢａｃ（ＰＢ）トランスポザーゼ酵素は、以下と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、また

はそれらの間の任意のパーセンテージ同一のアミノ酸配列を含み得るか、またはそれからなり得る：
ＭＧＳＳＬＤＤＥＨＩＬＳＡＬＬＱＳＤＤＥＬＶＧＥＤＳＤＳＥＩＳＤＨＶＳＥＤＤＶＱ
ＳＤＴＥＥＡＦＩＤＥＶＨＥＶＱＰＴＳＳＧＳＥＩＬＤＥＱＮＶＩＥＱＰＧＳＳＬＡＳＮ
ＲＩＬＴＬＰＱＲＴＩＲＧＫＮＫＨＣＷＳＴＳＫＳＴＲＲＳＲＶＳＡＬＮＩＶＲＳＱＲＧ
ＰＴＲＭＣＲＮＩＹＤＰＬＬＣＦＫＬＦＦＴＤＥＩＩＳＥＩＶＫＷＴＮＡＥＩＳＬＫＲＲ
ＥＳＭＴＧＡＴＦＲＤＴＮＥＤＥＩＹＡＦＦＧＩＬＶＭＴＡＶＲＫＤＮＨＭＳＴＤＤＬＦ
ＤＲＳＬＳＭＶＹＶＳＶＭＳＲＤＲＦＤＦＬＩＲＣＬＲＭＤＤＫＳＩＲＰＴＬＲＥＮＤＶ
ＦＴＰＶＲＫＩＷＤＬＦＩＨＱＣＩＱＮＹＴＰＧＡＨＬＴＩＤＥＱＬＬＧＦＲＧＲＣＰＦ
ＲＭＹＩＰＮＫＰＳＫＹＧＩＫＩＬＭＭＣＤＳＧＴＫＹＭＩＮＧＭＰＹＬＧＲＧＴＱＴＮ
ＧＶＰＬＧＥＹＹＶＫＥＬＳＫＰＶＨＧＳＣＲＮＩＴＣＤＮＷＦＴＳＩＰＬＡＫＮＬＬＱ
ＥＰＹＫＬＴＩＶＧＴＶＲＳＮＫＲＥＩＰＥＶＬＫＮＳＲＳＲＰＶＧＴＳＭＦＣＦＤＧＰ
ＬＴＬＶＳＹＫＰＫＰＡＫＭＶＹＬＬＳＳＣＤＥＤＡＳＩＮＥＳＴＧＫＰＱＭＶＭＹＹＮ
ＱＴＫＧＧＶＤＴＬＤＱＭＣＳＶＭＴＣＳＲＫＴＮＲＷＰＭＡＬＬＹＧＭＩＮＩＡＣＩＮ
ＳＦＩＩＹＳＨＮＶＳＳＫＧＥＫＶＱＳＲＫＫＦＭＲＮＬＹＭＳＬＴＳＳＦＭＲＫＲＬＥ
ＡＰＴＬＫＲＹＬＲＤＮＩＳＮＩＬＰＮＥＶＰＧＴＳＤＤＳＴＥＥＰＶＭＫＫＲＴＹＣＴ
ＹＣＰＳＫＩＲＲＫＡＮＡＳＣＫＫＣＫＫＶＩＣＲＥＨＮＩＤＭＣＱＳＣＦ（配列番号２
９６、ＷＯ２０１９／０４６８１５の配列番号１４４８７）。
【１２６０】
本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポゾンは、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポゾンである。本開示の方法のある特定の実施形態では、トランスポザーゼ酵素は、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ酵素である（例えば、米国特許第９，２２８，１８０号（その内容は、その全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。ある特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼは、高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ１００Ｘ）トランスポザーゼである。ある特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ酵素は、以下と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、またはそれらの間の任意のパーセンテージ同一のアミノ酸配列を含む：
ＭＧＫＳＫＥＩＳＱＤＬＲＫＫＩＶＤＬＨＫＳＧＳＳＬＧＡＩＳＫＲＬＫＶＰＲＳＳＶＱ
ＴＩＶＲＫＹＫＨＨＧＴＴＱＰＳＹＲＳＧＲＲＲＶＬＳＰＲＤＥＲＴＬＶＲＫＶＱＩＮＰ
ＲＴＴＡＫＤＬＶＫＭＬＥＥＴＧＴＫＶＳＩＳＴＶＫＲＶＬＹＲＨＮＬＫＧＲＳＡＲＫＫ
ＰＬＬＱＮＲＨＫＫＡＲＬＲＦＡＴＡＨＧＤＫＤＲＴＦＷＲＮＶＬＷＳＤＥＴＫＩＥＬＦ
ＧＨＮＤＨＲＹＶＷＲＫＫＧＥＡＣＫＰＫＮＴＩＰＴＶＫＨＧＧＧＳＩＭＬＷＧＣＦＡＡ
ＧＧＴＧＡＬＨＫＩＤＧＩＭＲＫＥＮＹＶＤＩＬＫＱＨＬＫＴＳＶＲＫＬＫＬＧＲＫＷＶ
ＦＱＭＤＮＤＰＫＨＴＳＫＶＶＡＫＷＬＫＤＮＫＶＫＶＬＥＷＰＳＱＳＰＤＬＮＰＩＥＮ
ＬＷＡＥＬＫＫＲＶＲＡＲＲＰＴＮＬＴＱＬＨＱＬＣＱＥＥＷＡＫＩＨＰＴＹＣＧＫＬＶ
ＥＧＹＰＫＲＬＴＱＶＫＱＦＫＧＮＡＴＫＹ（配列番号２９７、ＷＯ２０１９／０４６８
１５の配列番号１４４８５）。
【１２６１】
Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼが高活性Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙ（ＳＢ１００Ｘ）トランスポザーゼであるものを含む、ある特定の実施形態では、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ酵素は、以下と少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、またはそれらの間の任意のパーセンテージ同一のアミノ酸配列を含む：
ＭＧＫＳＫＥＩＳＱＤＬＲＫＲＩＶＤＬＨＫＳＧＳＳＬＧＡＩＳＫＲＬＡＶＰＲＳＳＶＱ
ＴＩＶＲＫＹＫＨＨＧＴＴＱＰＳＹＲＳＧＲＲＲＶＬＳＰＲＤＥＲＴＬＶＲＫＶＱＩＮＰ
ＲＴＴＡＫＤＬＶＫＭＬＥＥＴＧＴＫＶＳＩＳＴＶＫＲＶＬＹＲＨＮＬＫＧＨＳＡＲＫＫ
ＰＬＬＱＮＲＨＫＫＡＲＬＲＦＡＴＡＨＧＤＫＤＲＴＦＷＲＮＶＬＷＳＤＥＴＫＩＥＬＦ
ＧＨＮＤＨＲＹＶＷＲＫＫＧＥＡＣＫＰＫＮＴＩＰＴＶＫＨＧＧＧＳＩＭＬＷＧＣＦＡＡ
ＧＧＴＧＡＬＨＫＩＤＧＩＭＤＡＶＱＹＶＤＩＬＫＱＨＬＫＴＳＶＲＫＬＫＬＧＲＫＷＶ

ＦＱＨＤＮＤＰＫＨＴＳＫＶＶＡＫＷＬＫＤＮＫＶＫＶＬＥＷＰＳＱＳＰＤＬＮＰＩＥＮＬＷＡＥＬＫＫＲＶＲＡＲＲＰＴＮＬＴＱＬＨＱＬＣＱＥＥＷＡＫＩＨＰＮＹＣＧＫＬＶＥＧＹＰＫＲＬＴＱＶＫＱＦＫＧＮＡＴＫＹ（配列番号２９８、ＷＯ２０１９／０４６８１５の配列番号１４４８６）。

【１２６２】

Ｆ．遺伝子編集プロセス

本発明の実施形態は、ＴＩＬ集団を拡張するための方法に関し、本方法は、それらの治療効果を増強するために、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、ＤＮＡが細胞のゲノム内で永続的に修飾され、例えば、ＤＮＡが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）または阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）させる。他の実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現を増強させる（例えば、過剰発現を引き起こすことによって）。いくつかの実施形態では、増強された発現を示すＤＮＡ配列は、内因性ＤＮＡ配列である。いくつかの実施形態では、発現を示すＤＮＡ配列は、編集された細胞の外側に由来する外因性ＤＮＡ配列である。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は、ＴＩＬの治療的集団の有効性を増強するために使用される。

【１２６３】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って実行することができ（例えば、プロセス２Ａとして知られる例示的なＴＩＬ拡張法を以下に記載する）、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。さらなる実施形態によれば、ＴＩＬを治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３（これらは参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法のいずれかの実施形態に従って実行され、この方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。したがって、本発明のある実施形態は、本明細書に記載される任意の実施形態に従って拡張された治療的ＴＩＬ集団を提供し、治療的集団の少なくとも一部は遺伝子編集されており、例えば、注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、永続的に遺伝子編集される。遺伝子編集プロセスの特定の実施形態は、本明細書、ならびにＰＣＴ／２０１９／０２９２８６及びＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０１２７２９に詳細に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１２６４】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する。

【１２６５】

ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【１２６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質

の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）のＴＩＬ集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【１２６７】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（特に図８Ｂ及び／または図８Ｃ）に示されるようなステップＡから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば図８Ｂ及び／または図８Ｃ）に示されるように、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、ステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団である、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）におけるものを含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから取得され、ステップＤでのその拡張前のＴＩＬ集団を含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）を含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤでの拡張から取得されたＴＩＬ集団を含む、第２の拡張後に起こる。

【１２６８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示

は参照により本明細書に組み込まれる。

【１２６９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なＴＩＬ製品の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のＴ細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している（Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｍｅｄ ２００９，２０１１、Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，２０１２、Ｃｉｅｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｂｌｏｏｄ ２０１３）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団中のＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【１２７０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【１２７１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【１２７２】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、免疫チェックポイント遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１またはＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１

７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【１２７３】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【１２７４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２、及び／またはＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）

。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１２７５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのＴＩＬの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、及び／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１２７６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１２７７】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１２７８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１２７９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、免疫チェックポイントの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）からなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、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、ＣＡＳＰ

６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）からなる群から選択される２つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）からなる群から選択される１つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせのうちの１つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１２８０】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって（Ｆｏｒｇｅｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０１７，８，９０８またはＰｅｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１０，１６，５４５８（その開示は、参照により本明細書に組み込まれる）、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団（例えば、接着分子の発現が増加する）に挿入される。

【１２８１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、Ｔ

ＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つまたは２つの分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つまたは２つの分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【１２８２】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１２８３】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％増加する。

【１２８４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子でのＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。転写因子を含むタンパク質を、Ｔ細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を実証する方法は記載されており（Ｓｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１３、ならびにＳｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬＯＳ　ＯＮＥ　２０１５及びＧｒｅｉｓｂｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｖｏｌ．１９５，２０１５）、例えば、国際特許公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号（これらはすべて参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。国際特許公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号に記載されるかかる方法は、ＴＩＬ集団を、転写因子（ＴＦ）及び／または一過性タンパク質発現を誘導するこ

とができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該ＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、それ故に、ＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ開始集団またはＴＩＬ前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞の亜集団の増加をもたらす。

【１２８５】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）には、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、及び／またはＭＹＢが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの誘導多能性幹細胞培養物（ｉＰＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％ＴＳＣＭの増加をもたらす。

【１２８６】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、１つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポ

ゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１２８７】

上記で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。

【１２８８】

いくつかの実施形態では、方法は、１つ以上のタンパク質の産生のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップ（本明細書に開示されるレンチウイルス形質導入方法）を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の対象ＴＩＬの遺伝子修飾に有用な追加の好適なトランスポゾン媒介遺伝子移入系には、本明細書に記載されるｐｉｇｇｙＢａｃ系（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ系（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ系（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ　ａｈｄ　Ｈｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２系（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）が含まれるが、これらに限定されない。

【１２８９】

いくつかの実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団、例えば、本明細書に記載の第１の

集団、第２の集団、及び／または第３の集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセッ

トの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１２９０】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【１２９１】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼ系は、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲ系は、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１２９２】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＺＦＮ法、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法、及びｓｈＲＮＡ法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。実施形態によれば、ＴＩＬを治療用集団に拡張

するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、ＧＥＮ３プロセス）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及び／またはＺＦＮ法を使用してＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【１２９３】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ系、ＴＡＬＥＮ系、ＺＦＮ系、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系、及びｓｈＲＮＡ系などの遺伝子編集系の送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、フローエレクトロポレーション系である。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーション系の例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸ系である。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅ系もしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーション系であり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【１２９４】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセスＧＥＮ３）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１２９５】

ＣＲＩＳＰＲは、「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲ系を使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るＣＲＩＳＰＲ系には、３つの型：Ｉ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けられている系のうちの１つである。

【１２９６】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイ

ルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系では、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。天然系におけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なｃｒＲＮＡ成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、ＣｐｆｌなどのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１２９７】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１２９８】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１が含まれる。

【１２９９】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１３００】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系を使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１３０１】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＴＡＬＥ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部分を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１３０２】

ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ（転写活性化因子様エフェクター）」タンパク質の略語である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥ系を使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【１３０３】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許出願公開第２０１１／０２０１１８ Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９ Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４ Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１ Ａ１号、及び同第２０１６／０１２０９０６ Ａ１号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１３０４】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１３０５】
ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１が含まれる。
【１３０６】
ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。
【１３０７】
ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセスＧＥＮ３）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。
【１３０８】
個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。
【１３０９】
個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。代替的に、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と協同して、ジンクフィンガー構築のための独自のプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標））を開発した。
【１３１０】
ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、Ｓ

ＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１３１１】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１が含まれる。

【１３１２】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【１３１３】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１３１４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的されるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むがこれらに限定されない追加の機能を含むように任意に遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、国際特許公開第ＷＯ２０１９／１６０８２９Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている遺伝子操作方法を用いて、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４をコードする遺伝子などの特定の標的遺伝子のノックアウトを含むＴＩＬを遺伝子編集することができる。ある特定の実施形態では、この方法は、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子操作することを含む。適切には、ＴＩＬ集団は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団及び／または第３の集団であり得る。

【１３１５】

１．ＴＩＬ拡張中の遺伝子編集のタイミング

いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養す

ることによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｇ）方法中の任意の時点で、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することと、を含む。

【１３１６】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【１３１７】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１３１８】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子編集は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。別の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【１３１９】

別の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２

の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１３２０】

別の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１３２１】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【１３２２】

ＯＫＴ－３に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＯＫＴ－３を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＯＫＴ－３に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

【１３２３】

４－１ＢＢアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始する４－１ＢＢを含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中で４－１ＢＢアゴニストに曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢが細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

【１３２４】

ＩＬ－２に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＩＬ－２を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＩＬ－２に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。別の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

【１３２５】

上述のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはＩＬ－２は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれる。ある実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の

０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。別の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト、及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上を、拡張プロセス中の１つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

【１３２６】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ａ）切除された腫瘍から取得された試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含む。

【１３２７】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法を使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたＴＩＬ集団を提供することができる。

【１３２８】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及

び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｇ）ステップ（ｆ）の注入バッグへの移行前の方法中の任意の時点で、ＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させることと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせから選択される。

【１３２９】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集ＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。いくつかの実施形態では、遺伝子編集のための核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬに送達される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３３０】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１のＴＩＬ拡張ステップの後に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１のＴＩＬ拡張ステップの後及び第２の拡張ステップの前に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬが活性化された後に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張ステップの後、及びＴＩＬが活性化された後、しかし第２の拡張ステップの前に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張ステップの後及びＴＩＬが活性化された後に実行され、ＴＩＬは、遺伝子編集の後及び第２の拡張ステップの前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集

後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓａｃｔˢ生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子は、ＰＤ－１の発現を抑制する。

【１３３１】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レンチウイルス形質導入によって実行される。

【１３３２】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー型免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させることと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過

性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
【１３３３】
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含む。
いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモータ

ーの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子は、ＰＤ－１の発現を抑制する。

【１３３４】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【１３３５】

他の実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｇ）ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前の方法中の任意の時点で、ＴＩＬ細胞の少なくとも一部分に一過性表現型改変を導入して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させることと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬ

Ａ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、一過性表現型改変のための核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬに送達される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３３６】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、一過性表現型改変プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、一過性表現型改変が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、一過性修飾プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が、ＴＩＬ細胞の表面上で免疫調節組成物を発現するように一過的に改変される。いくつかの実施形態では、一過性細胞修飾プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して一過性表現型改変ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って修飾されたＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【１３３７】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、一過性細胞修飾プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して一過性細胞修飾が実施され得ることなどが可能である。

【１３３８】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子編集は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわ

ち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【１３３９】

いくつかの実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、一過性細胞修飾は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらの一過的に修飾されたＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、一過性細胞修飾は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらの修飾されたＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、一過性細胞修飾は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、一過性細胞修飾を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【１３４０】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１３４１】

他の実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、一過性細胞修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、一過性細胞修飾プロセスの後、それらの修飾されたＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１３４２】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１３４３】

他の実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、一過性細胞修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、一過性細胞修飾プロセスの後、それらの修飾されたＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【１３４４】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【１３４５】

代替実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの

前、最中、もしくは後）に実行される。

【１３４６】

ＯＫＴ－３に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＯＫＴ－３を含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＯＫＴ－３に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【１３４７】

４－１ＢＢアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始する４－１ＢＢを含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中で４－１ＢＢに曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢを含み、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢアゴニストを含み、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【１３４８】

ＩＬ－２に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＩＬ－２を含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＩＬ－２に曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【１３４９】

上述のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはＩＬ－２は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれる。他の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。他の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト、及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上を、拡張プロセス中の１つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

【１３５０】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生す

ることと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～２日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を活性化することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、活性化することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー型免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させることと、
（ｆ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ

２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子は、ＰＤ－１の発現を抑制する。

【１３５１】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性

遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３５２】

他の実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ

集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３５３】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体

、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３５４】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を

刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分に送達される少なくとも１つの遺伝子エディターが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３５５】

他の実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するた

めの方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ

６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３５６】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分に送達される少なくとも１つの遺伝子エディターが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性

遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３５７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ

、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３５８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー型免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させることと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１３５９】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の

拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【１３６０】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、

免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３６１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部分を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー型免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させることと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【１３６２】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴ

ＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子は、ＰＤ－１の発現を抑制する。

【１３６３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子

エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３６４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その部分に

おける複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３６５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実

施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３６６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェック

ポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３６７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれ

らの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１３６８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ

、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３６９】

いくつかの実施形態では、前述の方法のうちのいずれかは、第４のＴＩＬ集団を培養するステップが、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生するステップと、

（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、増加した数のＴＩＬを提供するステップとで置き換えられるように修正される。

【１３７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１３８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法

を提供する。
【１３９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１３９８】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節剤

は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１３９９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わ

せ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４００】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、Ｓ

ＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４０１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その部分における複数の細胞を修飾して、ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するために、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４０２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（

ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬにおける内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４０３】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第

２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４０４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、そ

の一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４０５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、

ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４０６】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１４０７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日または１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４０９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４１９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうち

のいずれかに記載の方法を提供する。
【１４２４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４２５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４２６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４２７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４２８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４２９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４３６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４３７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４４８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのい

ずれかに記載の方法を提供する。
【１４４９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４５１】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１

、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４５２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４５３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／また

は受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４５４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～

４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。

【１４５５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、そ

の一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４５６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節

剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４５７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの遺伝子エディターの移行が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつか

の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４５８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、増加した数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部分への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部分における複数の細胞を修飾して、ｉ）細胞の表面上に免疫調節組成物、及び／またはｉｉ）ＴＩＬ細胞における内因性遺伝子の発現を抑制するためのＲＮＡ分子（例えば、ｓｈＲＮＡ）を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニス

トからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子は、免疫チェックポイントをコードする。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）から選択される。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子はＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１４５９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第３の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第４の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【１４６０】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を第１の培養培地中で培養するステップにおいて、第１の培養培地は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体をさらに含む。

【１４６１】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体は、第１の培養培地中にＯＫＴ－３を含む。

【１４６２】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップにおいて、第２の培養培地は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体をさらに含む。

【１４６３】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体は、第２の培養培地中にＯＫＴ－３を含む。

【１４６４】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法は、凍結保存培地を使用して採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地はジメチルスルホキシド系凍結保存培地である。他の実施形態では、凍結保存培地は、ＣＳ１０である。

【１４６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約２～３日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【１４６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養する

ステップが約３～４日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【１４６７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約２日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【１４６８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約３日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【１４６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で培養するステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、該当する場合に第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、または１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３～１５日間行われるように修正された、上

記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４７９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１４～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４８９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４９０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１４９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１４９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５００】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５０３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の

該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５０９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５１９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１５２８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当

する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５２９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１５３６】
いくつかの実施形態によれば、前述の方法のうちのいずれかを使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたＴＩＬ集団を提供することができる。
【１５３７】
Ｇ．遺伝子編集法
上記で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に改変する一過性遺伝子編集技術を含む、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。
【１５３８】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質または核酸（例えば、本明細書に記載されるように遺伝子発現を修飾するための免疫調節融合タンパク質及び／またはＲＮＡ（例えば、ｓｈＲＮＡ））の産生のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質

導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号（それらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【１５３９】

対象のＴＩＬを遺伝子修飾するためのレンチウイルスベクターは、当該技術分野で知られている任意の好適な技法を使用して作製することができる。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、安定したレンチウイルスプロデューサー細胞株を使用して作製される。いくつかの実施形態では、安定したレンチウイルスプロデューサー細胞株は、レンチウイルスベクター産生のための様々な遺伝子（例えば、ＶＳＶ－ｇ、ｇａｇ、及びｐｏｌ遺伝子、目的の遺伝子など）をプロデューサー細胞株ゲノムに組み込むために、トランスポゾン／トランスポザーゼ（例えば、本明細書に記載のｐｉｇｇｙＢａｃ及びＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ系）を使用して作製される。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクター産生のための遺伝子は、レンチウイルスベクターの誘導性産生を可能にする誘導性発現系（例えば、Ｔｅｔ－ｏｎ及びＴｅｔ－ｏｆｆ系）の制御下にある。レンチウイルス産生のための例示的な誘導性安定産生細胞株としては、例えば、ＥｕＬＶ（登録商標）（Ｅｕｒｅｋａ　Ｂｉｏ）系が挙げられる（例えば、特にレンチウイルス産生のための誘導性安定産生細胞株の産生に関連する関連部分について、Ｘｕｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ＆Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　Ｉｎｓｉｇｈｔｓ　８（２）：１９９－２０９（２０２２）、ＷＯ２０２１／２１８０００Ａ１、ＷＯ２０２１／２３２６３２Ａ１、及びＷＯ２０２１／２３２６３３Ａ１（参照によりそれら全体が組み込まれる）を参照されたい）。

【１５４０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１５４１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の対象ＴＩＬの遺伝子修飾に有用な追加の好適なトランスポゾン媒介遺伝子移入系には、本明細書に記載されるｐｉｇｇｙＢａｃ系（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ系（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙまたは Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ系（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ　ａｈｄ　Ｈｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２系（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）が含まれるが、これらに限定されない

。

【１５４２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルス

のうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１５４３】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【１５４４】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼ系は、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲ系は、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１５４５】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらの実施形態は以下でより詳細に説明される。実施形態によれば、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法は、本明細書に

記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥＮ法、またはＺＦＮ法、ｓｄ－ＲＮＡ法、ｓｈＲＮＡ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。

【１５４６】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥＮ、ＺＦＮ、ｓｄ－ＲＮＡ、ｓｈＲＮＡなどの遺伝子編集系の送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、フローエレクトロポレーション系である。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーション系の例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸ系である。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅ系もしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション系は、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーション系であり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【１５４７】

１．ＣＲＩＳＰＲ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１５４８】

ＣＲＩＳＰＲは、「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ　Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ　Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ　Ｓｈｏｒｔ　Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ　Ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲ系を使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＣＲＩＳＰＲ系は、クラス１及びクラス２の２つの主要なクラスに分類され得、これらは、異なるタイプ及びサブタイプにさらに分類される。ＣＲＩＳＰＲ系の分類は、特定の核酸を切断することができるエフェクターＣａｓタンパク質に基づいている。クラス１ＣＲＩＳＰＲ系では、エフェクターモジュールは、マルチタンパク質複合体からなるが、クラス２の系は、１つのエフェクタータンパク質のみを使用する。クラス１ＣＲＩＳＰＲには、Ｉ型、ＩＩＩ型、及びＩＶ型が含まれ、クラス２　ＣＲＩＳＰＲには、ＩＩ型、Ｖ型、及びＶＩ型が含まれる。これらの型のＣＲＩＳＰＲ系のうちのいずれかは、本発明に従って使用され得るが、ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用されることが

好ましいＣＲＩＳＰＲ系には、３つの型：Ｉ型（Ｃａｓ３によって例示される）、ＩＩ型（Ｃａｓ９によって例示される）、及びＩＩＩ型（Ｃａｓ１０によって例示される）がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは、最もよく特徴付けられている系のうちの１つである。

【１５４９】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系では、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系が再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。したがって、ある特定の実施形態によれば、Ｃａｓ９は、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ認識時にＤＮＡを切断するＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼとして機能する。天然系におけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ結合に必要な足場配列と、修飾されるゲノム標的を定義するユーザ定義のおよそ１７～２０ヌクレオチドスペーサーとを含む合成ＲＮＡである。したがって、ユーザは、ｓｇＲＮＡに存在する標的配列を変更することによって、Ｃａｓタンパク質のゲノム標的を変更することができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドとＲＮＡ成分（例えば、ｓｇＲＮＡ）を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１５５０】

いくつかの実施形態によれば、操作された、プログラム可能な、天然に存在しないＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９タンパク質及びＴＩＬにおいてＤＮＡ分子の標的配列を標的とし、それにハイブリダイズする少なくとも１つのガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡ分子が少なくとも１つの免疫チェックポイント分子をコードし、ＴＩＬが少なくとも１つの免疫チェックポイント分子を発現し、Ｃａｓ９タンパク質がＤＮＡ分子を切断し、それによって、少なくとも１つの免疫チェックポイント分子の発現が改変され、Ｃａｓ９タンパク質及びガイドＲＮＡが、天然に一緒に存在しない。実施形態によれば、２つ以上の免疫チェックポイント分子の発現が改変される。実施形態によれば、ガイドＲＮＡ（複数可）は、ｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡを含み得る。本発明の態様によれば、「ガイドＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」及び「合成ガイドＲＮＡ」という用語は、互換的に使用され得、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列を指し、これは、標的部位を特定するガイドＲＮＡ内の約１７～２０ｂｐの配列である。

【１５５１】

Ｃａｓ９と比較して改善されたオンターゲット特異性を有するＣａｓ９のバリアントもまた、本発明の実施形態に従って使用され得る。そのようなバリアントは、高忠実度Ｃａｓ－９と称され得る。実施形態によれば、デュアルニッカーゼアプローチを利用してもよく、反対のＤＮＡ鎖を標的とする２つのニッカーゼは、標的ＤＮＡ内でＤＳＢを生成する（多くの場合、ダブルニッカーゼまたはデュアルニッカーゼＣＲＩＳＰＲ系と称される）

。例えば、このアプローチは、２つのＣａｓ９ヌクレアーゼドメインのうちの１つの変異を伴い、Ｃａｓ９をヌクレアーゼからニッカーゼに変えることを伴い得る。高忠実度Ｃａｓ９の非限定的な例としては、ｅＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１及びＨｙｐａＣａｓ９が挙げられる。そのようなバリアントは、非標的ＤＮＡ部位における望ましくない変化を低減または排除し得る。例えば、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ＩＭ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１５ Ｄｅｃ １、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ＢＰ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１６ Ｊａｎ ６、及びＲａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－２３０８（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【１５５２】

追加として、特定の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／０１０２３２４号に開示されているものなどの、細胞へのＣａｓ９の遺伝子送達を改善し、標的特異性を改善する、Ｃａｓ９足場を使用することができる。例えば、Ｃａｓ９足場は、（Ｄ－［Ｉ／Ｌ］－Ｇ－Ｘ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｇ－Ｗ－Ａ）によって定義されるＲｕｖＣモチーフ及び／または（Ｙ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｈ－Ｘ－Ｘ－Ｐ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｘ－Ｓ）によって定義されるＨＮＨモチーフを含んでよく、Ｘは、２０個の天然に存在するアミノ酸のうちのいずれか１つを表し、［Ｉ／Ｌ］は、イソロイシンまたはロイシンを表す。ＨＮＨドメインは、標的ｄｓＤＮＡの一方の鎖をニッキングすることに関与し、ＲｕｖＣドメインは、ｄｓＤＮＡの他方の鎖の切断に関与する。したがって、これらのドメインの各々は、ＰＡＭのすぐ近くのプロトスペーサー内の標的ＤＮＡの鎖をニックし、ＤＮＡの鈍い切断をもたらす。これらのモチーフを互いに組み合わせて、よりコンパクト及び／またはより特異的なＣａｓ９足場を作製してもよい。さらに、モチーフを使用して、分割されたＣａｓ９タンパク質（すなわち、ＲｕｖＣドメインまたはＨＮＨドメインのいずれかを含むＣａｓ９タンパク質またはＣａｓ９バリアントの還元型または切断型）を作製してもよく、分割されたＣａｓ９タンパク質は、２つの別個のＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインに分割され、標的ＤＮＡを一緒にまたは別個に処理することができる。

【１５５３】

特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ及び免疫チェックポイント遺伝子（複数可）の標的ＤＮＡ配列に特異的なおよそ１７～２０ヌクレオチドの配列を含むガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡ）を導入することによって、ＴＩＬにおける１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡとして、またはプロモーターの下でガイドＲＮＡコード配列を有するプラスミドを形質転換することによって送達されてもよい。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素は、ｓｇＲＮＡにより定義された標的配列に基づいて、特定の位置に二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入する。ＤＳＢは、ＤＮＡの挿入または欠失（インデル）を頻繁に引き起こす機序である、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって細胞内で修復され得る。インデルは、多くの場合、フレームシフトをもたらし、例えば、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内で早期停止コドンを引き起こすことによって、機能対立遺伝子の喪失を引き起こす。ある特定の実施形態によれば、結果は、標的免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

【１５５４】

代替的に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素によって誘導されるＤＳＢは、ＮＨＥＪの代わりに相同性指向修復（ＨＤＲ）によって修復されてもよい。ＮＨＥＪ媒介ＤＳＢ修復は、しばしば遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊するが、相同指向修復（ＨＤＲ）を使用して、単一ヌクレオチド変化から大きな挿入までの範囲の特異的なヌクレオチド変化を生成することができる。実施形態によれば、ＨＤＲは、ｓｇＲＮＡ（複数可）及びＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼを有するＴＩＬに所望の配列を含むＤＮＡ修復テンプレートを送達することによって、免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集、ならびに標的遺伝子のすぐ上流及

び下流の追加の相同配列（多くの場合、左及び右の相同アームと称される）を含む。

【１５５５】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、開始を遮断することによって転写を抑制するために、転写開始部位を標的とし得る。したがって、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに抑制され得る。ｄＣａｓ９分子は、ｓｇＲＮＡ標的化配列に基づいて標的ＤＮＡに結合する能力を保持している。本発明の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインなどの転写リプレッサードメインをＣａｓ９の酵素不活性バージョンに融合させ、それによって、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＫＲＡＢを形成し、遺伝子の転写の阻害または防止をもたらすことを含み得る。好ましくは、リプレッサードメインは、転写開始部位の下流、例えば、約５００ｂｐ下流のウィンドウを標的とする。ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）と称され得るこのアプローチは、標的ＲＮＡの転写還元を介して堅牢な遺伝子ノックダウンをもたらす。

【１５５６】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、転写を活性化するために、転写開始部位を標的とし得る。このアプローチは、ＣＲＩＳＰＲ活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）と称され得る。実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を活性化することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増加させることを含む。そのような実施形態によれば、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに活性化され得る。ＣＲＩＳＰＲ法は、例えば、ＶＰ６４などの転写活性化因子をｄＣａｓ９に融合させ、それによって例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＶＰ６４を形成することによって、転写活性化ドメインを転写開始部位に標的化することを含み得、遺伝子の転写の活性化をもたらす。好ましくは、活性化因子ドメインは、転写開始部位から上流のウィンドウ、例えば、約５０～４００ｂｐ下流を標的とする。

【１５５７】

本発明の追加の実施形態は、哺乳動物細胞における標的遺伝子の強力な活性化のために開発された活性化戦略を利用し得る。非限定的な例としては、エピトープタグ付きｄＣａｓ９及び抗体活性化剤エフェクタータンパク質（例えば、ＳｕｎＴａｇ系）の共発現、複数の異なる活性化ドメインに直列に融合したｄＣａｓ９（例えば、ｄＣａｓ９－ＶＰＲ）、またはｄＣａｓ９－ＶＰ６４と修飾された足場ｇＲＮＡ及び追加のＲＮＡ結合ヘルパー活性化因子（例えば、ＳＡＭ活性化因子）との共発現が挙げられる。

【１５５８】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ支援合理的タンパク質操作（ＣＡＲＰＥ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム編集方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＣＡＲＰＥは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）または二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）編集カセットからの指向性変異をゲノムに直接組み込む「ドナー」及び「デスティネーション」ライブラリーの生成を伴う。ドナーライブラリーの構築は、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いて、合理的に設計された編集オリゴヌクレオチドを細胞に同時形質転換することを伴う。編集オリゴヌクレオチドは、ＰＡＭの欠失または変異を、隣接遺伝子内の１つ以上の所望のコドンの変異とカップリングするように設計される。これにより、ドナーライブラリー全体を単一の形質転換で生成することができる。ドナーライブラリーは、編集オリゴヌクレオチドからの合成特徴、すなわち、遺伝子の３’末端に同時に組み込まれる第２のＰＡＭ欠失または変異を使用して、ＰＣＲ反応などによる組換え染色体の増幅によって回収される。これは、ＰＡＭ欠失に指向されたコドン標的変異を共有結合する。次いで、ドナーライブラリーを、デスティネーションｇＲＮＡ

ベクターを有する細胞に同時形質転換して、合理的に設計されたタンパク質ライブラリーを発現する細胞の集団を作製する。

【１５５９】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、追跡可能なＣＲＩＳＰＲ濃縮組換えによるゲノム操作（ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介系を使用する、追跡可能な精密ゲノム編集のための方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ方法及びベクターは、編集カセットを、単一のベクター上のｇＲＮＡをコードする遺伝子と組み合わせる。カセットは、所望の変異及びＰＡＭ変異を含有する。Ｃａｓ９もコードし得るベクターは、細胞または細胞集団に導入される。これは、細胞または細胞集団におけるＣＲＩＳＰＲ系の発現を活性化し、ｇＲＮＡにＣａｓ９を標的領域に動員させ、ｄｓＤＮＡ切断が発生し、ＰＡＭ変異の組み込みを可能にする。

【１５６０】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１５６１】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１５６２】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための資源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１５６３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第９，７９０，４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系を使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系は、Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイが追加のｔｒａｃｒＲＮＡを必要とすることなく成熟したｃｒＲＮＡに処理されるという点で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系とは機能的に異なる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系で使用されるｃｒＲＮＡは、スペーサーまたはガイド配列及び直接

反復配列を有する。この方法を使用して形成されるＣｐｆ１ｐ－ｃｒＲＮＡ複合体は、それ自体で標的ＤＮＡを切断するのに十分である。

【１５６４】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つタンパク質の発現を調節するためのクラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系の送達を含む。

【１５６５】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップは、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を阻害するためのクラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系の送達を含む。

【１５６６】

２．ＴＡＬＥ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＴＡＬＥ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部分を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１５６７】

ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ（転写活性化因子様エフェクター）」タンパク質の略語である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥ系を使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【１５６８】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタムＴＡＬＥアレイの迅速な組み立てを可能にする戦略には、ゴールデンゲート分子クローニング、高スループット固相組み立て、及びライゲーション非依存性クローニング技術が含まれる。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂ

ｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。追加として、所望の標的のためのカスタムＴＡＬエフェクター反復アレイの設計を可能にし、また、予測されるＴＡＬエフェクター結合部位を提供する、ＴＡＬエフェクター－ヌクレオチドターゲット２．０などのウェブベースのツールが利用可能である。Ｄｏｙｌｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｗ１１７－Ｗ１２２を参照されたい。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法の例は、米国特許出願公開第２０１１／０２０１１１８Ａ１号、同第２０１３／０１１７８６９Ａ１号、同第２０１３／０３１５８８４Ａ１号、同第２０１５／０２０３８７１Ａ１号、同第２０１６／０１２０９０６Ａ１号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１５６９】

本発明の実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＫＲＡＢ－ＴＡＬＥを利用することを含み得、この方法は、転写Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインを、遺伝子の転写開始部位を標的とするＤＮＡ結合ドメインに融合することを含み、遺伝子の転写の阻害または防止につながる。

【１５７０】

別の実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）に変異を導入することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＦｏｋｌなどのヌクレアーゼエフェクタードメインをＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインに融合させ、ＴＡＬＥＮをもたらすことを含み得る。Ｆｏｋｌは、二量体として活性であり、したがって、この方法は、ＦＯＫＬヌクレアーゼドメインを隣接するゲノム標的部位に位置決めするためのＴＡＬＥＮ対を構築することを含み、ＤＮＡ二本鎖切断を導入する。Ｆｏｋｌの正しい位置決め及び二量体化後、二本鎖切断が完了し得る。二本鎖切断が導入されると、ＤＮＡ修復は、高忠実度相同組換え対（ＨＲＲ）（相同性指向修復またはＨＤＲとしても知られる）またはエラーが発生しやすい非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）の２つの異なる機序を介して達成することができる。ＮＨＥＪを介した二本鎖切断の修復は、好ましくは、ＤＮＡ標的部位の欠失、挿入または置換をもたらす、すなわち、ＮＨＥＪは、典型的には、切断部位での小さな挿入及び欠失の導入をもたらし、多くの場合、遺伝子機能をノックアウトするフレームシフトを誘導する。特定の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮ対は、遺伝子の最５’エクソンを標的とし、早期フレームシフト変異または早期停止コドンを促進する。ＴＡＬＥＮによって導入される遺伝子変異（複数可）は、好ましくは永続的である。したがって、いくつかの実施形態によれば、この方法は、二量体化ＴＡＬＥＮを利用して、エラーが発生しやすいＮＨＥＪを介して修復される部位特異的二本鎖切断を誘導し、標的免疫チェックポイント遺伝子に１つ以上の変異をもたらすことによって、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。

【１５７１】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、非ランダム点変異、標的欠失、またはＤＮＡ断片の付加などのＨＲＲを介して遺伝子改変を導入するために利用される。ＤＮＡ二本鎖切断の導入は、好適なドナーＤＮＡの存在下での相同組換えを介した遺伝子編集を可能にする。実施形態によれば、この方法は、部位特異的二本鎖切断を誘導し、１つ以上の導入遺伝子をＤＮＡに組み込むために、二量体化ＴＡＬＥＮ及び遺伝子座特異的相同性アームを有するドナープラスミドを同時送達することを含む。

【１５７２】

別の実施形態によれば、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８号に開示されているように、ＦｏｋＩ及びＡｖｒＸａ７に由来するハイブリッドタンパク質であるＴＡＬＥＮを、本発明の実施形態に従って使用してもよい。このＴＡＬＥＮは、ＡｖｒＸａ７の標的

ヌクレオチド及びＦｏｋＩの二本鎖ＤＮＡ切断活性に対する認識特異性を保持する。同じ方法を使用して、異なる認識特異性を有する他のＴＡＬＥＮを調製することができる。例えば、コンパクトＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ結合特異性を変化させ、特定の単一のｄｓＤＮＡ標的配列を標的とするために、ＲＶＤの異なるセットを有するコアＴＡＬＥ足場を操作することによって生成され得る。米国特許公開第２０１３／０１１７８６９号を参照されたい。触媒ドメインの選択は、ＤＮＡ処理をもたらすために足場に付着させることができ、これは、触媒ドメインが、コアＴＡＬＥ足場に融合されたときに、単一のｄｓＤＮＡ標的配列の近くでＤＮＡを処理することができることを確実にするように操作され得る。ペプチドリンカーはまた、触媒ドメインを足場に融合させて、特定の単一のｄｓＤＮＡ配列を標的とするために二量体化を必要としない単一のポリペプチド鎖からなるコンパクトなＴＡＬＥＮを作製するように操作されてもよい。コアＴＡＬＥ足場はまた、ＴＡＬモノマーであり得る触媒ドメインをそのＮ末端に融合させることによって修飾され得、この触媒ドメインが別のＴＡＬモノマーに融合された別の触媒ドメインと相互作用する可能性を可能にし、それによって標的配列の近傍でＤＮＡを処理する可能性が高い触媒エンティティを作製する。米国特許公開第２０１５／０２０３８７１号を参照されたい。このアーキテクチャは、１つのＤＮＡ鎖のみを標的とすることを可能にするが、これは古典的なＴＡＬＥＮアーキテクチャの選択肢ではない。

【１５７３】

本発明の実施形態によれば、従来のＲＶＤを使用して、遺伝子発現を大幅に低減することができるＴＡＬＥＮを作製してもよい。いくつかの実施形態では、４つのＲＶＤ、ＮＩ、ＨＤ、ＮＮ、及びＮＧを使用して、それぞれ、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンを標的とする。これらの従来のＲＶＤを使用して、例えば、ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮを作製することができる。従来のＲＶＤを使用するＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ：Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｄｅｃ．２０１７，Ｖｏｌ．９：３１２－３２１（Ｇａｕｔｒｏｎ）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているＴ３ｖ１及びＴ１　ＴＡＬＥＮが挙げられる。Ｔ３ｖ１及びＴ１　ＴＡＬＥＮは、ＰＤ－Ｌ１結合部位が位置するＰＤＣＤ１遺伝子座の第２のエクソンを標的とし、ＰＤ－１産生を著しく低減することができる。いくつかの実施形態では、Ｔ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号１２７を使用することによってそれを行い、Ｔ３ｖ１　ＴＡＬＥＮは、標的配列番号１２８を使用することによってそれを行う。

【１５７４】

別の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、Ｇａｕｔｒｏｎに開示されるような、標的遺伝子に対するそれらの活性及び特異性を改善するために、非従来型ＲＶＤを使用して修飾される。天然に存在するＲＶＤは、超可変アミノ酸位置の潜在的な多様性レパートリーのごく一部のみをカバーする。非従来のＲＶＤは、天然のＲＶＤの代替物を提供し、ＴＡＬＥＮによるオフサイト標的（標的配列に対していくつかのミスマッチを含むゲノム内の配列）の標的化を除外するために使用され得る、新規の固有の標的化特異性特徴を有する。非従来型ＲＶＤは、Ｊｕｉｌｌｅｒａｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　５，Ａｒｔｉｃｌｅ　Ｎｕｍｂｅｒ　８１５０（２０１５）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるようなアレイの定義された位置における２つの超可変アミノ酸位置にアミノ酸の代替組み合わせを含むＴＡＬＥＮの集合を生成及びスクリーニングすることによって同定され得る。次に、ミスマッチの位置に存在するヌクレオチドを区別する非従来型ＲＶＤを選択してもよく、これにより、標的位置の適切な処理を依然として可能にしながら、オフサイト配列でのＴＡＬＥＮ活性を防止することができる。次いで、選択された非従来型ＲＶＤは、ＴＡＬＥＮ内の従来のＲＶＤを置き換えるために使用され得る。従来のＲＶＤが非従来型ＲＶＤに置き換えられたＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎによって産生されたＴ３ｖ２及びＴ３ｖ３　ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮが挙げられる。これらのＴＡＬＥＮは、従来のＲＶＤを使用したＴＡＬＥＮと比較した場合、特異性が増加していた。

【１５７５】
追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮを利用して、２つの遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させるための遺伝子改変を導入してもよい。例えば、２つの異なる遺伝子を標的とするために２つの別個のＴＡＬＥＮを生成し、次いで一緒に使用してもよい。２つのＴＡＬＥＮによってそれぞれの遺伝子座及び潜在的なオフターゲット部位で生成される分子事象は、ハイスループットＤＮＡ配列決定によって特徴付けられ得る。これにより、オフターゲット部位の分析、及び両方のＴＡＬＥＮの使用から生じる可能性のある部位の特定が可能になる。この情報に基づいて、一緒に使用されても特異性及び活性が増加したＴＡＬＥＮを操作するために、適切な従来型及び非従来型のＲＶＤが選択され得る。例えば、Ｇａｕｔｒｏｎは、Ｔ３ｖ４　ＰＤ－１及びＴＲＡＣ　ＴＡＬＥＮを併用して、強力なインビトロ抗腫瘍機能を維持したダブルノックアウトＣＡＲ　Ｔ細胞を産生することを開示する。
【１５７６】
いくつかの実施形態では、Ｇａｕｔｒｏｎの方法または本明細書に記載の他の方法は、ＴＩＬを遺伝子編集するために用いられてもよく、このＴＩＬは、次いで、本明細書に記載の手順のうちのいずれかによって拡張されてもよい。いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部分を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。
【１５７７】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）サイトポレーション培地中の転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部分を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１５７８】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）サイトポレーション培地中の転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部分を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【１５７９】
いくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは特異的に設計されてもよく、これにより、遺伝子の特異的選択を標的とすることができる標的細胞（複数可）内の、より高い割合のＤＳＢ事象が可能になる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号を参照されたい。そのようなまれな切断エンドヌクレアーゼの使用は、トランスフェクトされた細胞内で標的遺伝子の二重不活性化を得る可能性を高め、Ｔ細胞などの操作された細胞の産生を可能にする。さらに、変異誘発を増加させ、標的遺伝子不活性化を強化するために、追加の触媒ドメインをＴＡＬＥＮで導入することができる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号に記載されているＴＡＬＥＮは、免疫療法に適するようにＴ細胞を操作するために首尾よく使用された。ＴＡＬＥＮを使用して、単一のＴ細胞内の少なくとも２つの遺伝子の不活性化を含む、Ｔ細胞内の様々な免疫チェックポイント遺伝子を不活性化することもできる。米国特許公開第２０１６／０１２０９０６号を参照されたい。追加として、ＴＡＬＥＮを使用して、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／００２１３７９号に開示されるように、免疫抑制剤及びＴ細胞受容体の標的をコードする遺伝子を不活性化することができる。さらに、ＴＡＬＥＮは、米国特許公開第２０１９／００１

０５１４号（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるように、ベータ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）及び／またはクラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）の発現を阻害するために使用され得る。

【１５８０】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１５８１】

ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥヌクレアーゼの非限定的な例を、以下の表に提供する。これらの実施例では、標的化ゲノム配列は、１５ｂｐのスペーサー（小文字で示される）によって分離された２つの１７塩基対（ｂｐ）の長い配列（大文字で示される、半分の標的と称される）を含有する。各半分の標的は、表１１に列挙される半分のＴＡＬＥヌクレアーゼの反復によって認識される。したがって、特定の実施形態によれば、本発明によるＴＡＬＥヌクレアーゼは、配列番号２８６及び配列番号２８７からなる群から選択される標的配列を認識し、切断する。ＴＡＬＥＮ配列及び遺伝子編集方法はまた、上述のＧａｕｔｒｏｎに記載されている。

【１５８２】

【表１８－１】

表 11-TALEN　PD-1 配列。

TALEN　PD-1　No.1 配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 286)	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA
反復 PD-1-左 (配列番号 288)	LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLT PQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 289)	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN IGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQA LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE

【表１８－２】

PD-1-左　TALEN (配列番号 290)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATAC GATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTC GGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCG TTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTT TACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTT AGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCC AGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGT CCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGT TGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGA TTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCAT GGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGC CAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGT GGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAG GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGAT GGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC GGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCT TGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCC AGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA

【表１８－３】

	AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG CCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCAC GGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTC CAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCC CTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCC GGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCG GCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCT GCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATT GGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTG GAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTG CCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCA CCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCAT GAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAG GAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGAC TACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACA ACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGA GGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTG GTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTG TTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGA CCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTC CGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGC ACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGC GAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表１８－４】

PD-1-右　TALEN (配列番号 291)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAG ACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCG ATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACA GGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCA CCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATC GTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTG TCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACA CGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGC GCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTC CACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAA ACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGC AATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAAG TCGTCGCAATCGCCAGCAATAACGGAGGGAAGCAAGCCCTCGA AACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGCTCTGCCAGGCCCACGGC CTTACCCCTGAGCAGGTGGTGGCCATCGCAAGTAACATTGGAG GAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTGCAGGCCCTGTTGCCCGTGCT GTGCCAGGCACACGGCCTCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATT GCCTCCAACATCGGGGGGAAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGG CCCTGCTGCCCGTCCTCTGTCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAA CAAGTGGTCGCCATCGCCTCTAATAACGGCGGGAAGCAGGCAC TGGAAACAGTGCAGAGACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCA TGGGTTGACCCCCCAACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACAAC GGGGGCAAGCAGGCCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAG TGCTGTGTCAGGCTCACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGC AATTGCCAGCAACGGCGGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTG CAACGCCTCCTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACC ACAACAAGTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACA GGCTCTTGAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAG GCACACGGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCA ATAATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTCCAGCGCCTGCT GCCAGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCGAACAGGTC GTGGCAATCGCCTCCAACGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGACC GTGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGACTCA CACCTCAGCAGGTCGTCGCCATTGCCTCTAACAACGGGGGCAA ACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGTTGTGC CAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCATCGCCT CAA

【表１８－５】

	ATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAGAGGTTGC TGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCCCAACAGGT CGTCGCCATTGCCAGCAACGGCGGAGGAAAGCAGGCTCTCGAA ACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTGTCAGGCTCATGGGCT GACCCCCCAGCAAGTGGTGGCTATTGCCTCTAACAATGGAGGC AAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGT GCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCAGGTGGTCGCCATCGC CAGTAACGGCGGGGGCAAACAGGCATTGGAAACCGTCCAGCG CCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGACTGACACCCGAA CAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATGATGGGGGCAAGCAGGCCC TGGAGACCGTGCAGAGACTCCTGCCAGTGTTGTGCCAAGCTCA CGGCCTCACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGCCTCAAACGGG GGGGGCCGGCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTC GCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGT CGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTG AAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGA AGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGC TGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGC CCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATG GAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGG GCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTC CCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCC GGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGA GGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACC CCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTT CAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAG GCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCG CCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGAT CAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTT CAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表１８－６】

TALEN PD-1 No.2 配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 287)	TACCTCTGTGGGGCCATctccctggcccccaaGGCGCAGATCAAAGAG A
反復 PD-1-左 (配列番号 292)	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV AIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNN GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIA SNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 293)	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIAS NGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV AIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPV LCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE

【表１８－７】

PD-1-左　TALEN (配列番号 294)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCAT ACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCAC GCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAA GGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGC CACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACC CGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGAT CGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTC GGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCA CGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACAC AGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCA GTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCC CGCTCAACTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAA TATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGG TGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAG CAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCC ACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGG CGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACC CCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGT TGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTG

【表１８－８】

	CCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCAC GGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATG GCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGC AGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCC TCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCG GCGCTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGC GTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCC TCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGG GGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAG GAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCC ACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCA GGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAG GTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGC CCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGG CGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTG CCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAG AACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGG AAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGT GTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCAGG CTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGG AGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCCT GACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGAT CAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表１８－９】

PD-1-右　TALEN (配列番号 295)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAG ACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCG ATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACA GGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCA CCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATC GTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTG TCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACA CGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGC GCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTC CACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAA ACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGC AATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCGAGCAAG TCGTCGCAATCGCCAGCCATGATGGAGGGAAGCAAGCCCTCGA AACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGCTCTGCCAGGCCCACGGC CTTACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCAAGTAACGGAGGAG GAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTGCAGCGCCTGTTGCCCGTGCT GTGCCAGGCACACGGCCTCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATT GCCTCCCATGACGGGGGGAAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGA GGCTGCTGCCCGTCCTCTGTCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAA CAAGTGGTCGCCATCGCCTCTAATGGCGGCGGGAAGCAGGCAC TGGAAACAGTGCAGAGACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCA TGGGTTGACCCCCCAACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACGGG GGGGGCAAGCAGGCCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAG TGCTGTGTCAGGCTCACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGC AATTGCCAGCAACGGCGGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTG CAACGCCTCCTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACC ACAACAAGTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACA GGCTCTTGAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAG GCACACGGGCTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCA ATATTGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTCCAGGCCCTGCT GCCAGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCCAGCAGGTC GTGGCAATCGCCTCCAACGGCGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAG ACCGTGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGAC TCACACCTGAACAGGTCGTCGCCATTGCCTCTCACGATGGGGG CAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGTTG TGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCATCG CCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAGA GGT

【表１８－１０】

	TGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCCCAACA GGTCGTCGCCATTGCCAGCAACAACGGAGGAAAGCAGGCTCTC GAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTGTCAGGCTCATG GGCTGACCCCCGAGCAAGTGGTGGCTATTGCCTCTAATGGAGG CAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTG TGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCAGGTGGTCGCCATCG CCAGTAACAACGGGGGCAAACAGGCATTGGAAACCGTCCAGC GCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGACTGACACCCGA ACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATGATGGGGGCAAGCAGGCC CTGGAGACCGTGCAGAGACTCCTGCCAGTGTTGTGCCAAGCTC ACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGCCTCAAACGG GGGGGGCCGGCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCT CGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCG TCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGT GAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTG AAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAG CTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCG CCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGAT GGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTG GGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCT CCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTC CGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAG AGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAAC CCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGT TCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAA GGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGC GCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGA TCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGT TCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【１５８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）サイトポレーション培地中のＰＤＣＤ１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部分を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が

、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。
【１５８４】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）サイトポレーション培地中の配列番号１２８を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部分を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。
【１５８５】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、
（ｂ）サイトポレーション培地中の配列番号１３５及び配列番号１３６に従って転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡのエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部分を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を

培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。
【１５８６】
ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の他の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。
【１５８７】
ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。これらの開示される例は、反復ＲＶＤを含有する２つ以上のＴＡＬＥ反復単位を有する天然に存在しないＤＮＡ結合ポリペプチド、ＴＡＬＥタンパク質の残基からなるＮ－キャップポリペプチド、及びＴＡＬＥタンパク質の全長Ｃ末端領域の断片からなるＣ－キャップポリペプチドの使用を含む。
【１５８８】
ＴＡＬＥＮ介在性遺伝子組み込み及び不活性化を効率的に行うために使用することができ、本発明の実施形態に従って使用することができるＴＡＬＥＮ設計及び設計戦略、活性評価、スクリーニング戦略、ならびに方法の例は、Ｖａｌｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１４，６９，１５１－１７０（これは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。
【１５８９】
いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡

張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。
【１５９０】
いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。
【１５９１】
３．ジンクフィンガー法
ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィ

ンガーヌクレアーゼ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１５９２】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【１５９３】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。代替的に、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と協同して、ジンクフィンガー構築のための独自のプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標））を開発した。

【１５９４】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１５９５】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１５９６】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。
【１５９７】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３ １３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【１５９８】
いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。
【１５９９】
いくつかの実施形態によれば、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法を提供し、
（ａ）切除された腫瘍からの試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切

除された腫瘍の少なくとも一部分から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制するためのジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。ＴＩＬの任意選択の凍結保存
【１６００】
バルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）または拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）のいずれかを、任意選択で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）の例示的なステップＦにおいてＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃｓ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。
【１６０１】
適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。
【１６０２】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ

１０、ＢｉｏＬｉｆｅ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のＩＬ－２をさらに含む。

【１６０３】

上で考察されたように、また図１及び／または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されるステップＡ～Ｅで例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第１の拡張後のＴＩＬの拡張集団（例えば、ステップＢに従って提供される、または図１もしくは８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）のステップＤによる１回以上の第２の拡張後のＴＩＬの拡張集団を凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｃｔａ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ　２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％　ＤＭＳＯを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例６に提供される方法に従って凍結保存される。

【１６０４】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【１６０５】

場合によっては、図１または８からのステップＢ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）ＴＩＬ集団は、以下に論じられるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、バルクＴＩＬ集団を、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＣ及びステップＤに供し、その後、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＤの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾されたＴＩＬが治療法に使用される場合、図１または８からのステップＢまたはステップＤ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）ＴＩＬ集団を、好適な治療のために遺伝子修飾に供することができる。

【１６０６】

４．Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１６０７】
Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲは、触媒的に死滅したＳｐＣａｓ９（ｄＣａｓ９）の、クロストリジウムＣｌｏ０５１　ＩＩ型制限エンドヌクレアーゼからのヌクレアーゼドメインとの融合からなる二量体のハイフィデリティ部位特異的ヌクレアーゼ（ＳＳＮ）である（Ｍａｄｉｓｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，“Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ　ｉｓ　ａ　ｎｏｖｅｌ　ｈｉｇｈ－ｆｉｄｅｌｉｔｙ　ｎｕｃｌｅａｓｅ　ｆｏｒ　ｓａｆｅ　ａｎｄ　ｒｏｂｕｓｔ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔ　ＳＣＭ－ｅｎｒｉｃｈｅｄ　ａｌｌｏｇｅｎｅｉｃ　ＣＡＲ－Ｔ　ｃｅｌｌｓ，”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ，２０２２）。これにより、その活性が、２つの隣接する２０ｎｔ標的配列のＲＮＡ誘導認識によって可能にされる、Ｃｌｏ０５１ヌクレアーゼドメインの二量体化に基づくヌクレアーゼが得られる。対合ニッカーゼアプローチとは異なり、例えば、Ｃａｓ９－Ｄ１０Ａ変異体を使用する場合、単量体のＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲは、ニックまたはＤＳＢを導入しない。Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲは、低オフターゲットヌクレアーゼ活性を有することが示されている。

【１６０８】
例示的なＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系としては、ＷＯ２０１９／１２６５７８（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているものが挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系は、ＤＮＡ局在化成分及びエフェクター分子を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる融合タンパク質を含む。

【１６０９】
Ｉ．ＤＮＡ局在化成分
いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、特定のＤＮＡ配列に結合することができる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、例えば、ＤＮＡ結合オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ結合タンパク質、ＤＮＡ結合タンパク質複合体、及びそれらの組み合わせから選択される。他の好適なＤＮＡ結合成分は、当業者によって認識される。

【１６１０】
いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ゲノム内の特定の遺伝子座または遺伝子座（複数）に向けられたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、及びそれらの組み合わせから選択され得る。

【１６１１】
いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、標的ＤＮＡに結合したときにオリゴヌクレオチドに結合するヌクレオチド結合タンパク質またはタンパク質複合体を含む。タンパク質またはタンパク質複合体は、ＲＮＡ－ＤＮＡヘテロ二本鎖、Ｒループ、またはそれらの組み合わせから選択される特徴を認識することができる場合がある。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、Ｃａｓ９、カスケード複合体、ＲｅｃＡ、ＲＮａｓｅＨ、ＲＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ、またはそれらの組み合わせから選択されるＲループを認識することができるタンパク質またはタンパク質複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、標的ＤＮＡに結合することができる操作されたタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーアレイ、転写活性化因子様（ＴＡＬ）アレイ、及びそれらの組み合わせから選択されるＤＮＡ配列に結合することができるタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、天然に存在するＤＮＡ結合ドメインを含むタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ｂＺＩＰドメイン、ヘリックスループヘリックス、ヘリックスターンヘリックス、ＨＭＧボックス、ロイシンジッパー、ジンクフィンガー、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ゲノム内の特定の遺伝子座に向けられたオリゴヌクレオチドを含む。例示的なオリゴヌクレオチドとしては、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ＲＮＡ－ＤＮＡヘテロ二重鎖、Ｒループ、及びそれらの任意の組み合わせから選択される特徴を認識することができるタンパク質またはタンパク質複合体を

含む。Ｒループを認識することができる例示的なタンパク質またはタンパク質複合体としては、Ｃａｓ９、カスケード複合体、ＲｅｃＡ、ＲＮａｓｅ　Ｈ、ＲＮＡポリメラーゼ、ＤＮＡポリメラーゼ、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｒループを認識することができるタンパク質またはタンパク質複合体は、Ｃａｓ９を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーアレイ、ＴＡＬアレイ、及びそれらの任意の組み合わせから選択されるＤＮＡ配列に結合することができるタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ゲノム内の標的位置に向けられたオリゴヌクレオチドと、標的ＤＮＡ配列に結合することができるタンパク質と、を含む。

【１６１２】

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、少なくとも１つのガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、２つのｇＲＮＡを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、第１のｇＲＮＡは、二本鎖ＤＮＡ標的配列の第１の鎖に特異的に結合し、第２のｇＲＮＡは、二本鎖ＤＮＡ標的配列の第２の鎖に特異的に結合する。代替的に、実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ、ＴＡＬタンパク質とも称される）のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓまたはＲａｌｓｔｏｎｉａに由来するＴＡＬＥＮまたはＴＡＬタンパク質のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【１６１３】

ＩＩ．エフェクター分子

いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ゲノム内の特定の遺伝子座で所定の効果を発揮することができる。例示的なエフェクター分子、限定されないが、転写因子（活性化因子または抑制因子）、クロマチンリモデリング因子、ヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、トランスポザーゼ、メチトランスフェラーゼ、デメチラーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、デアセチラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、インテグラーゼ、リコンビナーゼ、リガーゼ、トポイソメラーゼ、ギラーゼ、ヘリカーゼ、フルオロフォア、またはそれらの任意の組み合わせ。

【１６１４】

いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、トランスポザーゼを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ＰＢトランスポザーゼ（ＰＢａｓｅ）を含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ヌクレアーゼを含む。ヌクレアーゼの非限定的な例としては、制限エンドヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、Ｓ１ヌクレアーゼ、緑豆ヌクレアーゼ、膵臓ＤＮａｓｅ　Ｉ、マイクロコッカスヌクレアーゼ、酵母ＨＯエンドヌクレアーゼ、またはそれらの任意の組み合わせが挙げられる。ある特定の実施形態では、エフェクター分子は、制限エンドヌクレアーゼを含む。ある特定の実施形態では、エフェクター分子は、ＩＩＳ型制限エンドヌクレアーゼを含む。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、エンドヌクレアーゼを含む。エンドヌクレアーゼの非限定的な例としては、ＡｃｉＩ、Ｍｎ１Ｉ、ＡｌｗＩ、ＢｂｖＩ、ＢｃｃＩ、ＢｃｅＡＩ、ＢｓｍＡＩ、ＢｓｍＦＩ、ＢｓｐＣＮＩ、ＢｓｒＩ、ＢｔｓＣＩ、ＨｇａＩ、ＨｐｈＩ、ＨｐｙＡＶ、Ｍｂｏ１Ｉ、Ｍｙ１Ｉ、ＰｌｅＩ、ＳｆａＮＩ、ＡｃｕＩ、ＢｃｉＶＩ、ＢｆｕＡＩ、ＢｍｇＢＩ、ＢｍｒＩ、ＢｐｍＩ、ＢｐｕＥＩ、ＢｓａＩ、ＢｓｅＲＩ、ＢｓｇＩ、ＢｓｍＩ、ＢｓｐＭＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＤＩ、ＢｔｇＺＩ、ＢｔｓＩ、ＥａｒＩ、ＥｃｉＩ、ＭｍｅＩ、ＮｍｅＡＩＩＩ、ＢｂｖＣＩ、Ｂｐｕ１０Ｉ、ＢｓｐＱＩ、ＳａｐＩ、ＢａｅＩ、ＢｓａＸＩ、ＣｓｐＣＩ、ＢｆｉＩ、ＭｂｏＩＩ、Ａｃｃ３６Ｉ及びＣｌｏ０５１が挙げられる。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ＢｍｒＩ、ＢｆｉＩ、またはＣｌｏ０５１を含む。

【１６１５】

いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含む

か、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ヌクレアーゼ、任意選択でエンドヌクレアーゼを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメインまたはその断片を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は、触媒不活性または「不活性化」Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９（ＷＯ２０１９／１２６５７８の配列番号３０２及び３０３））である。いくつかの実施形態では、Ｃａｓ９は、Ｃａｓ９の触媒不活性または「不活性化」ヌクレアーゼドメインである。いくつかの実施形態では、ｄＣａｓ９は、本明細書で「小さい」ｄＣａｓ９またはｄＳａＣａｓ９（ＷＯ２０１９／１２６５７８の配列番号２３）と称される、完全な長さの触媒不活性Ｃａｓ９に由来するより短い配列によってコードされる。

【１６１６】

融合タンパク質のいくつかの実施形態では、エフェクター分子は、１つ以上のＩＩ型ヌクレアーゼのホモ二量体またはヘテロ二量体を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。融合タンパク質のいくつかの実施形態では、エフェクター分子は、ＩＩ型ヌクレアーゼのホモ二量体またはヘテロ二量体を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＩＩ型ヌクレアーゼは、ＡｃｉＩ、Ｍｎ１Ｉ、ＡｌｗＩ、ＢｂｖＩ、ＢｃｃＩ、ＢｃｅＡＩ、ＢｓｍＡＩ、ＢｓｍＦＩ、ＢｓｐＣＮＩ、ＢｓｒＩ、ＢｔｓＣＩ、ＨｇａＩ、ＨｐｈＩ、ＨｐｙＡＶ、Ｍｂｏ１Ｉ、Ｍｙ１Ｉ、ＰｌｅＩ、ＳｆａＮＩ、ＡｃｕＩ、ＢｃｉＶＩ、ＢｆｕＡＩ、ＢｍｇＢＩ、ＢｍｒＩ、ＢｐｍＩ、ＢｐｕＥＩ、ＢｓａＩ、ＢｓｅＲＩ、ＢｓｇＩ、ＢｓｍＩ、ＢｓｐＭＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＤＩ、ＢｔｇＺＩ、ＢｔｓＩ、ＥａｒＩ、ＥｃｉＩ、ＭｍｅＩ、ＮｍｅＡＩＩＩ、ＢｂｖＣＩ、Ｂｐｕ１０Ｉ、ＢｓｐＱＩ、ＳａｐＩ、ＢａｅＩ、ＢｓａＸＩ、ＣｓｐＣＩ、ＢｆｉＩ、ＭｂｏＩＩ、Ａｃｃ３６ＩまたはＣｌｏ０５１のうちの１つ以上を含む。

【１６１７】

いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、Ｃｌｏ０５１、ＢｆｉＩまたはＢｍｒＩを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメイン、またはＣｌｏ０５１、ＢｆｉＩ、もしくはＢｍｒＩとヘテロ二量体を形成するその断片を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、Ｃａｓ９の触媒不活性形態（例えば、ｄＣａｓ９もしくはｄＳａＣａｓ９）またはＣｌｏ０５１とヘテロ二量体を形成するその断片を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。例示的なＣｌｏ０５１ヌクレアーゼドメインは、以下のアミノ酸配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る：ＥＧＩＫＳＮＩＳＬＬＫＤＥＬＲＧＱＩＳＨＩＳＨＥＹＬＳＬＩＤＬＡＦＤＳＫＱＮＲＬＦＥＭＫＶＬＥＬＬＶＮＥＹＧＦＫＧＲＨ　ＬＧＧＳＲＫＰＤＧＩＶＹＳＴＴＬＥＤＮＦＧＩＩＶＤＴＫＡＹＳＥＧＹＳＬＰＩＳＱＡＤＥＭＥＲＹＶＲＥＮＳＮＲＤＥＥＶＮ　ＰＮＫＷＷＥＮＦＳＥＥＶＫＫＹＹＦＶＦＩＳＧＳＦＫＧＫＦＥＥＱＬＲＲＬＳＭＴＴＧＶＮＧＳＡＶＮＶＶＮＬＬＬＧＡＥ　ＫｌＲＳＧＥＭＴＩＥＥＬＥＲＡＭＦＮＮＳＥＦＩＬＫＹ（配列番号２９９）。

【１６１８】

いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、ＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓまたはＲａｌｓｔｏｎｉａに由来するＴＡＬＥＮまたはＴＡＬタンパク質のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、Ｃｌｏ０５１、ＢｆｉＩまたはＢｍｒＩとホモ二量体またはヘテロ二量体を形成するＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓまたはＲａｌｓｔｏ

ｎｉａに由来するＴＡＬＥＮまたはＴＡＬタンパク質のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ホモ二量体またはヘテロ二量体を含むエフェクター分子を含むエフェクター分子は、Ｃｌｏ０５１とホモ二量体またはヘテロ二量体を形成するＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓまたはＲａｌｓｔｏｎｉａに由来するＴＡＬＥＮまたはＴＡＬタンパク質のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【１６１９】

ＩＩＩ．連結

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ＤＮＡ局在化成分及びエフェクター分子を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質の１つ以上の成分をコードする核酸配列は、例えば、発現ベクター内で作動可能に連結され得る。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、キメラタンパク質である。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、１つ以上の組換え核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質はまた、融合タンパク質の２つの成分を作動可能に連結するリンカー領域を含む。例えば、実施形態では、融合タンパク質は、リンカー領域によって作動可能に連結されたＤＮＡ局在化成分及びエフェクター分子を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分、リンカー領域、及びエフェクター分子は、核酸配列の翻訳が融合タンパク質をもたらすように、発現カセット及び／または発現ベクターに挿入された１つ以上の核酸配列によってコードされ得る。実施形態では、融合タンパク質は、ＤＮＡ局在化成分とエフェクター分子との間に非共有連結を含むことができる。非共有連結は、抗体、抗体断片、抗体模倣物、または足場タンパク質を含むことができる。

【１６２０】

ＩＶ．融合タンパク質

いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、少なくとも１つのｇＲＮＡを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、エフェクター分子は、Ｃａｓ９、Ｃａｓ９ヌクレアーゼドメイン、またはその断片を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、少なくとも１つのｇＲＮＡを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、エフェクター分子は、不活性化Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）または不活性化ヌクレアーゼドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、少なくとも１つのｇＲＮＡを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、エフェクター分子は、不活性化された小さなＣａｓ９（ｄＳａＣａｓ９）を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、Ｃａｓ９、ｄＣａｓ９、ｄＳａＣａｓ９、またはそのヌクレアーゼドメイン、及び第２のエンドヌクレアーゼを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。第２のエンドヌクレアーゼは、ＡｃｉＩ、Ｍｎ１Ｉ、ＡｌｗＩ、ＢｂｖＩ、ＢｃｃＩ、ＢｃｅＡＩ、ＢｓｍＡＩ、ＢｓｍＦＩ、ＢｓｐＣＮＩ、ＢｓｒＩ、ＢｔｓＣＩ、ＨｇａＩ、ＨｐｈＩ、ＨｐｙＡＶ、Ｍｂｏ１Ｉ、Ｍｙ１Ｉ、ＰｌｅＩ、ＳｆａＮＩ、ＡｃｕＩ、ＢｃｉＶＩ、ＢｆｕＡＩ、ＢｍｇＢＩ、ＢｍｒＩ、ＢｐｍＩ、ＢｐｕＥＩ、ＢｓａＩ、ＢｓｅＲＩ、ＢｓｇＩ、ＢｓｍＩ、ＢｓｐＭＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＤＩ、ＢｔｇＺＩ、ＢｔｓＩ、ＥａｒＩ、ＥｃｉＩ、ＭｍｅＩ、ＮｍｅＡＩＩＩ、ＢｂｖＣＩ、Ｂｐｕ１０Ｉ、ＢｓｐＱＩ、ＳａｐＩ、ＢａｅＩ、ＢｓａＸＩ、ＣｓｐＣＩ、ＢｆｉＩ、ＭｂｏＩＩ、Ａｃｃ３６ＩまたはＣｌｏ０５１のうちの１つ以上を含むが、これらに限定されないＩＩＳ型エンドヌクレアーゼを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【１６２１】

融合タンパク質のいくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ、ＴＡＬタンパク質とも称される）のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、エフェクター分子は、エンドヌクレアーゼを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。本開示の

融合タンパク質のいくつかの実施形態では、ＤＮＡ局在化成分は、ＸａｎｔｈｏｍｏｎａｓまたはＲａｌｓｔｏｎｉａに由来するＴＡＬＥＮまたはＴＡＬタンパク質のＤＮＡ結合ドメインを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなり、エフェクター分子は、ＡｃｉＩ、Ｍｎ１Ｉ、ＡｌｗＩ、ＢｂｖＩ、ＢｃｃＩ、ＢｃｅＡＩ、ＢｓｍＡＩ、ＢｓｍＦＩ、ＢｓｐＣＮＩ、ＢｓｒＩ、ＢｔｓＣＩ、ＨｇａＩ、ＨｐｈＩ、ＨｐｙＡＶ、Ｍｂｏ１Ｉ、Ｍｙ１Ｉ、ＰｌｅＩ、ＳｆａＮＩ、ＡｃｕＩ、ＢｃｉＶＩ、ＢｆｕＡＩ、ＢｍｇＢＩ、ＢｍｒＩ、ＢｐｍＩ、ＢｐｕＥＩ、ＢｓａＩ、ＢｓｅＲＩ、ＢｓｇＩ、ＢｓｍＩ、ＢｓｐＭＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＢＩ、ＢｓｒＤＩ、ＢｔｇＺＩ、ＢｔｓＩ、ＥａｒＩ、ＥｃｉＩ、ＭｍｅＩ、ＮｍｅＡＩＩＩ、ＢｂｖＣＩ、Ｂｐｕ１０Ｉ、ＢｓｐＱＩ、ＳａｐＩ、ＢａｅＩ、ＢｓａＸＩ、ＣｓｐＣＩ、ＢｆｉＩ、ＭｂｏＩＩ、Ａｃｃ３６ＩまたはＣｌｏ０５１のうちの１つ以上を含むが、これらに限定されないＩＩＳ型エンドヌクレアーゼを含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。

【１６２２】

ある特定の実施形態では、例示的なｄＣａｓ９－Ｃｌｏ０５１融合タンパク質は、ＷＯ２０１９／１２６５７８の配列番号３０５もしくは３０７のアミノ酸配列、またはＷＯ２０１９／１２６５７８の配列番号３０６または３０８の核酸配列を含み得るか、それから本質的になり得るか、またはそれからなり得る。

【１６２３】

Ｖ．構築物

いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、ｄＣａｓ９及びＣｌｏ０５１を含むか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、ｄＳａＣａｓ９及びＣｌｏ０５１を含むか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなる。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ－ＴＡＬＥ及びＣｌｏ０５１を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、ヌクレアーゼドメインは、Ｒａｌｓｔｏｎｉａ－ＴＡＬＥ及びＣｌｏ０５１を含むか、それから本質的になるか、またはそれからなる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、ｄＣａｓ９－Ｃｌｏ０５１、ｄＳａＣａｓ９－Ｃｌｏ０５１、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ－ＴＡＬＥ－Ｃｌｏ０５１、またはＲａｌｓｔｏｎｉａ－ＴＡＬＥ－Ｃｌｏ０５１を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質をコードするベクターは、Ｃｓｙ４－Ｔ２Ａ－Ｃｌｏ０５１－Ｇ４Ｓｌｉｎｋｅｒ－ｄＣａｓ９（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｃｏｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）またはｐＲＴ１－Ｃｌｏ０５１－ｄＣａｓ９ダブルＮＬＳを含む。

【１６２４】

いくつかの実施形態によれば、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系は、ＤＮＡ局所化成分及びエフェクター分子を含む融合タンパク質を含み、ＤＮＡ局所化成分は、ＴＩＬにおいてＤＮＡ分子の標的配列にハイブリダイズし、ＤＮＡ分子が少なくとも１つの免疫チェックポイント分子をコードし、ＴＩＬが少なくとも１つの免疫チェックポイント分子を発現し、エフェクター分子がＤＮＡ分子を切断し、それによって、少なくとも１つの免疫チェックポイント分子の発現が改変される。

【１６２５】

特定の実施形態によれば、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法は、免疫チェックポイント遺伝子（複数可）の標的ＤＮＡ配列に特異的なＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系（例えば、ｄＣａｓ９－Ｃｌｏ０５１、ｄＳａＣａｓ９－Ｃｌｏ０５１、Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ－ＴＡＬＥ－Ｃｌｏ０５１、またはＲａｌｓｔｏｎｉａ－ＴＡＬＥ－Ｃｌｏ０５１融合タンパク質）を導入することによって、ＴＩＬにおける１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させることを含む。融合タンパク質は、ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、タンパク質として送達されてもよい。ゲノムとＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系との接触時に、標的二本鎖ＤＮＡの１つ以上の鎖を切断してもよい。切断が、１つ以上のＤＮＡ修復経路またはその構成要素の存在下で行われる場合、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法は、１つ以上の塩基対の挿入、欠失、または置換によって、遺伝子発現を中断するか、またはゲノム配列を修飾するかの

いずれかである。ＤＳＢは、ＤＮＡの挿入または欠失（インデル）を頻繁に引き起こす機序である、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって細胞内で修復され得る。インデルは、多くの場合、フレームシフトをもたらし、例えば、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内で早期停止コドンを引き起こすことによって、機能対立遺伝子の喪失を引き起こす。ある特定の実施形態によれば、結果は、標的免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

【１６２６】

代替的に、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系によって誘導されるＤＳＢは、ＮＨＥＪの代わりに相同指向修復（ＨＤＲ）によって修復されてもよい。ＮＨＥＪ媒介ＤＳＢ修復は、しばしば遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊するが、相同指向修復（ＨＤＲ）を使用して、単一ヌクレオチド変化から大きな挿入までの範囲の特異的なヌクレオチド変化を生成することができる。いくつかの実施形態によれば、ＨＤＲは、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系を有するＴＩＬに所望の配列を含むＤＮＡ修復テンプレートを送達することによって、免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集、ならびに標的遺伝子のすぐ上流及び下流の追加の相同配列（多くの場合、左及び右の相同アームと称される）を含む。

【１６２７】

Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１６２８】

Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得る系、方法、及び組成物の例は、ＷＯ２０１９／１２６５７８、ＵＳ２０１７／０１０７５４１、ＵＳ２０１７／０１１４１４９、ＵＳ２０１８／０１８７１８５、及び米国特許第１０，４１５，０２４号に記載されており、それらの内容は参照により本明細書に組み込まれる。ＣＬＯＶＥＲ　ｍＲＮＡ及びＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ　ｍＲＮＡ構築物などのＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法を実行するための資源は、Ｄｅｍｅｅｔｒａ　ａｎｄ　Ｈｅｒａ　Ｂｉｏｌａｂｓなどの企業から市販されている。

【１６２９】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を

刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系を含む少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質の発現を調節する。

【１６３０】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するこ

と、を含み、
エレクトロポレーションステップが、Ｃａｓ－ＣＬＯＶＥＲ系を含む少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質の発現を阻害する。
【１６３１】
５．ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）法
いくつかの実施形態では、本明細書に記載される対象のＴＩＬは、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）を使用して内因性タンパク質発現を低減するように修飾される。いくつかの実施形態では、核酸は、内因性遺伝子の発現を抑制するＲＮＡ（例えば、ｓｈＲＮＡ）をコードする対象ＴＩＬに導入される。
【１６３２】
本明細書で使用される「ｓｈＲＮＡ」は、短いヘアピンＲＮＡであり、これは、ＲＮＡ干渉を介して遺伝子発現をサイレンシングするために使用することもできるタイトなヘアピン回転を行うＲＮＡの配列である。細胞におけるｓｈＲＮＡの発現は、典型的には、プラスミドの送達によって、またはウイルスもしくは細菌ベクターを介して達成される。ｓｈＲＮＡは、比較的低い分解速度及び転換率を有するという点で、ＲＮＡｉの有利な媒介因子である。
【１６３３】
ｓｈＲＮＡ設計は、典型的には、単純なステムループｓｈＲＮＡ及びｍｉｃｒｏＲＮＡ適応ｓｈＲＮＡの２つのフォーマットに分けられる。塩基性ｓｈＲＮＡは、前駆体ｍｉｃｒｏＲＮＡ（ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ）上でモデル化され、プロモーターの制御下で転写されるウイルスベクター内にクローニングされる。例示的なプロモーターとしては、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ）及びポリメラーゼＩＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩＩ）プロモーター（例えば、Ｕ６及びＨ１プロモーター）が挙げられるが、これらに限定されない。ｓｈＲＮＡは、約４０～７０ヌクレオチド長の一本鎖分子として産生され、一本鎖ＲＮＡの領域（ループ）によって架橋された二本鎖ＲＮＡ（幹）の１９～２９塩基対の領域及びショート３’オーバーハングからなる幹ループ構造を形成する。転写されると、ｓｈＲＮＡは核を出て、細胞質内のヌクレアーゼＤｉｃｅｒによってループで切断され、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）に入り、標的相補的ｍＲＮＡの切断及びその後の分解を指示する。ｍｉｃｒｏＲＮＡ適応ｓｈＲＮＡは、内因性ｍｉｃｒｏＲＮＡのループ及び隣接配列に囲まれたｍｉｃｒｏＲＮＡ様ミスマッチを有するｓｈＲＮＡ幹構造からなる。ｍｉｃｒｏＲＮＡ適応ｓｈＲＮＡは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（Ｐｏｌ　ＩＩ）プロモーターから転写され、核内の内因性ＲＮａｓｅ　ＩＩＩ　Ｄｒｏｓｈａ酵素によって切断され、次いで細胞質に輸出され、Ｄｉｃｅｒによって処理され、ＲＩＳＣ複合体にロードされる。研究は、Ｄｒｏｓｈａ及びＤｉｃｅｒの両方によって処理されるｍｉｃｒｏＲＮＡ足場の使用が、より効率的な処理を促進し、インビボＲＮＡｉに対する毒性を低減し得ることを示唆している。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ修飾のためのｓｈＲＮＡは、単純なステムループｓｈＲＮＡである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ修飾のためのｓｈＲＮＡは、ｍｉｃｒｏＲＮＡ適応ｓｈＲＮＡである。
【１６３４】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される対象のＴＩＬ修飾のためのｓｈＲＮＡは、ｍＲＮＡの標的タンパク質の少なくとも１３ヌクレオチド、少なくとも１４ヌクレオチド、少なくとも１５ヌクレオチド、少なくとも１６ヌクレオチド、少なくとも１７ヌクレオチド、少なくとも１８ヌクレオチド、少なくとも１９ヌクレオチド、少なくとも２０ヌクレオチド、少なくとも２１ヌクレオチド、少なくとも２２ヌクレオチド、少なくとも２３ヌクレオチド、少なくとも２４ヌクレオチド、少なくとも２５ヌクレオチド、少なくとも２６ヌクレオチド、少なくとも２７ヌクレオチド、少なくとも２８ヌクレオチド、少なくとも２９ヌクレオチド、または少なくとも３０ヌクレオチドに相補的な配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される対象のＴＩＬ修飾のためのｓｈＲＮＡは

、ｍＲＮＡの標的タンパク質の１３ヌクレオチド、１４ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、１６ヌクレオチド、１７ヌクレオチド、１８ヌクレオチド、１９ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２１ヌクレオチド、２２ヌクレオチド、２３ヌクレオチド、２４ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、２６ヌクレオチド、２７ヌクレオチド、２８ヌクレオチド、２９ヌクレオチド、または３０ヌクレオチドに相補的な配列を含む。

【１６３５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ修飾に使用されるｓｈＲＮＡは、４０～５０ヌクレオチド長、４５～５５ヌクレオチド長、５０～６０ヌクレオチド長、５５～６５ヌクレオチド長、または６０～７０ヌクレオチド長である。

【１６３６】

ｓｈＲＮＡは、任意の好適な方法を使用して、細胞（例えば、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬ）に送達され得る。プラスミドについては、脂質トランスフェクション試薬の使用またはエレクトロポレーションなどの典型的なトランスフェクション方法を用いることができる。いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子を使用して、修飾のためにｓｈＲＮＡを細胞に導入する。いくつかの実施形態では、選択マーカーは、ｓｈＲＮＡで正常にトランスフェクトまたは形質導入されなかった培養物中の細胞の除去を可能にするために含まれ、それによって、ｓｈＲＮＡを含む修飾された細胞の純粋な培養を可能にする。

【１６３７】

ｓｈＲＮＡ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、１つまたは２つの免疫チェックポイントが含まれる。ｓｈＲＮＡ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＴＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上、例えばＰＤ－１及びＬＡＧ３、ＰＤ－１及びＴＩＭ３、ＴＩＭ３及びＣＴＬＡ－４など）が含まれる。

【１６３８】

いくつかの実施形態では、ｓｈＲＮＡは、本明細書に記載される対象のＴＩＬにおける免疫チェックポイント（例えば、本明細書に提供される免疫チェックポイントのうちのいずれか）の発現を減少させるためのものである。いくつかの実施形態では、１つ以上のｓｈＲＮＡを、以下の免疫チェックポイントタンパク質のうちの１つ以上の発現を修飾するためにＴＩＬに導入する：ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＧＩＴ、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＴＯＸ。対象のＴＩＬを修飾するのに有用な例示的なｓｈＲＮＡ配列は、実施例に記載される。

【１６３９】

Ｈ．拡張ＴＩＬの表現型特徴

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＢにおける第１の拡張後に分析される。いくつかの実

施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＣにおける遷移中に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＣによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＤにおける第２の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）からのステップＤによる２回以上の拡張後に分析される。

【１６４０】

いくつかの実施形態では、マーカーは、ＣＤ８及びＣＤ２８からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、高いＣＤ２８発現は、より若く、より持続的なＴＩＬ表現型を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【１６４１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８に基づく第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡張するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【１６４２】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７及びＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。

【１６４３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、セントラルメモリー（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、エフェクターメモリー（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。

【１６４４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢ、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう１つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グラニュライシンを発現する。
【１６４５】
いくつかの実施形態では、再刺激されたＴＩＬは、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に提供されるように、ステップＤの後の急速な第２の拡張ステップの後のＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの健康は、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）ＴＩＬに提供されるようなＧｅｎ３プロセスのステップＤにおけるＩＦＮ－γ産生の増加は、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスのステップと比較して、ステップＤ　ＴＩＬの細胞傷害能の増加を示している。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、エクスビボでのＴＩＬ中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図８Ｂの方法を含む、本発明の方法によって産生されたＴＩＬを含む、ＴＩＬにおいてエクスビボで測定される。
【１６４６】
いくつかの実施形態では、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【１６４７】
いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ～約１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである

。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１６４８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または

図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０

００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１６４９】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図８（特に、例えば図８Ａ）に例示されるようにＧｅｎ２と称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態

では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドＣＤＲの数に基づくＧｅｎ２と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

【１６５０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性化及び疲弊は、１つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＣＤ３、ＰＤ－１、２Ｂ４／ＣＤ２４４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＢＴＬＡ、ＫＬＲＧ、ＴＩＭ－３、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４、ＣＤ４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ１８３、ＣＤ６９、ＣＤ９５、ＣＤ１２７、ＣＤ１０３、及び／またはＬＡＧ－３）からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９＋、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９－、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、Ｔ細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び／または分析され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカーには、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ３、ＦｏｘＰ３、Ｔｉｍ－３、ＰＤ－１、ＣＤ１０３、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ４５、ＣＤ４、及び／またはＣＤ５９からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。

【１６５１】

いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ～３０００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２８０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、３０００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示

すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである

。いくつかの実施形態では、２６０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ～３００００ｐｇ／１０^{6}ＴＩＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、３０００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを

含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴ

ＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１６５２】

いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超～３０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超、２０００ｐｇ／ｍＬ超、３０００ｐｇ／ｍＬ超、４０００ｐｇ／ｍＬ超、５０００ｐｇ／ｍＬ超、６０００ｐｇ／ｍＬ超、７０００ｐｇ／ｍＬ超、８０００ｐｇ／ｍＬ超、９０００ｐｇ／ｍＬ超、１００００ｐｇ／ｍＬ超、２００００ｐｇ／ｍＬ超、３００００ｐｇ／ｍＬ超、４００００ｐｇ／ｍＬ超、５００００ｐｇ／ｍＬ超、６００００ｐｇ／ｍＬ超、７００００ｐｇ／ｍＬ超、８００００ｐｇ／ｍＬ超、９００００ｐｇ／ｍＬ超、１０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を

示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ

／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬグランザイムＢ分泌である。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄを含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１６５３】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張方法は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄに提供されるようなＴＩＬを含む、インビトロで増加したグランザイムＢ分泌を示す拡張されたＴＩＬ集団を産生する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍～５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも６倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも７倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも８倍増加する。いくつかの

実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも９倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５０倍増加する。

【１６５４】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上低いレベルのＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも２倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも３倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも４倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも５倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１６５５】

いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細

胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬである。

【１６５６】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びグランザイムＢのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたＴＩＬの表現型特徴を決定する。

【１６５７】

いくつかの実施形態では、表現型特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【１６５８】

Ｉ．サイトカイン担体

本明細書で論じられるように、いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、サイトカインキャリア（本明細書ではサイトカインバックパックとも称される）の結合パートナーを発現するように遺伝子修飾することができる。サイトカイン担体は、サイトカインを封入または提示するリポソーム、小胞、またはナノ粒子であってもよい。

【１６５９】

任意の好適な遺伝子修飾方法を使用して、例えば、本明細書に記載される遺伝子編集方法のうちのいずれかを含む、サイトカイン担体に対するそのような結合パートナーを含むように、対象のＴＩＬを遺伝子修飾することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾方法は、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、ジンクフィンガー、またはＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法である。いくつかの実施形態では、そのような修飾されたＴＩＬは、本明細書で提供されるレトロウイルス法（例えば、レンチウイルス法）のうちのいずれか１つを使用して産生される。いくつかの実施形態では、かかる修飾は、本明細書に記載のトランスポゾン／トランスポザーゼ系、例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉ

ｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ　ａｈｄ　Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）のうちのいずれかを使用して産生される。

【１６６０】

いくつかの実施形態では、サイトカイン担体によって封入または提示されるサイトカインには、投与されるＴＩＬの拡張を促進するために腫瘍微小環境を調節するサイトカインが含まれるが、これらに限定されない。かかるサイトカインの非限定的な例としては、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＩＬ－１２、及びＩＬ－１８が挙げられる。

【１６６１】

サイトカインバックパックは、サイトカインバックパックが遺伝子修飾されたＴＩＬに結合するように、遺伝子修飾されたＴＩＬの表面上に発現される結合パートナーによって認識されるエピトープまたは抗体を含み得る。加えて、サイトカインバックパックは、遺伝子修飾されたＴＩＬへの結合及び腫瘍微小環境への曝露時にサイトカインを放出するように設計され、次いで、サイトカインは、ＴＩＬの拡張を促進することができる。

【１６６２】

したがって、いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックは、構造Ｂ１－（Ｌ１）$_{n}$－Ｃ１－（Ｌ２）$_{m}$－Ｂ２を有する分子を含んでもよく、Ｂ１は、ＴＩＬ表面に発現された結合パートナーを認識し、結合する部分（例えば、抗体またはエピトープ）であり、Ｃ１は、ＴＭＥ中でサイトカインバックパックの放出を可能にする不安定な部分であり、Ｌ１は、リンカーであり、Ｌ２は、リンカーであり、ｎ及びｍは、独立して、ゼロまたは１であり、Ｂ２は、サイトカイン担体（例えば、サイトカインを封入または提示するリポソーム、小胞またはナノ粒子）である。いくつかの実施形態では、Ｃ１は、不安定な化学結合であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、Ｃ１は、不安定な化学構造であるか、またはそれを含む。

【１６６３】

いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックＢ２は、クリック化学によって結合部分Ｂ１に付着し、Ｃ１は、１つ以上の求核性開環反応に感受性のある化学構造を含む。

【１６６４】

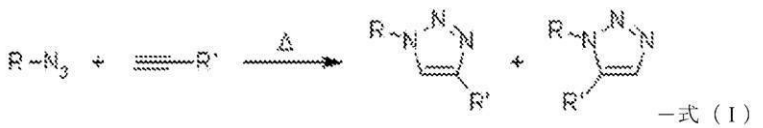
クリック化学は、エポキシド及びアジリジンの求核性開環反応、ヒドラゾン及び複素環の形成などの非アルドール型カルボニル反応、エポキシド及びマイケル付加の酸化形成などの炭素－炭素多重結合への付加、ならびに環付加反応など、特異的に１つの生成物につながるいくつかのタイプの熱力学的に好ましい反応を指す。

【１６６５】

結合部分Ｂ１を適切なバックパック部分Ｂ２とコンジュゲートするために使用することができるクリック化学反応の一例は、式（Ｉ）に示されるアジド－アルキン環付加物であり、

【１６６６】

【数１】



－式（Ｉ）

式中、Ｃ１は、環化付加反応の１，２，３－トリアゾール生成物であるか、またはそれを

含む。

【１６６７】

出発モノ置換アルキン及び有機アジドの多くは市販されており、他の多くは広範囲の官能基で容易に合成することができ、それらの環付加反応は、選択的に１，２，３－トリアゾールをもたらす。

【１６６８】

一実施例では、Ｃ１は、ビオチン－ストレプトアビジン結合であってもよい。いくつかの実施形態では、結合パートナーＢ１は、Ｎ－アジドシアリン酸、及びスルホ－ジベンジルシクロオクチン－ビオチンコンジュゲートの反応生成物である。遺伝子修飾されたＴＩＬは、代謝され、Ｎ－アジド－シアル酸としてＴＩＬ表面上に発現された結合パートナーのグリカン構造に組み込まれるテトラ－アシル化Ｎ－アジドアセチルマンノサミン（Ac_4－ＭａｎＮＡｚ）を補充した細胞培養培地とともにインキュベートすることができる。次いで、スルホ－ジベンジルシクロオクチン－ビオチンコンジュゲートを添加して、ＴＩＬ－Ｂ１を提示するビオチンを取得することができる。かかる実施形態では、Ｌ１は、存在しなくてもよく（$(L1)_{n=0}$）、Ｌ２（$(L2)_{m=1}$）は、リポソーム、小胞、またはナノ粒子（Ｂ２）にストレプトアビジンがコンジュゲートされていてもよい。$(L2)_{m=1}$にＢ２構築物をＴＩＬ－Ｂ１に添加して、ストレプトアビジン－ビオチン（Ｃ１）結合を形成し、Ｂ１を$(L2)_{m=1}$－Ｂ２に連結して、ＴＩＬ－Ｂ１－Ｃ１－$(L2)_{m=1}$－Ｂ２を形成することができる。

【１６６９】

投与時に、ＴＩＬは、ビオチン－ストレプトアビジン結合が徐々に切断されるときにサイトカインバックパックを放出することができる。

【１６７０】

いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックは、サイトカインバックパックを、酵素的に切断可能な部分とコンジュゲートすることによって形成され得る。したがって、かかる実施形態では、Ｂ１とＢ２との間のＣ１における結合または酵素認識部位は、ＴＩＬからサイトカインバックパックを放出するために酵素的に切断され得る。酵素的に切断可能な部分の非限定的な例としては、加水分解酵素によって切断可能なペプチド部分、及びβ－グルクロニド部分が挙げられる。いくつかの実施形態では、Ｃ１は、エステラーゼ切断可能なＰＥＧ脂質（例えば、ＰＥＧ－ジステアロイルホスファチジルエタンダミン）である。

【１６７１】

いくつかの実施形態では、Ｂ１とＢ２との間のＣ１における結合は、ＴＭＥの還元条件によって駆動される酸化還元反応によって切断可能であり得る。Ｂ１とＢ２との間のＣ１における酸化還元切断可能な結合の非限定的な例としては、ビニルエーテル結合、ヒドラゾン結合、ジスルフィド結合、及びエステル結合が挙げられる。したがって、Ｃ１は、ＴＭＥの還元条件における切断を可能にするように好適に選択することができる。いくつかの実施形態では、Ｌ１は、存在しなくてもよく（$(L1)_{n=0}$）、Ｌ２（$(L2)_{m=1}$）は、であり、Ｃ１は、ビニルエーテル脂質（例えば、グリセロリン脂質）から選択される。いくつかの実施形態では、Ｌ１は、存在しなくてもよく（$(L1)_{n=0}$）、Ｌ２（$(L2)_{m=1}$）は、ＰＥＧ（例えば、ＰＥＧアルデヒド）であり、Ｃ１は、ヒドラゾン脂質（例えば、ヒドラゾンコレステリルヘミスクシネート）である。いくつかの実施形態では、Ｌ１は、存在しなくてもよく（$(L1)_{n=0}$）、Ｌ２（$(L2)_{m=1}$）は、ＰＥＧ－アミンであり、Ｃ１は、不飽和無水物－脂質である。いくつかの実施形態では、Ｌ１は、存在しなくてもよく（$(L1)_{n=0}$）、Ｌ２（$(L2)_{m=1}$）は、ＰＥＧ－Ｌ－システインであり、Ｃ１は、ＰＥＧ－Ｌ－システインまたは脂質－Ｌ－システインから選択される。

【１６７２】

図３６は、サイトカインバックパックを結合するための表面アンカーを有するＴＩＬを概略的に示す。

【１６７３】
いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックは、所望のサイトカインがロードされた、または所望のサイトカインを提示するリポソーム、小胞、またはナノゲルであり得る。加えて、サイトカインバックパックは、その表面上（本明細書では「によって装飾される」と互換的に称される）に、本明細書に記載される修飾ＴＩＬの表面上に提示される結合パートナーによって認識される１つ以上の部分を含み得る。したがって、Ｂ２は、リポソーム、小胞もしくはナノゲル、または結合パートナーによって認識可能な部分であり得る。
【１６７４】
いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックは、所望のサイトカインを封入する（例えば、含有する）リポソームであり得る。リポソームは、ホスファチジルコリンなどのリン脂質で構成されることが多く、さらにコレステロールを含む。いくつかの実施形態では、リポソームは、表面リガンドを提示するように設計され得る。リポソームを作製するために使用される特定の脂質は、カプセル化される所望のサイトカインの電荷及びサイズに基づいて選択され得る。
【１６７５】
サイトカイン封入リポソームは、リポソームを形成するための既知の方法のうちのいずれかを使用して形成することができる。典型的には、リポソームは、両親媒性脂質の分散体を水中で超音波処理することによって形成される。しかしながら、超音波処理は、リポソームにカプセル化されている分子の構造を損傷する可能性があるため、押出及びマイクロミキシングなどのリポソームを形成する他の方法が好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、マイクロミキシングは、Ｊａｈｎらによって４（４）ＡＣＳ　Ｎａｎｏ（２０１０），２０７７－２０８７に記載されているような対流拡散混合、またはＺｈｉｇａｌｔｓｅｖらによって２８（７）Ｌａｎｇｍｕｉｒ（２０１２），３６３３－３６４０に記載されているようなぐらつきヘリンボーンマイクロミキサーを使用した、高流量比での水性及びエタノール流のミリ秒混合を含み得る。いくつかの実施形態では、リポソームは、Ｃｏｌａｓらによって３８（８）Ｍｉｃｒｏｎ（２００７），８４１－８４７に記載されているようなＭｏｆａｚａｒｉ法を使用して調製することができる。
【１６７６】
いくつかの実施形態では、リポソームは、脂質膜の外側をスタッディングするＰＥＧで構築されてもよい。ＰＥＧは、Ｂｌｕｍｅらによって１１４９（１）Ｂｉｏｍｅｍｂｒａｎｅｓ（１９９３），１８０－１８４に最初に記載されているように、結合パートナーによって認識可能な部分とコンジュゲートされ得る。
【１６７７】
非限定的な例では、所望のサイトカイン（例えば、ＩＬ－１２）をカプセル化するリポソームは、リポソームを形成するリン脂質の疎水性尾部のうちの１つに結合している（ビシクロ［６．１．０］ノニン）（ＢＣＮ）基とコンジュゲートされ得る。次いで、本明細書に記載される方法のうちのいずれかによって製造されるＴＩＬは、それにタグ付けされたＰＥＧ－アジド分子を有するリン脂質で表面修飾され得る。次いで、リポソームからのＢＣＮ基は、クリック化学を介してアジ化物分子と反応し、所望のサイトカインをカプセル化するリポソームを有するＴＩＬをもたらすことができる。図３５Ａは、ＢＣＮ基を有する脂質クリック分子の構造及び合成の例を示し、図３５Ｂは、それにタグ付けされたＰＥＧ－アジド分子を有するアンカー分子の構造及び合成の例を示す。ＢＣＮ基をリポソームに結合する詳細な化学は、例えば、Ｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，５７１（１２）Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．（２０２０）に記載されている。
【１６７８】
いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックは、所望のサイトカインを含有する、カプセル化する、及び／または提示する小胞であり得る。小胞は、約１００ｎｍ～約１０００ｎｍの範囲の大きな単層小胞（ＬＵＶ）、または約１μｍ～約２００μｍの範囲の巨大な単層小胞（ＧＵＶ）であり得る。リポソームと同様に、小胞は、（カプセル化さ

れる分子を含む）水性緩衝液中へのリン脂質溶液の押出、超音波処理または急速注入によって調製され得る。小胞を調製する様々な方法は、当該技術分野で知られている。小胞形成方法の非限定的な例としては、Ｗａｌｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，１１（７）ＣｈｅｍＢｉｏＣｈｅｍ（２０１０）８４８－８６５、Ｂａｒｅｎｈｏｌｚ　ｅｔ　ａｌ．，１６（２）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９７７）２８０６－２８１０、Ｂａｔｚｒｉ　ａｎｄ　Ｋｏｍ，２９８（４）Ｂｉｏｍｅｍｂｒａｎｅｓ（１０９３）１０１５－１０１９、Ｌｉｔｓｃｈｅｌ　ａｎｄ　Ｓｃｈｗｉｌｌｅ，５０　Ａｎｎｕａｌ　Ｒｅｖｉｅｗ　ｏｆ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃｓ（２０２１）５２５－５４８、及びＳａｔｏ　ａｎｄ　Ｔａｋｉｎｏｕｅ　１０（４）Ｍｉｃｒｏｍａｃｈｉｎｅｓ（２０１９）２１６に記載されているものが挙げられる。

【１６７９】

いくつかの実施形態では、小胞は、本明細書に記載の修飾されたＴＩＬによって提示される結合パートナーによって認識可能な部分で装飾されてもよい。表面部分を有する小胞を提供する方法は、表面部分を有するリポソームを提供するために使用される方法と同様である。

【１６８０】

いくつかの実施形態では、サイトカインバックパックは、ナノゲルであり得る。ナノゲルは、水及び親水性分子を保持することができる架橋された膨潤性ポリマーネットワークによって形成された三次元ヒドロゲルである。いくつかの実施形態では、ナノゲルは、コア－シェル構造またはコア－シェル－コロナ構造を有する球形粒子である。ナノゲルは、天然ポリマー、合成ポリマー、またはそれらの組み合わせから構成され得る。Ｓｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２４０Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ　Ｒｅｌｅａｓｅ（２０１６）１０９－１２６は、所望の分子をカプセル化または封入するナノゲルの様々な合成方法を含む優れたレビューを提供する。ナノゲル合成方法の非限定的な例としては、Ｏ‘Ｒｅｉｌｌｙ　ｅｔ　ａｌ．，３５　Ｃｈｅｍ　Ｓｏｃ　Ｒｅｖ．（２００６）１０６８－１０８３（コアシェルナノ粒子の安定化、官能化及び装飾をレビューしている）、Ｏｉｓｈｉ　ａｎｄ　Ｎａｇａｓａｋｉ，５　Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ（２０１０）４５１－４６８（架橋ポリ（２－［Ｎ，Ｎ－ジエチルアミノ］エチルメタクリレート）（ＰＥＡＭＡ）コア及び生体分子をロードしたＰＥＧでテザリングされた鎖で構成された刺激応答性ＰＥＧ化ナノゲルの調製及び特徴付けを記載している）、Ｅｌｓａｂａｈｙ　ｅｔ　ａｌ．，１１５　Ｃｈｅｍ　Ｒｅｖ．（２０１５）１０９６７－１１０^{11}（薬物及びペプチドがロードされたナノ粒子及びナノゲルの合成方法をレビューしている）、Ｍａｓｓｉ　ｅｔ　ａｌ．，８Ｊ．Ｍａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂ（２０２０）８８９４－８９０７（タンパク質送達のためのペプチド架橋された温度感受性ナノゲルの製剤は、ＭＭＰ－７に応答するように設計されたことを記載する）、Ｋｏｒｄａｌｉｖａｎｄ　ｅｔ．ａｌ，３１５Ｊ．Ｃｏｎｔｒｏｌ．Ｒｅｌｅａｓｅ（２０１９）１１４－１２５（ＣＴＬ及びＣＤ４$^{+}$ヘルパーエピトープを含む長いペプチドにコンジュゲートされたカチオン性デキストランナノゲルを記載している）、Ｓｉｍｏｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１７　Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ：Ｎａｎｏｔｅｃｈ．，Ｂｉｏ．，Ｍｅｄ．（２０１９）３９１－４００（ポリ－Ｌ－リジンとアニオン性ヒアルロン酸ａｃｏｄ多糖類を組み立てることによって形成されるナノゲルを封入するタンパク質の設計、合成及び有効性を記載する）によって記載されるものを含む。

【１６８１】

非限定的な実施例では、本明細書に開示される方法のうちのいずれかを使用して製造されるＴＩＬは、Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，３６（８）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ，（２０１８）７０７に記載されるように、ＰＥＧ－ｂ－ＰＬＬ連結を介して抗（結合パートナー）抗体（例えば、マウス抗ＣＤ４５抗体）で装飾されるように表面修飾されたＩＬ－１５ナノゲルの結合パートナー（例えば、ＣＤ４５）を発現するように遺伝子修飾され得る。

【１６８２】

いくつかの実施形態では、ナノゲルは、所望のサイトカインでロードされ得る。いくつ

かの実施形態では、ナノゲルは、本明細書に記載される修飾されたＴＩＬによって提示された結合パートナーによって認識可能な部分で追加として装飾され得る。

【１６８３】

Ｊ．免疫調節融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、ＴＩＬの表面への免疫調節剤のテザリングを容易にする部分に連結された免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を含む免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、細胞膜アンカー部分（膜貫通ドメイン）を含む。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、ＴＩＬ表面抗原に結合するＴＩＬ表面抗原結合部分を含む。

【１６８４】

任意の好適な遺伝子修飾方法を使用して、例えば、本明細書に記載の遺伝子編集方法のうちのいずれかを含む、そのような免疫調節融合タンパク質を含むように、対象のＴＩＬを遺伝子修飾することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾方法は、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、ジンクフィンガー、またはＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法である。いくつかの実施形態では、そのような修飾されたＴＩＬは、本明細書で提供されるレトロウイルス法（例えば、レンチウイルス法）のうちのいずれか１つを使用して産生される。いくつかの実施形態では、かかる修飾されたＴＩＬは、本明細書に記載のトランスポゾン／トランスポザーゼ系、例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　ＢｅａｕｔｙまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ　ａｈｄ　Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）のうちのいずれかを使用して産生される。

【１６８５】

これらの融合タンパク質の態様は、以下でさらに詳細に考察される。

【１６８６】

１．膜アンカー免疫調節融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む。膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、細胞膜アンカー部分に連結された免疫調節剤（例えば、サイトカイン）のうちの１つ以上を含む。そのような実施形態では、膜アンカー免疫調節剤は、細胞膜アンカー部分を介してＴＩＬ表面膜にテザリングされ、したがって、免疫調節剤がその効果を標的化された方法で発揮することを可能にする。

【１６８７】

免疫調節剤は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質が、ＴＩＬ表面上で発現される。例示的な実施形態では、ＴＩＬは、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む。

【１６８８】

免疫調節剤は、免疫調節剤の、ＴＩＬ細胞表へのテザリングを可能にする細胞膜アンカー部分に連結される。好適な細胞膜アンカー部分には、例えば、内因性ＴＩＬ細胞表面タンパク質の膜貫通ドメイン及びそれらの断片が含まれる。対象の融合タンパク質で使用することができる例示的な膜貫通ドメインには、例えば、Ｂ７－１、Ｂ７－２、及びＣＤ８

ａ膜貫通ドメイン及びそれらの断片が含まれる。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、内因性ＴＩＬ細胞表面タンパク質の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインまたはその断片をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、Ｂ７－１、Ｂ７－２もしくはＣＤ８ａ膜貫通細胞内ドメインまたはその断片である。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴ（配列番号２３８）のアミノ酸配列を有するＣＤ８ａ膜貫通ドメインである。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＬＬＰＳＷＡＩＴＬＩＳＶＮＧＩＦＶＩＣＣＬＴＹＣＦＡＰＲＣＲＥＲＲＲＮＥＲＬＲＲＥＳＶＲＰＶ（配列番号２３９）のアミノ酸配列を有するＢ７－１膜貫通細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、非ペプチド細胞膜アンカー部分である。例示的な実施形態では、非ペプチド細胞膜アンカー部分は、グリコホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーである。ＧＰＩアンカーは、ホスホエタノールアミンリンカー、糖鎖コア、及びリン脂質尾部を含む構造を有する。いくつかの実施形態では、糖鎖コアは、１つ以上の側鎖で修飾される。いくつかの実施形態では、糖鎖コアは、以下の側鎖：ホスホエタノールアミン基、マンノース、ガラクトース、シアル酸、または他の糖のうちの１つ以上で修飾される。

【１６８９】

膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質（例えば、細胞膜アンカー部分に対する免疫調節剤）の成分の連結を可能にするリンカーを含む。好適なリンカーとしては、少なくとも約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、または３０アミノ酸残基の長さであるリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４５～５０、５０～６０アミノ酸の長さである。好適なリンカーとしては、限定されないが、切断可能なリンカー、非切断可能なリンカー、ペプチドリンカー、可撓性リンカー、剛性リンカー、ヘリカルリンカー、または非ヘリカルリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、Ｇｌｙ及びＳｅｒを任意選択で含むペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、例えば、（ＧＳ）ｎ（配列番号２４０）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号２４１）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４２）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４３）、（ＧＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４４）、及び（ＧＧＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４５）を含む、グリシン－セリンポリマーを利用し、ｎは、少なくとも１つの整数（及び一般に、３～１０）である。本組成物及び方法で使用することができる追加のリンカーは、米国特許公開第２００６／００７４００８号、同第２００５／０２３８６４９号、及び同第２００６／００２４３１７号に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、特にリンカーに関連する関連部分に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＬＱ（配列番号２４６）である。

【１６９０】

いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーである。例示的な実施形態では、切断可能なリンカーは、免疫調節剤の、腫瘍微小環境への放出を可能にする。切断可能なリンカーは、２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質が同じＴＩＬで共発現される実施形態においても有用である。例示的な実施形態では、リンカーは、自己切断２Ａペプチドである。例えば、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．７（１）：２１９３（２０１７）（２Ａペプチドに関連する関連部分に参照により組み込まれる）を参照されたい。２Ａペプチドは、真核細胞における翻訳中のポリペプチドの切断を媒介するウイルスオリゴペプチドである。いくつかの実施形態では、２Ａペプチドは、アミノ酸配列ＧＤＶＥＸｉＮＰＧＰ（配列番号２４７）を有するＣ末端を含み、Ｘｉは、任意の天然に存在するアミノ酸残基である。ある特定の実施形態では、２Ａペプチドは、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチド（ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号２４８）である。いくつかの実施形態では、２Ａペプチドは、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチ

ド（ＧＳＧＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ、配列番号２４９）である。ある特定の実施形態では、２Ａペプチドは、口蹄疫ウイルス２Ａペプチド：（ＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号２５０）である。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、フリン切断可能な配列を含む。例示的なフリン切断可能配列は、例えば、Ｄｕｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ １７（１）：１０７－１１２（２００４）、及び米国特許第８，８７１，９０６号に記載されており、これらの各々は参照により、特にフリン切断可能配列に関連する関連部分において本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、２Ａペプチド及びフリン切断可能な配列を含む。例示的ない実施形態では、フリン切断可能な２Ａペプチドは、アミノ酸配列ＲＡＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号２５１）を含む。

【１６９１】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、それによって免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）によって膜アンカー免疫調節融合タンパク質に付着される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカーを介して官能基に可逆的に連結される。好適な分解可能なリンカーには、腫瘍微小環境または炎症組織中に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ２）またはマトリックスメタロプロテアーゼ９（ＭＭＰ９））などの腫瘍微小環境中のプロテアーゼなどの生物学的培地中に存在する１つ以上の酵素に感受性であるプロテアーゼ感受性リンカーが含まれるが、これに限定されない。

【１６９２】

他の実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質の成分は、酵素感受性リンカーによって連結される。例示的な切断可能なリンカーとしては、以下の酵素：メタロプロテアーゼＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、プラスミン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥのうちの１つによって認識されるものが挙げられる。例えば、米国特許第８，５４１，２０３号及び同第８，５８０，２４４号（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、切断可能なリンカーに関連する関連部分に組み込まれる）を参照されたい。

【１６９３】

ある特定の実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、融合タンパク質の、ＴＩＬ細胞膜への転座を容易にするシグナルペプチドを含む。融合タンパク質の、ＴＩＬ細胞膜への局在化を容易にする任意の好適なシグナルペプチドを使用することができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、免疫調節剤の生体活性を干渉しない。例示的なシグナルペプチド配列としては、ヒト顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）受容体シグナル配列、ヒトプロラクチンシグナル配列、及びヒトＩｇＥシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、ヒトＩｇＥシグナル配列を含む。例示的な実施形態では、ヒトＩｇＥシグナル配列は、アミノ酸配列ＭＤＷＴＷＩＬＦＬＶＡＡＡＴＲＶＨＳ（配列番号２５２）を有する。いくつかの実施形態では、ヒトＩｇＥシグナル配列は、アミノ酸配列ＮＩＫＧＳＰＷＫＧＳＬＬＬＬＬＶＳＮＬＬＬＣＱＳＶＡＰ（配列番号２５３）を含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチド配列は、アミノ酸配列ＭＹＲＭＱＬＬＳＣＩＡＬＳＬＡＬＶＴＮＳ（配列番号２５４）を有するＩＬ－２シグナル配列である。

【１６９４】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ

、式：
Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従うものであり、
式中、Ｓは、シグナルペプチドであり、ＩＡは、免疫調節剤であり、Ｌは、リンカーであり、Ｃは、細胞膜アンカー部分である。
【１６９５】
いくつかの実施形態では、シグナルペプチドＳは、配列番号２５２～２５４のうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、配列番号２７７である。例示的な実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、本明細書に記載のＣＤ４０Ｌもしくは抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、Ｃは、Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。上記式による例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質を図３６及び３７に示す。
【１６９６】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｎ末端からＣ末端へ、式：Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従う２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質の各々が、異なる免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、２つ以上の異なる免疫調節剤は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。
【１６９７】
２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含むいくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：
Ｓ１－ＩＡ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｌ２－Ｓ２－ＩＡ２－Ｌ３－Ｃ２に従って配置され、
式中、Ｓ１及びＳ２は、各々シグナルペプチドであり、ＩＡ１及びＩＡ２は、各々免疫調節剤であり、Ｌ１－Ｌ３は、各々リンカーであり、Ｃ１及びＣ２は、各々細胞膜アンカー部分である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、同じ免疫調節剤である。ある特定の実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、異なる免疫調節剤である。本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含む、好適な免疫調節剤。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））、またはそれらの生体活性バリアントから選択される。いくつかのさらなる実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの１つ以上は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの２つ以上は、異なるリンカーである。例示的な実施形態では、Ｌ２は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ２は、フリン切断可能なＰ２Ａリンカーである（例えば、配列番号２５１）。いくつかの実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、独立して、膜貫通ドメイン及び／または膜貫通－細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、同じである。例示的な実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、各々Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。例示的な実施形態では、Ｃ１とＣ２は異なる。
【１６９８】
それらの表面と会合する細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む修飾されたＴＩＬは、融合タンパク質をコードする核酸を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子修飾することによって作製することができる。任意の好適な遺伝子修飾方法を使用して、本明細書に記載される遺伝子編集方法のうちのいずれかを含む、かかる修飾されたＴＩＬを産生することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子編集方法は、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、ジンクフィンガー、またはＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法である。いくつかの実施形態では、かかる修飾されたＴＩＬは、本明細書で提供されるレトロウイルス（例え

ば、レンチウイルス）または非レトロウイルス法のうちのいずれか１つを使用して産生される。いくつかの実施形態では、かかる修飾されたＴＩＬは、本明細書に記載のトランスポゾン／トランスポザーゼ系、例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙまたは Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ及びＨｅｌｒａｉｓｅ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）のうちのいずれかを使用して産生される。

【１６９９】

任意の好適なＴＩＬ集団を遺伝子修飾して、対象の修飾されたＴＩＬ組成物を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図２～６を参照）は、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図７を参照）は、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法の第２のステップ及び／またはＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されるＴＩＬは、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して事前に選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬは、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。

【１７００】

任意の好適なＴＩＬ集団を一過的に遺伝子修飾して、対象の一過的に修飾されたＴＩＬ組成物を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図２～６を参照）を、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現する。例示的な実施形態では、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されたＴＩＬ集団（例えば、図７を参照）を、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現する。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／またはＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されるＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法における第２の拡張ステップ及び／またはＧＥＮ３方法における急速拡張ステップから産生されるＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して事前に選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。

【１７０１】

また、本明細書で提供されるのは、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸、そのような核酸を含む発現ベクター、及び核酸または発現ベクターを含む宿主細胞である。任意の好適なプロモーターを、膜アンカー免疫調節融合タンパク質の発現に使用することができる。例示的な実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質の発現のためのベクターとしては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及びアデノ随伴ベク

ター（ＡＡＶ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾンは、対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質の発現のために使用される。

【１７０２】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。例示的な実施形態では、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの細胞内安定性及び／または翻訳効率を改善する１つ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの半減期を改善する５’キャップまたはキャップ類似体を含む。例示的なキャップ構造としては、ＡＲＣＡ、ｍＣＡＰ、ｍ７ＧｐｐｐＮ（キャップ０）、ｍ７ＧｐｐｐＮｍ（キャップ１）、及びｍ７ＧｐｐｐＮｍｐＮｍ（キャップ２）キャップが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、５’キャップは、ｍ７Ｇｐｐｐ［Ｎ２’Ｏｍｅ］ｎ［Ｎ］ｍに従うものであり、式中、ｍ７Ｇは、Ｎ７－メチル化グアノシンまたは任意のグアノシン類似体であり、Ｎは、任意の天然、修飾または非天然ヌクレオシドであり、「ｎ」は、０～４の任意の整数であり得、「ｍ」は、１～９の整数であり得る。例示的な５’キャップは、米国特許第１０，７０３，７８９号及びＷＯ２０１７／０５３２９７に開示されており、これらは参照によりそれら全体が組み込まれており、具体的には５’キャップ及びキャップ類似体に関する開示についてである。

【１７０３】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）または修飾ＵＴＲをさらに含む。３’ＵＴＲは、アデノシン及びウリジンの伸長を有することが知られている。これらのＡＵリッチシグネチャーは、高い転換率を有する遺伝子において特に一般的である。それらの配列特徴及び機能的特性に基づいて、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）は、３つのクラスに分けることができる（Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５）：クラスＩ　ＡＲＥは、Ｕリッチ領域内にＡＵＵＵＡモチーフのいくつかの分散コピーを含有する。Ｃ－Ｍｙｃ及びＭｙｏＤは、クラスＩ　ＡＲＥを含有する。クラスＩＩ　ＡＲＥは、２つ以上の重複するＵＵＡＵＵＵＡ（Ｕ／Ａ）（Ｕ／Ａ）ノナマーを有する。このタイプのＡＲＥを含有する分子としては、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦ－ａが挙げられる。クラスＩＩＩ　ＡＲＥＳは、あまり明確に定義されていない。これらのＵリッチ領域は、ＡＵＵＵＡモチーフを含有しない。ｃ－Ｊｕｎ及びＭｙｏｇｅｎｉｎは、このクラスの２つのよく研究された例である。ＡＲＥに結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られているが、ＥＬＡＶファミリーのメンバー、特にＨｕＲは、ｍＲＮＡの安定性を増加させることが報告されている。ＨｕＲは、３つすべてのクラスのＡＲＥに結合する。ＨｕＲ特異的結合部位を核酸分子の３’ＵＴＲに操作すると、ＨｕＲ結合、したがってインビボでのメッセージの安定化につながる。

【１７０４】

３’ＵＴＲ　ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）の導入、除去、または修飾を使用して、本明細書に記載の核酸の安定性を調節することができる。特定の核酸を操作する場合、ＡＲＥの１つ以上のコピーを導入して、本発明のポリヌクレオチドを不安定にし、それによって翻訳を抑制し、得られるタンパク質の産生を減少させることができる。同様に、ＡＲＥを同定し、除去または変異させて、細胞内安定性を増加させ、したがって、結果として生じるタンパク質の翻訳及び産生を増加させることができる。トランスフェクション実験は、関連する細胞株において、核酸を使用して実施することができ、タンパク質産生は、トランスフェクション後の様々な時点でアッセイすることができる。例えば、細胞は、異なるＡＲＥ操作分子で、かつＥＬＩＳＡキットを使用することによって関連するタンパク質にトランスフェクトすることができ、トランスフェクションの６時間、１２時間、２４時間、４８時間、及び７日後に産生されるタンパク質をアッセイする。

【１７０５】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、活性化Ｔ細胞（ＮＦＡＴ）プロモーターの核因子、またはその機能的部分もしくは機能的バ

リアントに作動可能に連結される。本明細書で使用される「ＮＦＡＴプロモーター」とは、Ｔ細胞によって発現される任意の遺伝子の最小プロモーターに連結された１つ以上のＮＦＡＴ応答性エレメントを意味する。好ましくは、Ｔ細胞によって発現される遺伝子の最小プロモーターは、最小ヒトＩＬ－２プロモーターである。ＮＦＡＴ応答性エレメントは、例えば、ＮＦＡＴ１、ＮＦＡＴ２、ＮＦＡＴ３、及び／またはＮＦＡＴ４応答性エレメントを含み得る。ＮＦＡＴプロモーター（またはその機能的部分もしくは機能的バリアント）は、任意の数の結合モチーフ、例えば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、または少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、または最大１２個の結合モチーフを含み得る。

【１７０６】

【表１９】

表 18-NFAT プロモーター関連配列。

説明	アミノ酸配列
6×NFAT　IL-2 最小プロモーター	TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGAT ATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATA CAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACT GTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGG AAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAAT TGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTG TTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGA AAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATT AGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGG CGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACAC CCCCATAATATTTTTCCAGAATTAACAGT ATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCC CTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGT AACCTCAACTCCTGGCCACC(配列番号 255)
NFAT 応答性エレメント	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGC GT(配列番号 256)
ヒト IL-2 プロモーター	CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAG AATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTT CAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCAC TACTCACAGTAACCTCAACTCCTG(配列番号 257)

【１７０７】

好ましい実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、６つのＮＦＡＴ結合モチーフを含む。例えば、米国特許第８，５５６，８８２号（参照によりその全体が、特にＮＦＡＴプロモーターに関連する関連部分について組み込まれる）を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、本明細書に記載の免疫調節剤のうちのいずれかを含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントから選択される。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する

。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。

【１７０８】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡを含むように遺伝子修飾されたＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、本明細書に記載の免疫調節剤のうちのいずれかを含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントから選択される。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。

【１７０９】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡを含むように遺伝子修飾されたＴＩＬを提供し、免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：

Ｓ１－ＩＡ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｌ２－Ｓ２－ＩＡ２－Ｌ３－Ｃ２に従って配置され、

式中、Ｓ１及びＳ２は、各々シグナルペプチドであり、ＩＡ１及びＩＡ２は、各々免疫調節剤であり、Ｌ１－Ｌ３は、各々リンカーであり、Ｃ１及びＣ２は、各々細胞膜アンカー部分である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、同じ免疫調節剤である。ある特定の実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、異なる免疫調節剤である。本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含む、好適な免疫調節剤。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））、またはそれらの生体活性バリアントから選択される。いくつかのさらなる実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１は、ＩＬ－１５であり、ＩＡ２は、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１は、ＩＬ－２１であり、ＩＡ２は、ＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの１つ以上は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの２つ以上は、異なるリンカーである。例示的な実施形態では、Ｌ２は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ２は、フリン切断可能なＰ２Ａリンカーである（例えば、配列番号２５１）。いくつかの実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、独立して、膜貫通ドメイン及び／または膜貫通－細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、同じである。例示的な実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、各々Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。例示的な実施形態では、Ｃ１とＣ２は異なる。上記式による２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む例示的な構築物を図３６に示す。

【１７１０】

対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に導入して、任意の好適な方法を使用して、膜アンカー免疫調節融合タンパク質を発現する一過的に修飾されたまたは遺伝子修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬ集団に導入される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォ

ームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１号、もしくは同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を細胞内に送達することを可能にする。

【１７１１】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用してｍＲＮＡをＴＩＬに送達し、一過的に修飾されたＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ＤＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用してＤＮＡをＴＩＬに送達し、安定した遺伝子修飾されたＴＩＬを産生する。マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、本明細書のプロセス２Ａ方法開示（例えば、図２～６を参照）または本明細書のＧＥＮ３方法開示（例えば、図７を参照）の任意のステップ中に産生される任意のＴＩＬ集団に核酸を送達して、修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【１７１２】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【１７１３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌである。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。

【１７１４】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【１７１５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【１７１６】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【１７１７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【１７１８】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１２である。

【１７１９】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。

【１７２０】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。

【１７２１】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。

【１７２２】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【１７２３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。

【１７２４】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。

【１７２５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－

２１である。
【１７２６】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【１７２７】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。
【１７２８】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。
【１７２９】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【１７３０】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。
【１７３１】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【１７３２】
例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２１であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。
【１７３３】
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬに含まれ得る追加の膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＷＯ２０１９／１５７１３０Ａ１（これは参照によりその全体が、特に膜アンカー免疫調節融合タンパク質に関連する関連部分に組み込まれる）に記載されている。
【１７３４】
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬに含まれる例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質を図３６及び３７、ならびに表５８及び５９に示す。
【１７３５】
いくつかの実施形態では、上記の膜アンカー免疫調節融合タンパク質のうちのいずれかをコードする核酸は、ＮＦＡＴプロモーターまたはその機能的部分もしくは機能的バリアントに作動可能に連結される。
【１７３６】
免疫調節剤
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬには、その表面に付着された１つ以上の免疫調

節剤が含まれる。免疫調節剤は、例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質のうちのいずれかに組み込むことができる。任意の好適な免疫調節剤を、対象の修飾されたＴＩＬに含めることができる。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、一度患者に移されると、ＴＩＬ生存及び／または抗腫瘍活性を増強する。例示的な免疫調節剤としては、例えば、サイトカインが挙げられる。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、以下のサイトカイン：ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＬ－４、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－５、ＩＦＮγ、ＴＮＦα（ＴＮＦａ）、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらの生物学的に活性なバリアントのうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、共刺激分子である。特定の実施形態では、共刺激分子は、以下：ＯＸ４０、ＣＤ２８、ＧＩＴＲ、ＶＩＳＴＡ、ＣＤ４０、ＣＤ３、またはＣＤ１３７のアゴニストのうちの１つである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）である。例示的な免疫調節剤は、以下でさらに詳細に論じられる。

【１７３７】

１．ＩＬ－１５

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１５を含む。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【１７３８】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１５」、「ＩＬ－１５」及び「ＩＬ１５」はすべて、ＩＬ－１５特異的受容体アルファ鎖（ＩＬ－１５Ｒα）、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体ベータ鎖（ＣＤ１２２）及び共通のガンマ鎖（ガンマ－Ｃ、ＣＤ１３２）（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００００５８５、ＮＰ＿０００５７６及びＮＰ＿７５１９１５（ヒト）；ならびにＮＭ＿００１２５４７４７及びＮＰ＿００１２４１６７６（マウス））で構成された複合体に結合し、それを通じてシグナル伝達するインターロイキンを指す。ＩＬ－１５は、腫瘍内のＴ細胞増殖を刺激することが示されている。ＩＬ－１５はまた、エフェクターメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞の生存可能性を拡張することができ、ＮＫ細胞の発達にとって重要である。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、本明細書に記載のＩＬ－１５と会合する修飾されたＴＩＬは、向上した生存及び／または抗腫瘍効果を示すと考えられる。

【１７３９】

ＩＬ－１５は、インビボで４０分未満の短い半減期を有する。ＩＬ－１５モノマーへの修飾は、がんの治療におけるそのインビボ薬物動態を改善することができる。これらの修飾は、概して、ＩＬ－１５受容体のアルファサブユニット、ＩＬ－１５ＲαによるＩＬ－１５のトランスプレゼンテーションの改善に焦点を当てている。そのような修正には、以下が含まれる：１）ＩＬ－１５とその可溶性受容体ａ－サブユニット－Ｆｃ融合体との事前会合により、ＩＬ－１５：ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ複合体（例えば、Ｒｕｂｉｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．１０３：９１６６－７１（２００６）を参照）を形成すること、２）スーパーアゴニストＩＬ－１５－ｓＩＬ－１５Ｒα－ｓｕｓｈｉタンパク質の発現（例えば、Ｂｅｓｓａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃａｎｃｅｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ８：２７３６－４５（２００９）を参照）、及び３）ヒトＩＬ－１５変異体ＩＬ－１５Ｎ７２ＤとＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ ｓｕｓｈｉ－Ｆｃ融合複合体との事前会合（例えば、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １８３：３５９８－６００７（２００９）を参照）。

【１７４０】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１５は、全長ＩＬ－１５、ＩＬ－１５の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、

ヒトＩＬ－１５またはバリアントヒトＩＬ－１５である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１５バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、野生型ＩＬ－１５と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。ある特定の実施形態では、ＩＬ－１５は、野生型ヒトＩＬ－１５に対してＮ７２Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１５は、ＩＬ－１５Ｒα結合活性を示す。

【１７４１】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１５及びＩＬ－１５Ｒαの細胞外ドメインを含む。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、Ｆｃドメインに融合したＩＬ－１５及びＩＬ－１５Ｒα（ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ）を含む。

【１７４２】

【表２０－１】

表 19-IL-15 関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト IL-15(N72D 変異体)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT VENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(配列番号 258)
ヒト IL-15R-アルファ-Su/Fc ドメイン	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS GFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSL KCIREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号 259)
ヒト IL-15R-アルファ-Su(65aa 切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNS GFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSL KCIR(配列番号 260)
ヒト IL-15 アイソフォーム 2	MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDL KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA MKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILAN NSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS(配列番号 261)
ヒト IL-15 アイソフォーム 1	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIH VFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDL IQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSN GNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ MFINTS(配列番号 262)
ヒト IL-15(シグナルペプチドなし)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEE KNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(配列番号 263)

【表２０－２】

ヒトIL-15R-アルファ(85aa 切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGV(配列番号264)
ヒトIL-15R-アルファ(182aa 切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTST(配列番号265)
ヒトIL-15R-アルファ	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL(配列番号266)

【１７４３】

いくつかの実施形態では、免疫刺激タンパク質は、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含むスーパーアゴニストＩＬ－１５（ＩＬ－１５ＳＡ）である。ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの組み合わせは、ヒトＩＬ－１５単独よりも高い生物活性を有するＩＬ－１５ＳＡ複合体を形成する。可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒα、ならびに細胞外ドメインの切断型は、当該技術分野において記載されている（Ｗｅｉ ｅｔａｌ．，２００１ Ｊ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７：２７７－２８２）。ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸配列は、配列番号２６６に示されている。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトとの複合体を含む。膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインなしで、細胞外ドメインの全部または一部を含むＩＬ－１５Ｒα。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、完全な細胞外ドメインまたはＩＬ－１５結合活性を保持する細胞外ドメインの切断形態を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む。

【１７４４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、ＩＬ－１５結合活性を保持する細胞外ドメインの切断形態を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－６０、１－６１、１－６２、１－６３、１－６４または１－６５を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－８０、１－８１、１－８２、１－８３、１－８４または１－８５を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－１８０、１－１８１、または１－１８２を含む。

【１７４５】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１５結合活性を保持し、Ｓｕｓｈｉドメインを含む細胞外ドメインの切断型を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含むＩＬ－１５ＳＡである。ＩＬ－１５ＲαのＳｕｓｈｉドメインは、当該技術分野では、およそ６０アミノ酸長であり、４つのシステインを含むと説明されている。（Ｗｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＩＬ－１５活性を保持し、Ｓｕｓｈｉドメインを含む可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαの切断形態は、本開示のＩＬ－１５ＳＡにおいて有用である。

【１７４６】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、本明細書に記載のＦｃ融合体（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ）などの融合タンパク質として発現される可溶性ヒトＩＬ－１５ＲαとＩＬ－１５とを含む複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、２つのヒトＩＬ－１５分子と複合体化された二量体ヒトＩＬ－１５ＲαＦｃ融合タンパク質（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ）を含む。

【１７４７】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、配列番号２５８、配列番号２６１、配列番号２６２、または配列番号２６３に示されるアミノ酸配列を含むＩＬ－１５分子を含む、ＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体は、配列番号２６０、配列番号２６４または配列番号２６５の配列を含む、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子を含む。

【１７４８】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、２つのＩＬ－１５分子と複合体化された二量体ＩＬ－１５ＲαＦｃ融合タンパク質を含むＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５－ＳＡは、ＵＳ２０１４／０１３４１２８（参照により本明細書に組み込まれる）に記載の二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ（Ｓｕｓｈｉドメイン）／Ｆｃ（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５Ｎ７２Ｄ（配列番号２５８）分子（ＡＬＴ－８０３としても知られる）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【１７４９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）、及び配列番号２５８、２５８、２６２、及び２６３から選択されるアミノ酸配列を有する２つのＩＬ－１５分子を含む。

【１７５０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【１７５１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号

２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。
【１７５２】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。
【１７５３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ（配列番号２６９）分子及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ（配列番号２５９）分子及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。
【１７５４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２５９及び配列番号２６０を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１または配列番号２６２を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６２及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６３及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１及び配列番号２６０を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６２及び配列番号２６０を含む。
【１７５５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１５またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。
【１７５６】
例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーター、ＥＦ－１ａプロモーター、ＭＮＤプロモーター、またはＳＳＦＶプロモーターに作動可能に連結される。
【１７５７】
２．ＩＬ－１２
いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１２またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－１２は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。
【１７５８】
本明細書で使用される場合、「インターロイキン１２」、「ＩＬ－１２」及び「ＩＬ１２」はすべて、ＩＬ－１２Ａ及びＩＬ－１２Ｂ遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００８８２（ＩＬ－１２Ａ）及びＮＭ＿００２１８７（ＩＬ－１２Ｂ））によってコードされるヘテロ二量体サイトカインであるインターロイキンを指す。ＩＬ－１２は、４つのアルファヘリックスのバンドルで構成され、天然Ｔ細胞のＴＨ１細胞への分化に関与する。それは２つの別々の遺伝子、ＩＬ－１２Ａ（ｐ３５）及びＩＬ－１２Ｂ（ｐ４０）によってコードされる。活性ヘテロ二量体（「ｐ７０」と称される）、及びｐ４０のホモ二量体は、タンパク質合成の後に形成される。ＩＬ－１２は、ＩＬ－１２Ｒ－β１及びＩＬ－１２Ｒ－β２によって形成されるヘテロ二量体受容体である、ＩＬ－１２受容体に結合する。ＩＬ－１２は、Ｔ細胞の成長及び機能を刺激することができるＴ細胞刺激因子として知られている。特に、ＩＬ－１２は、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞からのインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）及び腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）の産生を刺激し、ＩＦＮ－γのＩＬ－４媒介抑制を低減することができる。ＩＬ－１２は、Ｎ

Ｋ細胞及びＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球の細胞傷害活性の増強をさらに媒介することができる。さらに、ＩＬ－１２はまた、インターフェロンガンマの産生を増加させることによって抗血管新生活性を有し得、これは順に、ケモカイン誘導性タンパク質－１０（ＩＰ－１０またはＣＸＣＬ１０）の産生を増加させる。次いで、ＩＰ－１０が、この抗血管新生効果を媒介する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－１２は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【１７５９】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１２は、全長ＩＬ－１２、ＩＬ－１２の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２は、ヒトＩＬ－１２またはバリアントヒトＩＬ－１２である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１２は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１２バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２は、野生型ＩＬ－１２と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。

【１７６０】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬ組成物に含まれるＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットまたはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットは、ヒトＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットは、アミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、修飾されたＴＩＬ組成物に含まれるＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットまたはそのバリアントを含む。ある特定の実施形態では、ＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットに付着したＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットを含む一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドである。そのようなＩＬ－１２一本鎖ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１２の生物学的活性のうちの１つ以上を有利に保持する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端へ、式（ｐ４０）－（Ｌ）－（ｐ３５）に従うものであり、式中、「ｐ４０」は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットであり、「ｐ３５」は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットであり、Ｌは、リンカーである。他の実施形態では、一本鎖ＩＬ－１２は、Ｎ末端からＣ末端へ、式（ｐ３５）－（Ｌ）－（ｐ４０）によるものである。任意の好適なリンカーは、本明細書に記載のものを含む、一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドで使用され得る。好適なリンカーには、例えば、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）$_x$を有するリンカーが含まれ得、ｘは、１～１０の整数である。他の好適なリンカーとしては、例えば、アミノ酸配列ＧＧＧＧＧＧＳが挙げられる。対象の一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドとともに使用することができる例示的な一本鎖ＩＬ－１２リンカーもまた、Ｌｉｅｓｃｈｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１５：３５～４０（１９９７）（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において、特にＩＬ－１２ポリペプチドリンカーの教示のために記載されている。例示的な実施形態では、一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドは、一本鎖ヒトＩＬ－１２ポリペプチドである（すなわち、それは、ヒトｐ３５及びｐ４０　ＩＬ－１２サブユニットを含む）。

【１７６１】

【表２１】

表 20-IL-12 関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト IL-12　p35 サブユニット	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVE ACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASR KTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNA KLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNF NSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS(配列番号 267)
ヒト IL-12　p40 サブユニット	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCD TPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGI WSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCG AATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPA AEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDII KPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTW STPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTD KTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW ASVPCS(配列番号 268)

【１７６２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１２またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。

【１７６３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１２を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーター、ＥＦ－１ａプロモーター、ＭＮＤプロモーター、またはＳＳＦＶプロモーターに作動可能に連結される。例えば、米国特許第８，５５６，８８２号（これは参照によりその全体が、特にＩＬ－１２発現のためのＮＦＡＴプロモーターに関連する関連部分について組み込まれる）を参照されたい。ＩＬ－１２を含む例示的な融合タンパク質を、図３６及び３７、ならびに表５８に示す。

【１７６４】

３．ＩＬ－１８

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１８またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－１８は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【１７６５】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１８」、「ＩＬ－１８」、「ＩＬ１８」、「ＩＧＩＦ」、「ＩＬ－１ｇ」、「インターフェロン－ガンマ誘導因子」、及び「ＩＬ１Ｆ４」はすべて、ＩＬ－１８遺伝子（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２４３２１１、ＮＭ＿００１５６２及びＮＭ＿００１３８６４２０）によってコードされるヘテロ二量体サイトカインである、インターロイキンを指す。ＩＬ－１βと構造的に類似するＩＬ－１８は、サイトカインのＩＬ－１スーパーファミリーのメンバーである。多くのヒトリンパ球及び非リンパ球細胞によって発現されるこのサイトカインは、炎症プ

ロセスにおいて重要な役割を果たす。ＩＬ－１２と組み合わせたＩＬ－１８は、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）、ならびにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を活性化して、ＩＦＮ－γを産生することができ、したがって、腫瘍免疫に寄与する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－１８は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。

【１７６６】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１８は、全長ＩＬ－１８、ＩＬ－１８の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１８は、ヒトＩＬ－１８またはバリアントヒトＩＬ－１８である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１８は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１８バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１８は、野生型ＩＬ－１８（配列番号２６９）と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０の変異を含む。いくつかの実施形態では、生体活性バリアントは、ＩＬ－１８結合タンパク質（ＩＬ－１８ＢＰ）などの阻害分子の存在下でも、ＩＬ－１８シグナル伝達活性を提供するデコイ耐性ＩＬ－１８バリアント（「ＤＲ－ＩＬ１８」または「ＤＲ－ＩＬ－１８」）である。本明細書に記載の対象の修飾されたＴＩＬに含まれ得る例示的なＩＬ－１８バリアントを、以下の表２１に示す。対象の修飾されたＴＩＬに含まれ得る追加のＩＬ－１８バリアントは、ＷＯ２０２２／０９４４７３（これは参照によりその全体が、特にバリアントＤＲ－ＩＬ－１８に関連する開示に関して組み込まれる）に記載されている。

【１７６７】

いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１８は、［ヒト野生型ＩＬ－１８－配列番号２６９に対する］Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ｓ、Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ｇ、Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ａ、Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ｄ、及びＣ３８Ｓ／Ｃ６８Ｎからの安定性変異対選択を含む。いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１８は、アミノ酸位置Ｍ５１（例えば、Ｍ５１Ｅ、Ｍ５１Ｒ、Ｍ５１Ｋ、Ｍ５１Ｔ、Ｍ５１Ｄ、またはＭ５１Ｎ）、Ｋ５３（例えば、Ｋ５３Ｇ、Ｋ５３Ｓ、Ｋ５３Ｔ、またはＫ５３Ｒ）、Ｑ５６（例えば、Ｑ５６Ｇ、Ｑ５６Ｒ、Ｑ５６Ｌ、Ｑ５６Ｅ、Ｑ５６Ａ、Ｑ５６Ｖ、またはＱ５６Ｋ）、Ｄ１１０（例えば、Ｄ１１０Ｓ、ＤＩ１０Ｎ、Ｄ１１０Ｇ、Ｄ１１０Ｋ、Ｄ１１０Ｈ、Ｄ１１０Ｑ、またはＤ１１０Ｅ）、ならびにＮ１１１（例えば、Ｎ１１１Ｇ、Ｎ１１１Ｒ、Ｎｉ１ＩＳ、Ｎｉ１ＩＤ、Ｎ１１１Ｈ、またはＮ１１１Ｙ）に加えて、以下から選択される安定化変異ペア：Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ｓ、Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ｇ、Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ａ、Ｃ３８Ｓ／Ｃ６８Ｄ、及びＣ３８Ｓ／Ｃ６８Ｎ［ヒト野生型ＩＬ－１８－配列番号２６９と比較して］を含む。いくつかのかかる場合では、安定化ＩＬ－１８バリアントポリペプチドは、アミノ酸Ｓ１０５位における変異（例えば、Ｓ１０５Ｄ、Ｓ１０５Ａ、Ｓ１０５Ｎ、Ｓ１０５Ｒ、Ｓ１０５Ｄ、またはＳ１０５Ｋ）をさらに含み、場合によっては、アミノ酸Ｐ５７位における変異（例えば、Ｐ５７Ａ、Ｐ５７Ｌ、Ｐ５７Ｇ、またはＰ５７Ｋ）及びＭ６０（例えば、Ｍ６０Ｌ、Ｍ６０Ｒ、Ｍ６０Ｋ、またはＭ６０Ｑ）を追加として含む。

【１７６８】

【表２２－１】

表 21-IL-18 関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCE KISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSV PGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKK EDELGDRSIMFTVQNED (配列番号 269)
ヒト IL-18 バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAVTISVKCE KISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARVP GHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKE DELGDRSIMFTVQNED(配列番号 270)
ヒト IL-18 バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAVTISVKSEK ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVP GHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKE DELGDRSIMFTVQNED(配列番号 331)
ヒト IL-18 バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAVTISVKGEK ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVP GHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKE DELGDRSIMFTVQNED(配列番号 332)
ヒト IL-18 バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAVTISVKAEK ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVP GHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKE DELGDRSIMFTVQNED(配列番号 333)
ヒト IL-18 バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMT DSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAVTISVKVEK ISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVP GHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKE DELGDRSIMFTVQNED(配列番号 334)

【表２２－２】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV TISVKDEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKD TKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFL ACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D(配列番号335)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV TISVKEEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号336)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV TISVKNEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKD TKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFL ACEKERDLFKLILKKEDEL(配列番号337)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号338)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRAKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQNED(配列番号339)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号340)

【表２２－３】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号341)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESQLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRTKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRRVPGHHNKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQKED (配列番号342)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYKDKQPRAQA VTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQN ED(配列番号343)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISDYKDKQPRAXA AVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNI KDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEG YFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTI QNED(配列番号344) X=任意の天然に存在するアミノ酸
ヒトIL-18バリアント	YFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHNNKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTTQNED (配列番号345)
ヒトIL-18バリアント	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYKDKQPRAQA VTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRKVPGHQHKMQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQK ED(配列番号346)

【表２２－４】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDRQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHHHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQNED(配列番号347)
ヒトIL-18バリアント	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTTQHED (配列番号348)
ヒトIL-18バリアント	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRAKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRRVPGHHHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQKED(配列番号349)
ヒトIL-18バリアント	YFGKIESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHDYKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQKED(配列番号350)
ヒトIL-18バリアント	YFGKYESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHEHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQKED (配列番号351)
ヒトIL-18バリアント	HFGKYESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHHNKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQKED (配列番号352)

【表２２－５】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRAKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTAQKED (配列番号353)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISDYRDSQPRGRAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFKRNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQHED (配列番号354)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISNYRDSQPRGQAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFKRRVPGHNHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQKED (配列番号355)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号356)
ヒトIL-18バリアント	RFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号357)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRAKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQXED(配列番号358) X=任意の天然に存在するｱﾐﾉ酸

【表２２－６】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRTKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRNVPGHHDKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQHED (配列番号359)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRAKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTIQKED(配列番号360)
ヒトIL-18バリアント	RFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号361)
ヒトIL-18バリアント	RFGKYESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRTKAV TISVKCEKISTLSCDNKIISFKEMNPPDNIKD TKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFL ACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D(配列番号362)
ヒトIL-18バリアント	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRTKAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRKVPGHNHKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQKED (配列番号363)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISEYKDSELRGRAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFPRAVPGHNRKVQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号364)

【表２２－７】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYKDSAGRGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHSNKVQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号365)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSAARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRSVPGHKRKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号366)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSRGRGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHNSKRQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号367)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSVPRGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARAVPGHSRKTQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号368)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSGARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARAVPGHGRKTQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号369)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSKARGMA VTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARDVPGHSSKRQFESSSYEGYFL ACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE D(配列番号370)

【表２２－８】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号371)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRNVPGHGRKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号372)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号373)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARDVPGHSGKRQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号374)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYTDSRPRGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHSSKKQFESSSYEGYFLAC EKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED(配列番号375)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYTDSRARGMA VTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHNDKRQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQN ED(配列番号376)

【表２２－９】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISRYKDSGKRGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFRRSVPGHSRKVQFESSSYEGYFLAC EKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED(配列番号377)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSGARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFERDVPGHSGKVQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号378)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSRPRGMA VTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRAVPGHNRKMQFESSSYEGYF LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQN ED(配列番号379)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号380)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNE(配列番号381)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFQRNVPGHGRKMQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号382)

【表２２－１０】

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSVPRGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARAVPGHSRKTQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号383)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号384)
ヒトIL-18バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFE DMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDT KSDIIFFARDVPGHSGKRQFESSSYEGYFLA CEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号385)

【１７６９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８またはその生体活性バリアント（例えば、表２１に含まれるＩＬ－１８バリアントのうちのいずれか１つ）を含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－１８を含む例示的な融合タンパク質を図３６に示す。

【１７７０】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーター、ＥＦ－１ａプロモーター、ＭＮＤプロモーター、またはＳＳＦＶプロモーターに作動可能に連結される。

【１７７１】

４．ＩＬ－２１

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－２１またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－２１は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【１７７２】

ある特定の実施形態では、サイトカイン－ＡＢＤは、ＩＬ－２１分子またはその断片を含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン２１」、「ＩＬ－２１」、及び「ＩＬ２１」（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２０７００６及びＮＰ＿００１１９３９３５（ヒト）、ならびにＮＭ＿０００１２９１０４１及びＮＰ＿００１２７７９７０（マウス））はすべて、ＩＬ－２１受容体に結合し、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及び細胞傷害性細胞を含む免疫系の細胞に対して強力な調節効果を有し、ウイルス感染またはがん細胞を破壊することができるＩＬ－２１受容体に結合するサイトカインのメンバーを指す。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－２１は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させ

ることができると考えられる。
【１７７３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、ヒトＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－２１は、全長ＩＬ－２１、ＩＬ－２１の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、ヒトＩＬ－２１またはバリアントヒトＩＬ－２１である。例示的な実施形態では、ＩＬ－２１は、生物学的に活性なヒトＩＬ－２１バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、野生型ＩＬ－２１と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。
【１７７４】
【表２３】

表 22-IL-21 関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト IL-21	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVP EFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSAN TGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHR LTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQ HLSSRTHGSEDS(配列番号 271)

【１７７５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２１またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。
【１７７６】
例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーター、ＥＦ－１ａプロモーター、ＭＮＤプロモーター、またはＳＳＦＶプロモーターに作動可能に連結される。
【１７７７】
５．ＩＬ－２
いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－２またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－２は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。
【１７７８】
ある特定の実施形態では、サイトカイン－ＡＢＤは、ＩＬ－２分子またはその断片を含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン２」、「ＩＬ－２」、「ＩＬ２」、及び「ＴＣＧＦ」（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００５８６及びＮＰ＿０００５７７（ヒト）はすべて、ＩＬ－２受容体に結合するサイトカインのメンバーを指す。ＩＬ－２は、活性化誘発性細胞死（ＡＩＣＤ）を増強する。ＩＬ－２はまた、初期Ｔ細胞が抗原によっても刺激されるときに、Ｔ細胞の、エフェクターＴ細胞への分化及びメモリーＴ細胞への分化を促進し、したがって、身体が感染症を撃退するのを助ける。他の分極サイトカインとともに、ＩＬ－２は、Ｔｈ１及びＴｈ２リンパ球へのナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞分化を刺激し、Ｔｈ１７及び濾胞性Ｔｈリンパ球への分化を阻害する。ＩＬ－２はまた、ナチュラルキラー細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞の両方の細胞殺傷活性を増加させる。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－２は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。
【１７７９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ヒトＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－２は、全長ＩＬ－２、ＩＬ－２の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ヒトＩＬ－２またはバリアントヒトＩＬ－２である。例示的な実施形態では、ＩＬ－２は、生物学的に活性なヒトＩＬ－２バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、野生型ＩＬ－２と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。

【１７８０】

【表２４】

表 23-IL-2 関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト IL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKT QLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETT FMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT(配列番号 272)

【１７８１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－２を含む例示的な融合タンパク質を図３６及び３７に示す。

【１７８２】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーター、ＥＦ－１ａプロモーター、ＭＮＤプロモーター、またはＳＳＦＶプロモーターに作動可能に連結される。

【１７８３】

６．ＣＤ４０アゴニスト

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＣＤ４０アゴニストと会合する。例示的な実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【１７８４】

分化クラスター４０、ＣＤ４０は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に見出される共刺激タンパク質であり、ＡＰＣ活性化に必要である。Ｔヘルパー細胞上のＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）のＣＤ４０への結合は、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を活性化し、様々な下流効果を誘導する。いかなる特定の操作理論によるものではないが、抗原提示細胞（すなわち、ＣＤ４０アゴニスト）上でＣＤ４０を活性化する１つ以上の免疫調節剤の添加は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。ＣＤ４０アゴニストとしては、例えば、ＣＤ４０Ｌ及びＣＤ４０にアゴニスト的に結合する抗体またはその抗体断片（例えば、ｓｃＦｖ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＣＤ４０Ｌまたはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、アゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）を含む免疫調節融合タンパク質を含む。例示的なＣＤ４０アゴニスト配列を以下の表に示す。

【１７８５】

ＣＤ４０アゴニスト活性は、当該技術分野で知られている任意の好適な方法を使用して測定することができる。例えば、ＤＣ上のＣＤ４０のライゲーションは、共刺激及びＭＨ

Ｃ分子の表面発現の増加、炎症誘発性サイトカインの産生、ならびにＴ細胞トリガーの増強を誘導する。安静Ｂ細胞上のＣＤ４０ライゲーションは、抗原提示機能及び増殖を増加させる。例示的な実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、ヒト樹状細胞を活性化することができる。

【１７８６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、表２４に示される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖのＶＨ及びＶＬ配列を有するアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン、またはその生体活性バリアントを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表２４に示されるＶＨ配列と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、アゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメインは、表２４に示されるＶＨ配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含むＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＬ配列と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表２４に示されるＶＬ配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含むＶＬ配列を含む。例示的な実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表２４の配列番号２７６、２７９、２８２、及び２８５から選択される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖである。

【１７８７】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、ヒトＣＤ４０に結合することができる、表２４の抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖのバリアントである。例示的な実施形態では、バリアント抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖは、表２４の配列番号２７６、２７９、２８２、及び２８５から選択される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖと少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一である。

【１７８８】

ＣＤ４０結合ドメイン結合の評価は、Ｂｉａｃｏｒｅ、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）及び／またはＢＬＩ（バイオレイヤー干渉法、例えば、Ｏｃｔｅｔアッセイ）アッセイを含むがこれらに限定されない、当該技術分野で知られている任意の好適なアッセイを使用して測定することができる。

【１７８９】

免疫調節剤として有用な追加のＣＤ４０結合ドメイン（ＶＨ及びＶＬ）としては、米国特許第６，８３８，２６１号、同第６，８４３，９８９号、同第７，３３８，６６０号、同第８，７７７８，３４５号に記載されるものが挙げられ、これらは特に抗ＣＤ４０抗体ならびにＶＨ、ＶＬ及びＣＤＲ配列の教示に関して参照により本明細書に組み込まれる。

【１７９０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）である。例示的な実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、ヒトＣＤ４０Ｌ（配列番号２７０）である。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、配列番号２５３と少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるヒトＣＤ４０Ｌのバリアントである。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、配列番号２７３と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含む、ヒトＣＤ４０Ｌのバリアントである。

【１７９１】

ＣＤ４０アゴニストを含む例示的な融合タンパク質を図３６及び３７に示す。

【１７９２】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＣＤ４０アゴニストを含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。

【１７９３】
【表２５－１】

表 24-CD40 アゴニスト関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト CD40L	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLIT QMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMK TIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLN KEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKT TSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKR QGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPG RFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP GASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号 273)
抗ヒト CD40　VH(ソチガリマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTY VCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTNYSASWA KGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCA RPDITYGFAINFWGPGTLVTVSS(配列番号 274)
抗ヒト CD40　VL(ソチガリマブ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLA WYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIGG GTKVEIK(配列番号 275)
抗ヒト CD40　scFv(ソチガリマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTY VCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTNYSASWA KGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCA RPDITYGFAINFWGPGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKC QASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQC TGYGISWPIGGGTKVEIK(配列番号 276)
抗ヒト CD40　VH(ダセツズマブ)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIH WVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKG RFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EGIYWWGQGTLVTVSS(配列番号 277)
抗ヒト CD40　VL(ダセツズマブ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNG NTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPW TFGQGTKVEIK(配列番号 278)

【表２５－２】

抗ヒトCD40　scFv(ダセツズマブ)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGY YIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYN QKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKP GKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGT KVEIK(配列番号279)
抗CD40　VH(ルカツツズマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRY HADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTED TAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVS S(配列番号280)
抗CD40　VL(ルカツツズマブ)	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYS NGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQARQTPFTFGPGTKVDIR(配列番号281)
抗CD40　scFv(ルカツツズマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRY HADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTED TAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSP LSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLD WYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQT PFTFGPGTKVDIR(配列番号282)
抗CD40　VH(セリクレルマブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGG TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW GQGTLVTVSS(配列番号283)
抗CD40　VL(セリクレルマブ)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYS WLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANI FPLTFGGGTKVEIK(配列番号284)

【表２５－３】

抗 CD40　scFv(セリクレルマブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGG TNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLR SDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIY SWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQA NIFPLTFGGGTKVEIK(配列番号 285)

【１７９４】

Ｋ．Ｍｙｃ融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、Ｍｙｃ融合タンパク質を含む。Ｍｙｃ融合タンパク質は、米国特許第１１，３６９，６７８号に記載されており、その内容は参照によりその全体が組み込まれる。

【１７９５】

任意の好適な遺伝子修飾方法を使用して、例えば、本明細書に記載の遺伝子編集方法のうちのいずれかを含む、そのようなＭｙｃ融合タンパク質を含むように、対象のＴＩＬを遺伝子修飾することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子修飾方法は、本明細書に記載されるＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、ジンクフィンガー、またはＣａｓ－ＣＬＯＶＥＲ法である。いくつかの実施形態では、そのような修飾されたＴＩＬは、本明細書で提供されるレトロウイルス法（例えば、レンチウイルス法）のうちのいずれか１つを使用して産生される。いくつかの実施形態では、かかる修飾されたＴＩＬは、本明細書に記載のトランスポゾン／トランスポザーゼ系、例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃ法（例えば、ｐｉｇｇｙＢａｃトランスポゾン及びトランスポザーゼまたはｐｉｇｇｙＢａｃ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ法（例えば、Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙまたは Ｓｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ法（例えば、Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ　ａｈｄ　Ｈｅｌｒａｉｓｅｒ様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）、ならびにＴｏｌ２法（例えば、Ｔｏｌ２及びＴｏｌ２様トランスポゾン及びトランスポザーゼ）のうちのいずれかを使用して産生される。

【１７９６】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示するのは、（ａ）トランスポーターペプチド配列、及び（ｂ）ＭＹＣ配列を含むＭＹＣ融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、式（Ｉ）のペプチドである：

トランスポーターペプチド配列－ＭＹＣ配列。

【１７９７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）トランスポーターペプチド配列、（ｂ）ＭＹＣ配列、及び（ｃ）トランスポーターペプチド配列とＭＹＣ配列とを連結する１つ以上の分子を含む。いくつかの実施形態では、ｆｕｓｉＭＹＣ融合タンパク質は、式（ＩＩ）のペプチドであり、

トランスポーターペプチド配列－Ｘ－ＭＹＣ配列

式中、－Ｘ－は、トランスポーターペプチド配列とＭＹＣ配列とを連結する分子である。いくつかの実施形態では、－Ｘ－は、アミノ酸である。いくつかの実施形態では、－Ｘ－は、少なくとも１つのアミノ酸である。

【１７９８】

本明細書で使用される場合、「トランスポーターペプチド」は、ペプチドが細胞及び組織に浸透することを促進するペプチド配列を意味する。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＨＩＶ－１のＴＡＴタンパク質導入ドメイン（ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ）（配列番号３０６）のＮ末端９アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＴＡＴ[４８－５７]である。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＴＡＴ[５７－４８]である。

【１７９９】

本明細書で使用される場合、「ＭＹＣ配列」は、ＭＹＣアミノ酸ペプチド配列である。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチドは、完全なＭｙｃポリペプチド配列である。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチドは、部分Ｍｙｃポリペプチド配列である。いくつかの実施形態では、ＭＹＣは、ｃ－ＭＹＣである。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチド配列は、配列番号３１２を含む：

【１８００】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[４８－５７]及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[５７－４８]及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。

【１８０１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[４８－５７]、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[５７－４８]、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。

【１８０２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、融合タンパク質の精製を容易にする少なくとも１つのアミノ酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、タンパク質タグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、ポリヒスチジンタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、エピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、ポリヒスチジンタグ及びエピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、６－ヒスチジンタグ及びＶ５エピトープタグを含む。

【１８０３】

いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、６－ヒスチジンタグである。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、配列ＨＨＨＨＨＨ（配列番号３０３）を含む。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、任意の好適な方法によって、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質に添加される。いくつかの実施形態では、ＴＡＴ－Ｍｙｃポリペプチド配列は、ポリＨｉｓ－タグをコードする発現ベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、ポリヒスチジンタグは、ＰＣＲによって添加される（すなわち、ＰＣＲプライマーは、ポリヒスチジン配列を含む）。

【１８０４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、少なくとも１つのタンパク質タグをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、エピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、Ｖ５エピトープタグをさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、以下のアミノ酸を含む：ＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ（配列番号３０４）いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、以下のアミノ酸を含む：ＩＰＮＰＬＬＧ

ＬＤ（配列番号３０５）。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、任意の好適な方法によって、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質に添加される。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質配列は、Ｖ５タグをコードする発現ベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、ＰＣＲによって添加される（すなわち、ＰＣＲプライマーは、Ｖ５配列を含む）。

【１８０５】

いくつかの実施形態では、アミノ酸は、Ｄ形態である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、Ｌ形態である。いくつかの実施形態では、第１の複数のアミノ酸は、Ｄ形態であり、第２の複数のアミノ酸は、Ｌ形態である。

【１８０６】

いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、配列番号３１３を含む。

【１８０７】

Ｌ．免疫チェックポイント

本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ集団は、ＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ集団における１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を修飾するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、ＴＩＬ集団で遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの免疫チェックポイントのうちの１つ以上をコードするＴＩＬ内のＤＮＡ配列が、ＴＩＬのゲノム内で永続的に修飾される、例えば、挿入される、欠失される、または置換される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子を使用して１つ以上の免疫チェックポイントの発現を抑制する。例示的な実施形態では、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）をコードする核酸をＴＩＬ集団に導入して、修飾されたＴＩＬ集団における１つ以上の免疫チェックポイントの発現を抑制する。

【１８０８】

免疫チェックポイントは、阻害経路または刺激経路を介して免疫応答を調節するリンパ球によって発現される分子である。がんの場合、免疫チェックポイント経路は、しばしば活性化されて抗腫瘍応答を阻害する、すなわち、悪性細胞によるある特定の免疫チェックポイントの発現は、抗腫瘍免疫を阻害し、がん細胞の成長を促進する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。したがって、ある特定の阻害チェックポイント分子は、本発明の免疫療法の標的として機能する。特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、ある特定の免疫チェックポイント経路を遮断または刺激し、それによって腫瘍に対する体の免疫学的活性を増強するように遺伝子編集される。

【１８０９】

本明細書で使用される場合、免疫チェックポイント遺伝子は、免疫チェックポイント分子をコードするＤＮＡ配列を含む。本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。例えば、遺伝子編集は、免疫反応を増強するために、ＰＤ－１またはＣＴＬＡ－４などの阻害性受容体の発現をサイレンスまたは減少させ得る。いくつかの実施形態では、内因性免疫チェックポイントは、遺伝子編集プロセスによって修飾され、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンスまたは減少させる。いくつかの実施形態では、外因性ＲＮＡ干渉要素（例えば、ｓｈＲＮＡをコードするヌクレオチド）は、遺伝子編集プロセス中にＴＩＬプロセスに導入される。かかる実施形態では、ＲＮＡｉエレメントは、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させる。

【１８１０】

最も広く研究されているチェックポイントには、プログラムされた細胞死受容体－１（ＰＤ－１）及び細胞傷害性Ｔリンパ球関連分子－４（ＣＴＬＡ－４）が含まれ、これらは、それらが阻害リガンドと相互作用するときに、主要なエフェクター機能（例えば、活性化、増殖、サイトカイン放出、細胞傷害性など）を阻害する免疫細胞上の阻害性受容体で

ある。以下でさらに詳細に論じられるように、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４に加えて、多数のチェックポイント分子が免疫療法の潜在的な標的として浮上している。

【１８１１】

本発明のＴＩＬを遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）が含まれる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＣＢＬ－Ｂ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択されてもよい。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Ｂｌｏｏｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１８，ｉｎ　ｐｒｅｓｓに記載されている。別の実施例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントのうちの２つ以上）を含む群から選択されてもよい。

【１８１２】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団に、ヌクレオチドを導入することであって、ヌクレオチドが、

（ｉ）膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む、少なくとも１つの免疫調節組成物、及び／または

ｉｉ）ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される免疫チェックポイ

ント（例えば、上記の免疫チェックポイントの２つ以上）の発現を抑制するＲＮＡ干渉エレメント（例えば、ｓｈＲＮＡ）を、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞においてコードする、導入することと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含む。ヌクレオチドは、任意の好適な方法を使用して、第２のＴＩＬ集団に導入することができる。いくつかの実施形態では、

【１８１３】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、提供することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つ

の遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、ＢＣＯＲ、及びそれらの任意の組み合わせ（例えば、上記の免疫チェックポイントの２つ以上）からなる群から選択される分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、その分子の発現を阻害する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト　ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８１４】

１．ＰＤ－１

チェックポイント遮断の誘導のために最も研究されている標的のうちの１つは、Ｔ細胞調節因子のＣＤ２８スーパーファミリーのメンバーであるプログラム死受容体（ＰＤ１またはＰＤ－１、ＰＤＣＤ１としても知られている）である。そのリガンドであるＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２は、メラノーマを含む様々な腫瘍細胞上で発現する。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との相互作用は、Ｔ細胞エフェクター機能を阻害し、慢性刺激の設定においてＴ細胞疲弊をもたらし、腫瘍微小環境においてＴ細胞アポトーシスを誘導する。ＰＤ１はまた、免疫監視からの腫瘍特異的エスケープにおいても役割を果たし得る。

【１８１５】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＰＤ１の発現をサイレンシングまたは抑制することによって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＤ１などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ１の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。

【１８１６】

２．ＣＴＬＡ－４

ＣＴＬＡ－４発現は、活性化Ｔ細胞上でのＴ細胞活性化時に誘導され、抗原提示細胞活性化抗原ＣＤ８０及びＣＤ８６との結合について競合する。ＣＴＬＡ－４とＣＤ８０またはＣＤ８６との相互作用は、Ｔ細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持するのに役立つ。しかしながら、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４相互作用の阻害は、Ｔ細胞の活性化を延長し、したがって、がん抗原に対する免疫応答のレベルを増加させ得る。

【１８１７】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例

えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＴＬＡ－４などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８１８】

３．ＬＡＧ－３

リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ－３、ＣＤ２２３）は、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩのライゲーション後に、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞によって発現される。その機序は不明なままであるが、その調節は、Ｔ細胞機能に対して負の調節効果を引き起こし、組織損傷及び自己免疫を防止する。ＬＡＧ－３及びＰＤ－１は、ＴＩＬ上でしばしば共発現及び上方制御され、免疫疲弊及び腫瘍成長につながる。したがって、ＬＡＧ－３遮断は、抗腫瘍応答を改善する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。

【１８１９】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＬＡＧ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８２０】

４．ＴＧＩＴ

ＴＧＩＴ（Ｉｇ及びＩＴＩＭドメインを有するＴ細胞免疫受容体）は、いくつかのＴ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞上に存在する免疫受容体である。ＴＧＩＴ及びＰＤ－１は、メラノーマを有する個体から、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＴＩＬ上で過剰発現することが示されている。ＴＧＩＴ及びＰＤ－１の遮断は、細胞増殖、サイトカイン産生、ならびにＴＡ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＴＩＬ　ＣＤ８＋Ｔ細胞の脱顆粒化の増加につながっている。

【１８２１】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＧＩＴの発現は、本発明の組成物及び方法に従

ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬにおけるＴＧＩＴの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬにおけるＴＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＧＩＴなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるＴＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８２２】

５．ＴＩＭ－３

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

【１８２３】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＭ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８２４】

６．Ｃｉｓｈ

サイトカインシグナル伝達（ＳＯＣＳ）ファミリーのサプレッサーのメンバーであるＣｉｓｈは、ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＴＣＲ刺激によって誘導され、腫瘍に対するそれらの機能的不活性を阻害する。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＣｉｓｈの遺伝的欠失は、それらの拡大、機能的親和性、及びサイトカイン多機能性を増強し得、確立された腫瘍の顕著で持続的な退縮をもたらす。例えば、Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２１２（１２）：２０９５（２０１５）を参照されたい。

【１８２５】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現は、本発明の組成物及び方法に従

ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、Ｃｉｓｈなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８２６】

７．ＴＧＦβ

ＴＧＦβシグナル伝達経路は、細胞増殖、分化、アポトーシス、運動性及び侵入、細胞外マトリックス産生、血管新生、ならびに免疫応答を調節することにおいて複数の機能を有する。ＴＧＦβシグナル伝達の調節解除は、腫瘍において頻繁に行われ、腫瘍の開始、発達及び転移において重要な役割を有する。微小環境レベルでは、ＴＧＦβ経路は、発がん全体にわたる腫瘍成長及び転移のための好ましい微小環境を生成することに寄与する。例えば、Ｎｅｕｚｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１４７，ｐｐ．２２－３１（２０１５）を参照されたい。

【１８２７】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＧＦβなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８２８】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲ２（ＴＧＦベータ受容体２）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系を使用してＴＧＦβＲ２をサイレンシングすることによって、または当該技術分野で知られている方法を使用してＴＧＦβＲ２優性陰性細胞外トラップを使用することによって抑制され得る。

【１８２９】

８．ＰＫＡ

タンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）は、セリン－トレオニンタンパク質キナーゼスーパーファミリーの周知のメンバーである。ｃＡＭＰ依存性タンパク質キナーゼとしても知られ

るＰＫＡは、ｃＡＭＰ結合時の活性化を介してＧタンパク質結合受容体のシグナル伝達を媒介するマルチユニットプロテインキナーゼである。それは、代謝からイオンチャネル活性化、細胞成長及び分化、遺伝子発現及びアポトーシスまでの多種多様な細胞プロセスの制御に関与する。重要なことに、ＰＫＡは、多くの腫瘍の開始及び進行に関与している。例えば、Ｓａｐｉｏ ｅｔ ａｌ．，ＥＸＣＬＩ Ｊｏｕｒｎａｌ；２０１４；１３：８４３－８５５を参照されたい。

【１８３０】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＫＡなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８３１】

９．ＣＢＬＢ

ＣＢＬＢ（またはＣＢＬ－Ｂ）は、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼであり、Ｔ細胞活性化の負の制御因子である。Ｂａｃｈｍａｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０００，４０３，２１１－２１６、Ｗａｌｌｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，６９２６３９。

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＢＬＢなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Ｂｏｅｔｔｃｈｅｒ ａｎｄ ＭｃＭａｎｕｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ，２０１５，５８，５７５－５８５に見出すことができる。

【１８３２】

１．ＴＩＧＩＴ

Ｉｇ及びＩＴＩＭ（免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ）ドメインまたはＴＩＧＩＴを有するＴ細胞免疫受容体は、Ｉｇ様Ｖ型ドメインを有し、その細胞質ドメイン内にＩＴＩＭを有する膜貫通糖タンパク質受容体である。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８、Ｙｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００９，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．１，４８－５７。ＴＩＧＩＴは、いくつかのＴ細胞及びナチュラルキラー細胞によって発現される。追加として、ＴＩＧＩＴは、特にメラノーマを有する個体から、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＴＩＬ上で過剰発現することが示されている。研究では、ＴＩＧＩＴ経路が腫瘍免疫回避に寄与し、ＴＩＧＩＴ阻害がポリクローナル及び抗原特異的刺激に応答して、Ｔ細胞の活性化及び増殖を増加させることが示されている。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８．さらに、ＰＤ－１またはＴＩＭ３のいずれかとのＴＩＧＩＴの共遮断は、マウスモデルにおいて固形腫瘍に対する相乗効果を示している。Ｉｄ．；Ｋｕｒｔｕｌｕｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，２０１５，Ｖｏｌ．１２５，Ｎｏ．１１，４０５３－４０６２も参照されたい。

【１８３３】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＧＩＴなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８３４】

１０．ＴＯＸ

胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）は、ＨＭＧボックスＤＮＡ結合ドメインを含有する転写因子である。ＴＯＸは、配列非依存であるが構造依存的な方法でＤＮＡに結合すると考えられるＨＭＧボックススーパーファミリーのメンバーである。

【１８３５】

ＴＯＸは、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞機能障害またはＴ細胞枯渇の重要な調節因子として同定され、例えば、Ｓｃｏｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２７０－２７４及びＫｈａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２１１－２１８（これらの両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞疲弊を転写的かつ後成的にプログラムすることが見出された。ＴＯＸはまた、Ａｌｆｅｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２６５－２６９（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、慢性感染中のＴ細胞機能不全の進行及び疲弊したＴ細胞の維持に対する重要な因子であることが見出された。ＴＯＸは、腫瘍及び慢性ウイルス感染からの機能不全または疲弊したＴ

細胞において高度に発現される。インビトロでのエフェクターＴ細胞におけるＴＯＸの異所発現は、Ｔ細胞疲弊に関連する転写プログラムを誘導したが、Ｔ細胞におけるＴＯＸの欠失は、Ｔ疲弊プログラムを廃止した。

【１８３６】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＯＸなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、ＲＮＡ干渉法（例えば、ｓｈＲＮＡ）、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１８３７】

Ｇ．追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～７日間または約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間または約１～１０日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステッ

プは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【１８３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～８日間行われて第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～８日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ

－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～５日間培養される。

【１８３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～７日間行われて第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養

由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－ｇ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【１８４０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団を、外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）における培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）における培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、方法を提供する。

【１８４１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地に追加の外因性ＡＰＣが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８４９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８５８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８５９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第１．１の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６６】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６７】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８６８】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８６９】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７０】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７１】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７２】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７３】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７４】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７５】
他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８７６】
他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}ＡＰＣになるように、かつ急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×1

０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}ＡＰＣになるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７７】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約１×１０^{9}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７８】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８７９】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約２×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８０】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約２．５×１０^{8}ＡＰＣが一次の第１の拡張に追加され、かつ正確にまたは約５×１０^{8}ＡＰＣが急速な第２の増殖に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８１】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８２】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々内で、第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）において取得され、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）において取得され、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）において取得され、ステップ（ｃ）における複数の容器からの治療的ＴＩＬ集団が組み合わせられて、ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８３】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８４】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも２個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８８５】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８６】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８７】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８８】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８８９】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９０】
他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張がステップ（ｂ）において第１のＴＩＬ集団で行われる各容器の場合、ステップ（ｃ）における急速な第２の拡張が、同じ容器内でかかる第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９１】
他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９２】
他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９３】
他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９４】
他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。
【１８９５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１８９７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２

．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８９８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８９９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９００】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０３】

他の実施形態では、本発明は、第２の容器が第１の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０４】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【１９０５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１

、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９０９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第１の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１３】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【１９１４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細

胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９１９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９２０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９２１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：９の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われる

ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９２９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣ

の数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される、方法を提供する。

【１９３６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．

８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、方法を提供する。
【１９３７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される、方法を提供する。
【１９３８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：２の範囲から選択される、方法を提供する。
【１９３９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される、方法を提供する。
【１９４０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数に対する比が、約１．５：１～約１００：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約５０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２５：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９４３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約１０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４５】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４６】
他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団の数が、第１のＴＩＬ集団よりも少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始の正確にまたは約２日または正確にまたは約３日後に、細胞培養培地に追加のＩＬ－２が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４８】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）において採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９４９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）の後に、（ｅ）ステップ（ｄ）から採取したＴＩＬ集団を、任意選択でＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５０】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）において採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５１】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、１：１の採取されたＴＩＬ集団の凍結保存培地に対する比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５２】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５３】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が2.5×10^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９５５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５６】
他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５７】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５８】
他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９５９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取が膜ベースの細胞処理系を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）での採取がＬＯＶＯ細胞処理系を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約１５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約３５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９６８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９６９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約４５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約５０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が１容器当たり正確にまたは約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、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、または６０個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７２】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２７ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７３】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２０ｍｍ^3～正確にまたは約５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７４】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１ｍｍ^3～正確にまたは約３０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７５】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２２ｍｍ^3～正確にまたは約２９．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７６】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２３ｍｍ^3～正確にまたは約２９ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７７】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２４ｍｍ^3～正確にまたは約２８．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７８】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２５ｍｍ^3～正確にまたは約２８ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９７９】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２６．５ｍｍ^3～正確にまたは約２７．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１９８０】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８１】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含み、正確にまたは約１３００ｍｍ^3～正確にまたは約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８２】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８３】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１グラム～正確にまたは約１．５グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８４】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がＧ容器またはＸｕｒｉセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８５】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８６】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８７】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８８】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％ＤＭＳＯを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９８９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいず

れかに記載の方法を提供する。
【１９９２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１９９９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０００】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２００４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２００９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）で採取された治療的ＴＩＬ集団が、ＴＩＬの治療上有効な投与量に十分なＴＩＬを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１３】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なＴＩＬの数が、正確にまたは約2.3×10^{10}～正確にまたは約13.7×10^{10}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０１６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞が、ステップ（ｂ）の第２の細胞集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞と比較して増加したＣＤ８及びＣＤ２８発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０１９】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０２０】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧ容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０２１】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１０であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０２２】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０２３】
他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－５００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０２４】
他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。
【２０２５】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）またはＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０２６】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０２７】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加

したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０２８】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せず、かつＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０２９】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１６日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０３０】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１７日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０３１】
他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１８日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。
【２０３２】
他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【２０３３】
他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【２０３４】
他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【２０３５】
他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。
【２０３６】
他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集

団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０３７】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０３８】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０３９】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０４０】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／

または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０４１】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０４２】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０４３】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずに第１のＴＩＬ拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２０４４】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４５】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４６】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４７】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４８】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４９】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、約１１日間にわたって急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法

を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２０５０】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２０５１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落の

うちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０５８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０５９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６０】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６１】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６２】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６３】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６４】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０６９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、

１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７１】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ることを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を得ることを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約１１日間培養することによって急速な第２の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２０７２】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、ＩＬ－２を含む培養培地中で約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２０７３】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、Ｇ－ＲＥＸ－１００Ｍフラスコ内の０．５ＬのＣＭ１培養培地中６０００ＩＵ　ＩＬ－２／ｍＬを含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、６０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び約10^{8}個のフィーダー細胞を含む０．５ＬのＣＭ１培養培地を添加し、約８日間培養することによって、プライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、（ａ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び５×10^{9}個のフィーダー細胞を有する５ＬのＣＭ^{2}培養培地を含むＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに移し、約５日間培養し、（ｂ）10^{9}個のＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を有する５ＬのＡＩＭ－Ｖ培地を含む最大５つのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコの各々に移すことによって培養物を最大５つの継代培養物に分割し、継代培養物を約６日間培養することによって

、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２０７４】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養することによってドナーから取得された第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２０７５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養での第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約５～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７６】
他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約５～７日間培養される。

【２０７７】
他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【２０７８】
他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～６日間培養される。

【２０７９】
他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２０８０】
他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約６日間培養される。

【２０８１】
他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約７日間培養される。
【２０８２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）のプライミングによる第１の拡張が最大７日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１１日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０９１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含む第１の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９４】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９５】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９６】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９８】
他の実施形態では、本発明は、第２の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１００】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１の

ＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０３】

他の実施形態では、本発明は、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数の、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数に対する比が約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約２．５×10^8であり、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約５×10^8であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２層のＡＰＣの平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４～８層のＡＰＣから選択される平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数の、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数に対する比が、２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され

るように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１１８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４，０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１１９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２０】
他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２１】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが放射線照射され、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２２】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２３】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２４】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が末梢血リンパ球（ＰＢＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、Ｔ細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２８】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋及びＣＤ４５＋であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１２９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行う前に、Ｔ細胞がＮＫ細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、Ｔ細胞は、第１のＴ細胞集団からのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の除去によって、第１のＴ細胞集団中のＮＫ細胞から分離

される。他の実施形態では、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞は、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第１のＴ細胞集団を細胞選別に供することによって、第１のＴ細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＮＫ細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。

【２１３０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約１×１０^{7}Ｔ細胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約１×１０^{7}Ｔ細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において採取された第２のＴ細胞集団が治療的ＴＩＬ集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１３９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５０】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５１】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５２】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５３】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５４】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１５８】
他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の第

２の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において添加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｉｉ）において添加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、（ｖ）ステップ（ｉｖ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、を含む、方法を提供する。

【２１５９】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養倍地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養倍地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団の数が第１のＴＩＬ集団よりも多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第３の細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

【２１６０】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第３の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６１】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物にＩＬ－２を含む第４の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６２】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が最大５つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６３】

他の実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約２２日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６４】

他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞を拡張する方法であって、（ｉ）第１のＴ細胞集団を培養することによって、ドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｉｉ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｉｖ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いく

つかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０個のコア生検からなる群から選択される。

【２１６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞またはＴＩＬが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ　（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ　（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプＸＩＶ　（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ　（　ＤＮａｓｅ　）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【２１６６】

Ｖ．薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張及び／または遺伝子修飾された（ＣＣＲを発現するように遺伝子修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを含む）ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【２１６７】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣまたは黒色腫である場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{1}

^{0}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。

【２１６８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【２１６９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【２１７０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、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％

、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。
【２１７１】
いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。
【２１７２】
いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。
【２１７３】
いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。
【２１７４】
いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。
【２１７５】
本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に

依存するであろう。
【２１７６】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射に従うものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。
【２１７７】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。
【２１７８】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。
【２１７９】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約10^{5}ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍ

ｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【２１８０】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【２１８１】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を含む注入バッグを提供する。

【２１８２】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【２１８３】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を含む注入バッグを提供する。

【２１８４】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の凍結保存された調製物を提供する。

【２１８５】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【２１８６】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２１８７】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２１８８】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【２１８９】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたＴＩＬは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のＴＩＬ懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡張されたＴＩＬは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ３０～６０分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【２１９０】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均は約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの

実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}ＴＩＬである。

【２１９１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【２１９２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ未満である。

【２１９３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、

２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、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％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖ超である。

【２１９４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２１９５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２１９６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【２１９７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇ超である。

【２１９８】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【２１９９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射に従うものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回超であり得る。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【２２００】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【２２０１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【２２０２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０

ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約10^5ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【２２０３】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【２２０４】

患者を治療する方法

治療方法は、最初のＴＩＬ収集及びＴＩＬの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５（３）：２８３－２９２によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【２２０５】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また例えば、図１及びまたは図８に示されるように）産生される拡張ＴＩＬは、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１６，３４（２０）：２３８９－２３９、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００３，２６：３３２－３４２を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり５、１０、１５、２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２２、２４、２６、または２８個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２４個の試料が取得される。試料は、２４ウェルプレートの個々のウェル内に配置され、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／またはＴＩＬの増殖について監視され得る。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【２２０６】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したＴＩＬは、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６）のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晩の共培養によりインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）レベルが２００ｐｇ／ｍＬを超え、バックグラウンドの２倍になった場合、ＴＩＬは反応性があるとみなされ得る。（Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１０，３３：８４０－８４７、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡張を含む、第２の拡張（例えば、図１及び／または図８のステップＤに従って提供される第２の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第２の拡張中の高い増殖）を有する拡張ＴＩＬが、

追加の第２の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図１及び／または図８のステップＤで提供されるような第２の拡張中の高い増殖）を有するＴＩＬが、図１及び／または図８のステップＤに従って、追加の第２の拡張のために選択される。

【２２０７】

注入バッグＴＩＬの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＣＲ７、及びＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）のフローサイトメトリー（例えば、ＦｌｏｗＪｏ）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、１００ｐｇ／ｍＬ超及び４　３ベースラインレベルを超えると定義された。

【２２０８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス１Ｃ及び／または第１世代（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、ＤＣＲ、ＯＲＲ、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

【２２０９】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、

及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでのＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のＴＩＬ血清において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。

【２２１０】

いくつかの実施形態では、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または臨床有効性の増加を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。

【２２１１】

いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法を含む、図１及び／または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供

されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２２１２】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）ならびに全応答率（ＯＲＲ）が含まれ得る。

【２２１３】

Ａ．がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、それらは、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【２２１４】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌）、結腸癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消火器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに膣癌からなる群から選択される。

【２２１５】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＭＩＬまたはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【２２１６】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少なくとも１つの前療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍癌及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも２つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも３つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述

のがんのうちの１つである。
【２２１７】
いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌である。したがって、ＭＳＩ－Ｈ及びｄＭＭＲ癌ならびに試験は、Ｋａｗａｋａｍｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｒｅａｔ．Ｏｐｔｉｏｎｓ　Ｏｎｃｏｌ．２０１５，１６，３０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【２２１８】
いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、伴侶動物である。
【２２１９】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ＢＲＡＦ阻害剤及び／またはＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＢＲＡＦ阻害剤、ならびにトラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるＭＥＫ阻害剤による治療に対して不応性である。
【２２２０】
いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。
【２２２１】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。
【２２２２】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。
【２２２３】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。
【２２２４】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児がんは、肉腫である。
【２２２５】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。
【２２２６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【２２２７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（ＰＮＥＴ）である。

【２２２８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（ＣＮＳ）関連癌である。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【２２２９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ＣＮＳ関連がんは、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【２２３０】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、患者のがんの進行に続く、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示す。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも１つの化学療法剤と組み合わせた抗ＣＴＬＡ－４抗体及び／または抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

【２２３１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－Ｌ１陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）が１％未満でＰＤ－Ｌ１を発現するがんを有する患者に由来する。

【２２３２】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。

【２２３３】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、

ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療

法剤と、を含む。

【２２３４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験のＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験であり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験であり、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療未経験のＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１未経験である。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。

【２２３５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２２３６】

いくつかの実施形態では、例えば、図１または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えば、プロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１または図８に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図

１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２２３７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、本明細書に記載の１つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２２３８】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１％未満（ＴＰＳ＜１％）のＰＤ－Ｌ１タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜５０％、＜４５％、＜４０％、＜３５％、＜３０％、＜２５％、＜２０％、＜１５％、＜１０％、＜９％、＜８％、＜７％、＜６％、＜５％、＜４％、＜３％、＜２％、＜１％、＜０．９％、＜０．８％、＜０．７％、＜０．６％、＜０．５％、＜０．４％、＜０．３％、＜０．２％、＜０．１％、＜０．０９％、＜０．０８％、＜０．０７％、＜０．０６％、＜０．０５％、＜０．０４％、＜０．０３％、＜０．０２％、及び＜０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２０％、約１５％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％，及び約０

．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．９％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．８％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．７％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．６％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．５％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．４％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．３％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．２％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。ＴＰＳは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Ｈｉｒｓｃｈ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｏｎｃｏｌ．２０１７，１２，２０８－２２２に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１療法による治療前のＴＰＳの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局（Ｕ．Ｓ．Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されたＴＰＳの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【２２３９】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ１００％の膜染色を含む。

【２２４０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の試験は、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【２２４１】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性ＰＤ－Ｌ１の上昇は、ＮＳＣＬＣにおける予後の悪化と相関する。例えば、Ｏｋｕｍａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｌｕｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ，２０１８，１９，４１０－４１７、Ｖｅｃｃｈｉａｒｅｌｌｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０１８，９，１７５５４－１７５６３を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【２２４２】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、対象または患者は、

ｉ．＜１％のＰＤ－Ｌ１所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、

ｉｉ．１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または

ｉｉｉ．１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有し、

ドライバー変異は、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、Ｆ

ＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択され、この方法は、

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

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

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

（ｈ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【２２４３】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、

（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、

（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、

（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

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

（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、

（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第

２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。
【２２４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステ

ップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【２２４５】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合からなる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％～約４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【２２４６】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団を投与することによって、ＮＳＣＬＣを治療する方法を提供し、この方法は、
（ａ）ＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ１発現及び腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）について患者の腫瘍を試験することと、
（ｂ）１つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、またはＲＥＴ融合から

なる群から選択される、試験することと、
（ｃ）患者が、約１％未満のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、
（ｄ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｅ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加することと、
（ｆ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｉ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存することと、
（ｋ）治療上有効な投与量の第３のＴＩＬ集団を、ステップ（ｇ）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【２２４７】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２２４８】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２２４９】

他の実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団及び本明細書に記載のＴＩＬ組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２２５０】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２２５１】

他の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２２５２】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２２５３】
他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２５４】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２５５】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２５６】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２５７】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２５８】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２５９】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２６０】
他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２６１】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２６２】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２６３】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。
【２２６４】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。
【２２６５】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。
【２２６６】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２２６７】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２６８】
他の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２６９】
他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７０】
他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７１】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７２】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７３】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７４】
他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７５】
他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７６】
他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７７】
他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７８】
他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２７９】
他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２８０】
他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本

明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団またはＴＩＬ組成物を提供する。
【２２８１】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。
【２２８２】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【２２８３】
他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与することと、次いで治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与することと、を含む、患者におけるがんを治療する方法における、本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【２２８４】
１．ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１阻害剤との併用
いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬならびに１つ以上のＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。
【２２８５】
プログラム死１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される２８８アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。ＣＤ２７９としても知られるＰＤ－１は、ＣＤ２８ファミリーに属し、ヒトでは第２染色体上のＰｄｃｄ１遺伝子によってコードされる。ＰＤ－１は、１つの免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む細胞内ドメインからなる。ＰＤ－１及びそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｋｅｉｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，６７７－７０４に記載されるように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。ＰＤ－１は、Ｔ細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１またはＣＤ２７４としても知られる）及びＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣまたはＣＤ２７３としても知られる）は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、ＰＤ－１を発現する活性化Ｔ細胞が遭遇する可能性があり、Ｔ細胞の免疫抑制につながる。ＰＤ－Ｌ１は、ヒト第９染色体上のＣｄ２７４遺伝子によってコードされる２９０アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Ｔｏｐａｌｉａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２，３６６，２４４３－５４に記載される最近の臨床研究で実証されているように、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤の使用による、ＰＤ－１ならびにそのリガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、ＰＤ－Ｌ２は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される発現される。Ｔ細胞（活性化後にＰＤ－１を誘導的に発現する）に加えて、ＰＤ－１は、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。
【２２８６】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－１阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。
【２２８７】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつ

かの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【２２８８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－１遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－１阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－１阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、コンジュゲート、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２２８９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。

【２２９０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約２０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約１０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【２２９１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約７．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約８×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約８．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約９×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約９．５×$10^5$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１×$10^6$１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合するものである。

【２２９２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約２×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約２．７×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．８×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．９×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約３×10^{-5}１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合するものである。

【２２９３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【２２９４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＯＰＤＩＶＯとして市販されている）、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントである。ニボルマブは、ＰＤ－１受容体を遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、免疫グロブリンＧ４カッパ、抗（ヒトＣＤ２７４）抗体である。ニボルマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号９４６４１４－９４－４が割り当てられており、５Ｃ４、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ－１１０６、及びＯＮＯ－４５３８としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第８，００８，４４９号及び国際特許公開第ＷＯ２００６／１２１１６８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１４，２，８４６－５６、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、及びＷｅｂｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１３，３１，４３１１－４３１８に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表２５に示す。ニボルマブは、２２－９６、１４０－１９６、２５４－３１４、３６０－４１８、２２’’－９６’’、１４０’’－１９６’’、２５４’’－３１４’’、及び３６０’’－４１８’’における重鎖内ジスルフィド連結；２３’－８８’、１３４’－１９４’、２３’’’－８８’’’、及び１３４’’’－１９４’’’における軽鎖内ジスルフィド連結；１２７－２１４’、１２７’’－２１４’’’における重鎖－軽鎖間ジスルフィド連結；２１９－２１９’’及び２２２－２２２’’における重鎖－重鎖間ジスルフィド連結；ならびに２９０、２９０’’におけるＮ－グリコシル化部位（ＨＣＨ２　８４．４）を有する。

【２２９５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１５８によって与えられる重鎖及び配列番号１５９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９７％同一である

重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２２９６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１６０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１６１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【２２９７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６２、配列番号１６３、及び配列番号１６４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１６５、配列番号１６６、及び配列番号１６７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【２２９８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

【２２９９】

【表２６】

表 25.ニボルマブに関連する PD-1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 158 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
配列番号 159 ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 160 ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS 113
配列番号 161 ニボルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
配列番号 162 ニボルマブ重鎖 CDR1	NSGMH 5
配列番号 163 ニボルマブ重鎖 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
配列番号 164 ニボルマブ重鎖 CDR3	NDDY 4
配列番号 165 ニボルマブ軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 166 ニボルマブ軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 167 ニボルマブ軽鎖 CDR3	QQSSNWPRT 9

【２３００】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、

または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０３】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎、または４８０ｍｇを４週間毎に投与される。

【２３０４】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０５】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇまたは４週間毎に４８０ｍｇ投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０６】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０７】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇ／ｋｇ、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３０８】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎、４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができ

る。

【２３０９】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１０】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１１】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１２】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４

、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１３】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ未満の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１４】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１５】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３１６】

他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎ

ｃ（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）からＫＥＹＴＲＵＤＡとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントを含む。ペムブロリズマブには、ＣＡＳ登録番号１３７４８５３－９１－４が割り当てられており、ラムブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、及びＳＣＨ－９００４７５としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトタンパク質ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１））（ヒト－ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト－ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトプログラム細胞死１）；ヒト化マウスモノクローナルκ軽鎖二量体（２２６－２２６′′：２２９－２２９′′）－ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル［２２８－Ｌ－プロリン（Ｈ１０－Ｓ＞Ｐ）］γ４重鎖（１３４－２１８′）－ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第ＷＯ２００８／１５６７１２Ａ１号、米国特許第８，３５４，５０９号、ならびに米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、及び同第２０１３／０１０９８４３Ａ２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｆｕｅｒｓｔ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｔｉｍｅｓ，２０１４，３６，３５－３６、Ｒｏｂｅｒｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２０１４，３８４，１１０９－１７、及びＴｈｏｍａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１４，１４，１０６１－１０６４に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表２６に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－９２′、２３′′′－９２′′′、１３４－２１８′、１３４′′′－２１８′′′、１３８′－１９８′、１３８′′′－１９８′′′、１４７－２０３、１４７′′－２０３′′、２２６－２２６′′、２２９－２２９′′、２６１－３２１、２６１′′－３２１′′、３６７－４２５、及び３６７′′－４２５′′、ならびにグリコシル化部位（Ｎ）：Ａｓｎ－２９７及びＡｓｎ－２９７′′を含む。ペムブロリズマブは、Ｆｃ領域に安定化Ｓ２２８Ｐ変異を有するＩｇＧ４／カッパアイソタイプであり、この変異をＩｇＧ４ヒンジ領域に挿入すると、ＩｇＧ４抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のＦｃドメイン内のＡｓｎ２９７で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ１４９ｋＤａになる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム（Ｇ０Ｆ）である。

【２３１７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１６８によって与えられる重鎖及び配列番号１６９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２３１８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域

（ＶＨ）は、配列番号１７０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１７１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【２３１９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７２、配列番号１７３、及び配列番号１７４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１７５、配列番号１７６、及び配列番号１７７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【２３２０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。

【２３２１】

【２３２２】

【表２７－１】

表 26.ペムブロリズマブに関連する PD-1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 168 ペムブロリズマブ重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
配列番号 169 ペムブロリズマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218
配列番号 170 ペムブロリズマブ可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
配列番号 171 ペムブロリズマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 172 ペムブロリズマブ重鎖 CDR1	NYYMY 5

【表２７－２】

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 173 ペムブロリズマブ重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK	16
配列番号 174 ペムブロリズマブ重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y	11
配列番号 175 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH	15
配列番号 176 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR2	LASYLES	7
配列番号 177 ペムブロリズマブ軽鎖 CDR3	QHSRDLPLT	9

【２３２３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３２４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約

２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３２５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３２６】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３２７】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３２８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１

、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３２９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３０】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３１】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または

５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損大腸癌（ｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３４】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３５】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３６】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開

始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３７】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（ＨＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（ＭＣＣ）を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３３９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（ＲＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＲＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで、経口で１日２回のアキシチニブ５ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３４０】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲではない腫瘍に対して、６週間毎に約

４００ｍｇで、経口で１日１回のレンバチニブ２０ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３４１】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高遺伝子変異量（ＴＭＢ－Ｈ）癌を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３４２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌（ｃＳＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ｃＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３４３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＮＢＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３４４】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び６週間毎の４００ｍｇの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）

投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２３４５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗ｍ－ＰＤ－１クローンＪ４３（カタログ番号ＢＥ００３３－２）及びＲＭＰ１－１４（カタログ番号ＢＥ０１４６）（ＢｉｏＸ　Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ　ＵＳＡ）などの市販の抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－１抗体が、当業者に知られている。

【２３４６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，３５４，５０９号または米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７　Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、同第２０１３／０１０９８４３　Ａ２号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，２８７，８５６号、同第８，５８０，２４７号、及び同第８，１６８，７５７号、ならびに米国特許出願公開第２００９／００２８８５７　Ａ１号、同第２０１０／０２８５０１３　Ａ１号、同第２０１３／００２２６００　Ａ１号、及び同第２０１１／０００８３６９　Ａ１号に記載されている抗ＰＤ－１抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，７３５，５５３　Ｂ１号に開示されている抗ＰＤ－１抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＣＴ－０１１としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第８，６８６，１１９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２３４７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，９０７，０５３号、同第９，０９６，６４２号、及び同第９，０４４，４４２号、ならびに米国特許出願公開第２０１５／００８７５８１号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０２４号に記載されるものなどの１，２，４－オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０４２号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第２０１５／０１２５４９１号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３３３０１号に記載されるものなどの１，３，４－オキサジアゾール及び１，３，４－チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３６９２７号及び同第ＷＯ２０１５／０４４９０号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第２０１４／０２９４８９８号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ，Ｉｎｃ．から市販されているセミプリマブである。

【２３４８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ及びＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【２３４９】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、本明細書に記載のＴＩＬと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【２３５０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤で

あり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、コンジュゲート、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２３５１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。

【２３５２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ１阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ２受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ１と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ１に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ２受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ１受容体に結合する。

【２３５３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ２阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ１受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ２と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ２に対して選択的である。ある特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ１受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ２受容体に結合する。

【２３５４】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はＰＤ－Ｌ１を発現し、Ｔ細胞はＰＤ－１を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるＰＤ－Ｌ１の発現は、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体の組み合わせを含むことができる。ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体とＴＩＬとの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

【２３５５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約

７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、約５０ｐＭ以下のＫＤ、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【２３５６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９．５×１０^{5}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１×１０^{6}１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合するものである。

【２３５７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ１に約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合するものである。

【２３５８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、またはヒトＰＤ－１を遮断し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断するものである。

【２３５９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＥＤＩ４７３６としても知られるデュルバルマブ（これは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ　ｐｌｃ．の子会社であるＭｅｄｉｍｍｕｎｅ，ＬＬＣ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から市販されている）、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，７７９，１０８号または米国特許出願公開第２０１３／００３４５５９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、Ｂｒａｈｍｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４，３２，５ｓ（補足、要約８０２１）、及びＭｃＤ

ｅｒｍｏｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　Ｒｅｖ．，２０１４，４０，１０５６－６４に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第８，７７９，１０８号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表２７に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－８９′、２３′′′－８９′′′、１３５′－１９５′、１３５′′′－１９５′′′、１４８－２０４、１４８′′－２０４′′、２１５′－２２４、２１５′′′－２２４′′′、２３０－２３０′′、２３３－２３３′′、２６５－３２５、２６５′′－３２５′′、３７１－４２９、及び３７１′′－４２９′におけるジスルフィド連結、ならびにＡｓｎ－３０１及びＡｓｎ－３０１′′におけるＮ－グリコシル化部位を含む。

【２３６０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１７８によって与えられる重鎖及び配列番号１７９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２３６１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１８０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１８１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。

【２３６２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８２、配列番号１８３、及び配列番号１８４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８５、配列番号１８６、及び配列番号１８７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－ＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２３６３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

【２３６４】

【表２８－１】

表 27.デュルバルマブに関連する PD-L1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 178 デュルバルマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 179 デュルバルマブ 軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265
配列番号 180 デュルバルマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS 120 S 121
配列番号 181 デュルバルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 10^{8}

【表２８－２】

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 182 デュルバルマブ 重鎖 CDR1	RYWMS	5
配列番号 183 デュルバルマブ 重鎖 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
配列番号 184 デュルバルマブ 重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY	12
配列番号 185 デュルバルマブ 軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA	12
配列番号 186 デュルバルマブ 軽鎖 CDR2	DASSRAT	7
配列番号 187 デュルバルマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSLPWT	9

【２３６５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（ＭｅｒｃｋＫＧａＡ／ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏから市販されている）としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表２８に示す。アベルマブは、２２－９６、１４７－２０３、２６４－３２４、３７０－４２８、２２′′－９６′′、１４７′′－２０３′′、２６４′′－３２４′′、及び３７０′′－４２８′′における重鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２′－９０′、１３８′－１９７′、２２′′′－９０′′′、及び１３８′′′－１９７′′′における軽鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２３－２１５′及び２２３′′－２１５′′′における重鎖－軽鎖内ジスルフィド連結（ｈ　５－ＣＬ　１２６）；２２９－２２９′′及び２３２－２３２′′における重鎖－重鎖内ジスルフィド連結（ｈ　１１、ｈ　１４）；３００、３００′′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．４）；フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン；ならびに４５０及び４５０′におけるＨ　ＣＨＳ　Ｋ２　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【２３６６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１８８によって与えられる重鎖及び配列番号１８９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２３６７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１９０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１９１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。

【２３６８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９２、配列番号１９３、及び配列番号１９４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９５、配列番号１９６、及び配列番号１９７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２３６９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、

米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

【２３７０】

【表２９－１】

表 28.アベルマブに関連する PD-L1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 188 アベルマブ 重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 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
配列番号 189 アベルマブ 軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
配列番号 190 アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号 191 アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL 110
配列番号 192 アベルマブ 重鎖 CDR1	SYIMM 5

【表２９－２】

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 193 アベルマブ 重鎖 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
配列番号 194 アベルマブ 重鎖 CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
配列番号 195 アベルマブ 軽鎖 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号 196 アベルマブ 軽鎖 CDR2	DVSNRPS	7
配列番号 197 アベルマブ 軽鎖 CDR3	SSYTSSSTRV	10

【２３７１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＰＤＬ３２８０ＡまたはＲＧ７４４６としても知られるアテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ　Ｈｏｌｄｉｎｇ　ＡＧ（Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の子会社であるＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．からＴＥＣＥＮＴＲＩＱとして市販されている）、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，２１７，１４９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１０／０２０３０５６Ａ１号、同第２０１３／００４５２００Ａ１号、同第２０１３／００４５２０１Ａ１号、同第２０１３／００４５２０２Ａ１号、または同第２０１４／００６５１３５Ａ１号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第８，２１７，１４９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表２９に示す。アテゾリズマブは、２２－９６、１４５－２０１、２６２－３２２、３６８－４２６、２２′′－９６′′、１４５′′－２０１′′、２６２′′－３２２′′、及び３６８′′－４２６′′における重鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２３′－８８′、１３４′－１９４′、２３′′′－８８′′′、及び１３４′′′－１９４′′′における軽鎖内ジスルフィド連結（Ｃ２３－Ｃ１０４）；２２１－２１４′及び２２１′′－２１４′′′における重鎖－軽鎖内ジスルフィド連結（ｈ　５－ＣＬ　１２６）；２２７－２２７′′及び２３０－２３０′′における重鎖－重鎖内ジスルフィド連結（ｈ　１１、ｈ　１４）；ならびに２９８及び２９８′におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．４＞Ａ）を有する。

【２３７２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１９８によって与えられる重鎖及び配列番号１９９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、

バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２３７３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号２００に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号２０１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ及びＶＬ領域を含む。

【２３７４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号２０２、配列番号２０３、及び配列番号２０４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２０５、配列番号２０６、及び配列番号２０７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２３７５】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリ

ズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。

【２３７６】

【表３０－１】

表 29.アテゾリズマブに関連する PD-L1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 198 アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 199 アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 200 アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
配列番号 201 アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 202 アテゾリズマブ 重鎖 CDR1	GFTFSDSWIH 10

【表３０－２】

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 203 アテゾリズマブ 重鎖 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
配列番号 204 アテゾリズマブ 重鎖 CDR3	RHWPGGFDY	9
配列番号 205 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR1	RASQDVSTAV A	11
配列番号 206 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR2	SASFLYS	7
配列番号 207 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR3	QQYLYHPAT	9

【２３７７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＢＭＳ－９３５５５９としても知られるＭＤＸ－１１０５であり、これは米国特許第７，９４３，７４３号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第７，９４３，７４３号に開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択される。

【２３７８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＩＮＶＩＶＯＭＡＢ抗ｍ－ＰＤ－Ｌ１クローン１０Ｆ．９Ｇ２（カタログ番号ＢＥ０１０１、Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ ＥＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（ＭＩＨ１）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、当業者に知られている。

【２３７９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ２４Ｆ．１０Ｃ１２マウスＩｇＧ２ａ、κアイソタイプ（カタログ番号３２９６０２ Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＩＧＭＡ抗ＰＤ－Ｌ２抗体（カタログ番号ＳＡＢ３５００３９５，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ

）、または当業者に知られている他の市販のＰＤ－Ｌ２抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【２３８０】

２．ＣＴＬＡ－４阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬ及び１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【２３８１】

細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーＴ細胞の表面で発現する。ＣＴＬＡ－４は、ＣＤ２８依存性Ｔ細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。Ｔ細胞共刺激タンパク質ＣＤ２８と同様に、ＣＴＬＡ－４結合抗原は、細胞上でＣＤ８０及びＣＤ８６を提示する。ＣＴＬＡ－４は抑制シグナルをＴ細胞に伝達し、ＣＤ２８は刺激シグナルを伝達する。ヒトＣＴＬＡ－４に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（ＷＯ０１／１４４２４及びＷＯ００／３７５０４）。イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０）及びトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、臨床試験で研究されている。

【２３８２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、当技術分野で知られている任意のＣＴＬＡ－４阻害剤またはＣＴＬＡ－４遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＣＴＬＡ－４阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＣＴＬＡ－４阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、コンジュゲート、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２３８３】

本発明の方法で使用するための好適なＣＴＬＡ－４阻害剤には、抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト抗ＣＴＬＡ－４抗体、マウス抗ＣＴＬＡ－４抗体、哺乳動物抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト化抗ＣＴＬＡ－４抗体、モノクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、ポリクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、キメラ抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＭＤＸ－０１０（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗ＣＤ２８抗体、抗ＣＴＬＡ－４アドネクチン、抗ＣＴＬＡ－４ドメイン抗体、一本鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、重鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、軽鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、共刺激経路を刺激するＣＴＬＡ－４の阻害剤、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００１／０１４４２４号に開示される抗体、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００４／０３５６０７号に開示される抗体、米国公開第２００５／０２０１９９４号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第１２１２４２２　Ｂ１号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号に記載されており、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で使用することができる他の抗ＣＴＬＡ－４抗体には、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２

２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ　Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、Ｍｏｋｙｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，５８：５３０１－５３０４（１９９８）、ならびに米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【２３８４】

さらなるＣＴＬＡ－４阻害剤には、ＣＤ２８抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、ＣＴＬＡ－４がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してＴ細胞応答を増強すること、Ｂ７がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、Ｂ７が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８０がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８０が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８６がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８６が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアドネクチン、他のＣＴＬＡ－４阻害剤のなかでも共刺激経路の他のメンバーのなかでもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４のＲＮＡｉ阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）が必ず含まれる。

【２３８５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、約１０－６Ｍ以下、１０－７Ｍ以下、１０－８Ｍ以下、１０－９Ｍ以下、１０－１０Ｍ以下、１０－１１Ｍ以下、１０－１２Ｍ以下、例えば、１０－１３Ｍ～１０－１６Ｍ、またはエンドポイントとして前述の値のうちの任意の２つを有する任意の範囲内のＫｄでＣＴＬＡ－４に結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのＫｄの１０倍以下のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低いか、または最大１００倍低い）のＫｄでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介阻害より１０倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低い、または最大１００倍低い）である。

【２３８６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４のＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方との結合を減少させることにより、ＣＴＬＡ－４の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象となる薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、対象とな

る薬剤、例えば、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（または僅かな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的系（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的系は、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的系は、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

【２３８７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＹｅｒｖｏｙとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトＩｇＧ　１κ抗体である、抗ＣＴＬＡ－４抗体を指す。イピリムマブは、そのＣＡＳ登録番号４７７２０２－００－９及びＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号で参照することもでき、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体１０ＤＩとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号２１１を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号２１０を含む重鎖可変領域を有する）を含む。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び１つ以上の希釈剤、ビヒクル、または賦形剤を含有するすべての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、国際特許出願公開第ＷＯ２００７／６７９５９号に記載されている。イピリムマブは、静脈内（ＩＶ）投与され得る。

【２３８８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２０８によって与えられる重鎖及び配列番号２０９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２３８９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号２１０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号２１１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ

Ｈ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【２３９０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１２、配列番号２１３、及び配列番号２１４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２１５、配列番号２１６、及び配列番号２１７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２３９１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表３０に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。

【２３９２】

【表３１】

表 30.イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 208 イピリムマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
配列番号 209 イピリムマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
配列番号 210 イピリムマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 211 イピリムマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号 212 イピリムマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYT 8
配列番号 213 イピリムマブ 重鎖 CDR2	TFISYDGNNK 10
配列番号 214 イピリムマブ 重鎖 CDR3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号 215 イピリムマブ 軽鎖 CDR1	QSVGSSY 7
配列番号 216 イピリムマブ 軽鎖 CDR2	GAF 3
配列番号 217 イピリムマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT 9

【２３９３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用

量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２３９４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２３９５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２３９６】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、３週間毎に約ｍｇ／ｋｇで最大４用量投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２３９７】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、約１０ｍｇ／ｋｇで３週間毎に４用量、続いて１０ｍｇ／ｋｇで１２週間毎に最大３年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２３９８】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、直後に同じ日にニボルマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与され得る。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２３９９】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳ

Ｉ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで静脈内に３０分間にわたって投与され、直後に同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを静脈内に３０分間にわたって３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復欠損（ｄＭＭＲ）転移性大腸癌の標準的な投薬レジメンに従って推奨されるように単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４００】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで静脈内に３０分間にわたって投与され、直後に同じ日にニボルマブ１ｍｇ／ｋｇを静脈内に３０分間にわたって３週間毎に４用量投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４０１】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、２週間毎に３ｍｇ／ｋｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４０２】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４０３】

トレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６としても知られる）は、完全ヒトＩｇＧ２モノクローナル抗体であり、ＣＡＳ番号７４５０１３－５９－６を有する。トレメリムマブは、米国特許第６，６８２，７３６号（参照により本明細書に組み込まれる）において抗体１１．２．１として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号２１８及び２１９に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、０．０１及び１５ｍｇ／ｋｇの用量範囲で４週間または１２週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局

所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり５～２００ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり１０～１５０ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約１０、２５、３７．５、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、または２００ｍｇ／用量である。

【２４０４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２１８によって与えられる重鎖及び配列番号２１９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２４０５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号２２０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号２２１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【２４０６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２２、配列番号２２３、及び配列番号２２４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２２５、配列番号２２６、及び配列番号２２７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２４０７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列

に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表３１に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。

【２４０８】

【表３２】

表31.トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号218 トレメリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号219 トレメリムマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号220 トレメリムマブ可変重鎖	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
配列番号221 トレメリムマブ可変軽鎖	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
配列番号222 トレメリムマブ重鎖CDR1	GFTFSSYGME 10
配列番号223 トレメリムマブ重鎖CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
配列番号224 トレメリムマブ重鎖CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV 16
配列番号225 トレメリムマブ軽鎖CDR1	RASQSINSYL D 11
配列番号226 トレメリムマブ軽鎖CDR2	AASSLQS 7
配列番号227 トレメリムマブ軽鎖CDR3	QQYYSTPFT 9

【２４０９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／

ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４１０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４１１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２４１２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、Ａｇｅｎｕｓからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号２１４８３２１－６９－９が割り当てられており、ＡＧＥＮ１８８４としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第１０，１４４，７７９号及び米国特許出願公開第２０２０／００２４３５０　Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２４１３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２２８によって与えられる重鎖及び配列番号２２９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２４１４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のＣ

ＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号２３０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号２３１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶＨ領域及びＶＬ領域を含む。

【２４１５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２３１、配列番号２３３、及び配列番号２３４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２３５、配列番号２３６、及び配列番号２３７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２４１６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、抗ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表３２に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。

【２４１７】

【表３３】

表 32.ザリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 228 ザリフレリマブ重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 229 ザリフレリマブ軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 230 ザリフレリマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
配列番号 231 ザリフレリマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
配列番号 232 ザリフレリマブ重鎖 CDR1	GFTFSSYS 8
配列番号 233 ザリフレリマブ重鎖 CDR2	ISSSSSYI 8
配列番号 234 ザリフレリマブ重鎖 CDR3	ARVGLMGPFD I 11
配列番号 235 ザリフレリマブ軽鎖 CDR1	QSVSRY 6
配列番号 236 ザリフレリマブ軽鎖 CDR2	GAS 3
配列番号 237 ザリフレリマブ軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT 9

【２４１８】

さらなる抗ＣＴＬＡ－４抗体の例には、ＡＧＥＮ１１８１、ＢＭＳ－９８６２１８、ＢＣＤ－１４５、ＯＮＣ－３９２、ＣＳ１００２、ＲＥＧＮ４６５９、及びＡＤＧ１１６が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【２４１９】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、以下の特許公開のうちのいずれかに開示される抗ＣＴＬＡ－４抗体である：ＵＳ２０１９／００４８０９６Ａ１、ＵＳ２０２０／０２２３９０７、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２００５／０２０１９９４、ＥＰ１２１２４２２Ｂ１、ＷＯ２０１８／２０４７６０

、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２００１／０１４４２４、ＷＯ２００４／０３５６０７、ＷＯ２００３／０８６４５９、ＷＯ２０１２／１２０１２５、ＷＯ２０００／０３７５０４、ＷＯ２００９／１００１４０、ＷＯ２００６／０９６４９、ＷＯ２００５／０９２３８０、ＷＯ２００７／１２３７３７、ＷＯ２００６／０２９２１９、ＷＯ２０１０／０９７９５９７、ＷＯ２００６／１２１６８、及びＷＯ１９９７／０２０５７４（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号、及び／または米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９８，９５，１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２００４，２２，１４５（Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、またはＭｏｋｙｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９９８，５８，５３０１－５３０４（１９９８）に開示されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【２４２０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＷＯ１９９６／０４０９１５（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるＣＴＬＡ－４リガンドである。

【２４２１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＣＴＬＡ－４発現の核酸阻害剤である。例えば、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、ＰＣＴ公開第ＷＯ１９９９／０３２６１９号及び同第ＷＯ２００１／０２９０５８号、米国公開第２００３／００５１２６３号、同第２００３／００５５０２０号、同第２００３／００５６２３５号、同第２００４／２６５８３９号、同第２００５／０１００９１３号、同第２００６／００２４７９８号、同第２００８／００５０３４２号、同第２００８／００８１３７３号、同第２００８／０２４８５７６号、同第２００８／０５５４４３号、及び／または米国特許第６，５０６，５５９号、同第７，２８２，５６４号、同第７，５３８，０９５号、及び同第７，５６０，４３８号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、欧州特許第１３０９７２６号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、米国特許第７，０５６，７０４号及び同第７，０７８，１９６号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、国際特許出願公開第ＷＯ２００４／０８１０２１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたアプタマーである。

【２４２２】

他の実施形態では、本発明の抗ＣＴＬＡ－４ＲＮＡｉ分子は、米国特許第５，８９８，０３１号、同第６，１０７，０９４号、同第７，４３２，２４９号、及び同第７，４３２，２５０号、ならびに欧州出願第０９２８２９０号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載されたＲＮＡ分子である。

【２４２３】

３．Ｍｙｃ融合タンパク質との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集合単独による治療を含んでもよく、またはＴＩＬ及び本明細書に開示されるＭｙｃ融合タンパク質を含む併用治療を含んでもよい。Ｍｙｃ融合タンパク質は、米国特許第１１，３６９，６７８号に記載されており、その内容は参照によりその全体が組み込まれる。

【２４２４】
ある特定の実施形態では、本明細書に開示するのは、（ａ）トランスポーターペプチド配列、及び（ｂ）ＭＹＣ配列を含むＭＹＣ融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、式（Ｉ）のペプチドである：
トランスポーターペプチド配列－ＭＹＣ配列。
【２４２５】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）トランスポーターペプチド配列、（ｂ）ＭＹＣ配列、及び（ｃ）トランスポーターペプチド配列とＭＹＣ配列とを連結する１つ以上の分子を含む。いくつかの実施形態では、ｆｕｓｉＭＹＣ融合タンパク質は、式（ＩＩ）のペプチドであり、
トランスポーターペプチド配列－Ｘ－ＭＹＣ配列
式中、－Ｘ－は、トランスポーターペプチド配列とＭＹＣ配列とを連結する分子である。いくつかの実施形態では、－Ｘ－は、アミノ酸である。いくつかの実施形態では、－Ｘ－は、少なくとも１つのアミノ酸である。
【２４２６】
本明細書で使用される場合、「トランスポーターペプチド」は、ペプチドが細胞及び組織に浸透することを促進するペプチド配列を意味する。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＨＩＶ－１のＴＡＴタンパク質形質導入ドメイン（ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ）（配列番号３０６）のＮ末端９アミノ酸配列である。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＴＡＴ[４８－５７]である。いくつかの実施形態では、トランスポーターペプチドは、ＴＡＴ[５７－４８]である。
【２４２７】
本明細書で使用される場合、「ＭＹＣ配列」は、ＭＹＣアミノ酸ペプチド配列である。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチドは、完全なＭｙｃポリペプチド配列である。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチドは、部分Ｍｙｃポリペプチド配列である。いくつかの実施形態では、ＭＹＣは、ｃ－ＭＹＣである。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃポリペプチド配列は、配列番号３１２を含む：
【２４２８】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[４８－５７]及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[５７－４８]及び（ｂ）ｃ－ＭＹＣを含む。
【２４２９】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[４８－５７]、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、（ａ）ＴＡＴ[５７－４８]、（ｂ）リンカーアミノ酸、及び（ｃ）ｃ－ＭＹＣを含む。
【２４３０】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、融合タンパク質の精製を容易にする少なくとも１つのアミノ酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、タンパク質タグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、ポリヒスチジンタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、エピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、ポリヒスチジンタグ及びエピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、６－ヒスチジンタグ及びＶ５エピトープタグを含む。

【２４３１】
いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、６－ヒスチジンタグである。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、配列ＨＨＨＨＨＨ（配列番号３０３）を含む。いくつかの実施形態では、ヒスチジンタグは、任意の好適な方法によって、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質に添加される。いくつかの実施形態では、ＴＡＴ－Ｍｙｃポリペプチド配列は、ポリＨｉｓ－タグをコードする発現ベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、ポリヒスチジンタグは、ＰＣＲによって添加される（すなわち、ＰＣＲプライマーは、ポリヒスチジン配列を含む）。
【２４３２】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、少なくとも１つのタンパク質タグをさらに含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、エピトープタグを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質は、Ｖ５エピトープタグをさらに含む。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、以下のアミノ酸を含む：ＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ（配列番号３０４）。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、以下のアミノ酸を含む：ＩＰＮＰＬＬＧＬＤ（配列番号３０５）。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、任意の好適な方法によって、本明細書に開示されるＭＹＣ融合タンパク質に添加される。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質配列は、Ｖ５タグをコードする発現ベクターにクローニングされる。いくつかの実施形態では、Ｖ５タグは、ＰＣＲによって添加される（すなわち、ＰＣＲプライマーは、Ｖ５配列を含む）。
【２４３３】
いくつかの実施形態では、アミノ酸は、Ｄ形態である。いくつかの実施形態では、アミノ酸は、Ｌ形態である。いくつかの実施形態では、第１の複数のアミノ酸は、Ｄ形態であり、第２の複数のアミノ酸は、Ｌ形態である。
【２４３４】
いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、配列番号３１３を含む。
【２４３５】
いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質は、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質は、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、配列番号３１３を含む。
【２４３６】
いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質は、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質は、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質はまた、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質はまた、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、配列番号３１３を含む。
【２４３７】

いくつかの実施形態では、Ｍｙｃ融合タンパク質は、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ＭＹＣ融合タンパク質は、配列番号３１３を含む。

【２４３８】

４．患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのＴＩＬ集団を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇで静脈内的にＩＬ－２（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。ある特定の実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＩＬ－２と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、ＩＬ－２は、ＴＩＬ集団の後に投与される。

【２４３９】

実験結果は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

【２４４０】

一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Ｇａｓｓｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１１，６０，７５－８５、Ｍｕｒａｎｓｋｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．Ｏｎｃｏｌ．，２００６，３，６６８－６８１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－５２３９、及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－２３５７に記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【２４４１】

いくつかの実施形態では、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１０ｍｇ／ｋｇ／日、１５ｍｇ／ｋｇ／日、２０ｍｇ／ｋｇ／日、２５ｍｇ／ｋｇ／日、３０ｍｇ／ｋｇ／日、３５ｍｇ／ｋｇ／日、４０ｍｇ／ｋｇ／日、または４５ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。

【２４４２】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、１μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以

上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ２／日、１５０ｍｇ／ｍ２／日、１７５ｍｇ／ｍ２／日、２００ｍｇ／ｍ２／日、２２５ｍｇ／ｍ２／日、２５０ｍｇ／ｍ２／日、２７５ｍｇ／ｍ２／日、または３００ｍｇ／ｍ２／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、ｉ．ｖ．）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ２／日で４～５日間ｉ．ｖ．投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ２／日で４日間ｉ．ｖ．投与される。

【２４４３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドを一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、２５ｍｇ／ｍ２／日でｉ．ｖ．投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ２／日で４日間にわたってｉ．ｖ投与される。

【２４４４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与することによって行われる。

【２４４５】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２４４６】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２４４７】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２４４８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２４４９】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約１５ｍｇ／ｍ２／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２４５０】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で３日間投与することによって行われる。

【２４５１】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、１５ｍｇ／ｋｇで投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約２時間にわたってシクロホス

ファミドを注入することができ（－５日目及び／または－４日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する２４時間にわたって残りの２２時間で３ｍｇ／ｋｇ／時間の速度で注入することができる。

【２４５２】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【２４５３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【２４５４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、５日間のプレコンディショニング治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、－５日から－１日、または０日から４日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に６０ｍｇ／ｋｇの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。

【２４５５】

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

【２４５６】

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

【２４５７】

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

【２４５８】

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

【２４５９】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。

【２４６０】

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

【２４６１】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミド

を６０ｍｇ／ｍ２／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ２／日の用量で３日間投与するステップを含む。

【２４６２】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３に従って投与される。

【２４６３】

【表３４】

表 33.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン　25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２４６４】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３４に従って投与される。

【２４６５】

【表３５】

表 34.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド　60mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン　25mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【２４６６】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３５に従って投与される。

【２４６７】

【表３６】

表 35.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド　60mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン　25mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【２４６８】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３６に従って投与

される。
【２４６９】
【表３７】

表 36.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン　25mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【２４７０】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３７に従って投与される。
【２４７１】
【表３８】

表 37.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン　30mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２４７２】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３８に従って投与される。
【２４７３】
【表３９】

表 38.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド　300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン　30mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【２４７４】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３９に従って投与される。
【２４７５】

【表４０】

表 39.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド　300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン　30mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【２４７６】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表４０に従って投与される。
【２４７７】
【表４１】

表 40.例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン　30mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【２４７８】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また本明細書に記載されるようなＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤など）の投与であり得る。
【２４７９】
５．ＩＬ－２レジメン
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、高用量ＩＬ－２レジメンを含み、高用量ＩＬ－２レジメンは、治療的ＴＩＬ集団の治療上有効な部分を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントは、許容範囲まで８時間毎に最大１４用量にわたって、０．０３７ｍｇ／ｋｇまたは０．０４４ｍｇ／ｋｇ　ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で１５分のボーラス静脈内注入を使用して投与される。９日間の休止後、このスケジュールは、さらに１４用量、合計最大２８用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１、２、３、４、５、または６用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。
【２４８０】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンを含む。デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、Ｏ’Ｄａｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１９９９，１７，２７５２－６１、及びＥｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　２０００，８８，１７０３－９に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、６時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}アルデスロイキン、または

そのバイオシミラーもしくはバリアント、続いて１２時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて２４時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて７２時間かけて静脈内投与される４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}を含む。この治療サイクルは、２８日毎に最大４サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【２４８１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、低用量ＩＬ－２レジメンを含む。Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ－Ｖｉｌｌａｒ ａｎｄ Ｈａｆｌｅｒ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０００，１９，６６５－６７３、Ｈａｒｔｅｍａｎｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ Ｄｉａｂｅｔｅｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０１３，１，２９５－３０５、及びＲｏｓｅｎｚｗａｉｇ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．２０１９，７８，２０９－２１７（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量ＩＬ－２レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量ＩＬ－２レジメンを使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量ＩＬ－２レジメンは、ｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを２４時間当たり５日間の連続的注入として、その後ＩＬ－２療法なしで２～６日間、その後任意選択でアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを静脈内にさらに５日間、２４時間当たりｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵの連続的注入として、その後任意選択でＩＬ－２療法なしで３週間投与することを含み、その後追加のサイクルが投与され得る。

【２４８２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量ＩＬ－２レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に６００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に４００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に３００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に２００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に１００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。

【２４８３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ベンペガルデスロイキン、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２４８４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ＴＨＯＲ－７０７、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２４８５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＴＩＬの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーの投与を含む。ある特定

の実施形態では、患者にネムバロイキンを１日、２日、４日、６日、７日、１４日または２１日毎に、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で投与される。

【２４８６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、抗体骨格に移植されたＩＬ－２断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＩＬ－２低親和性受容体と結合する抗体－サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（ＶＨ）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）と、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４または２１日毎に、配列番号２９及び配列番号３８からなる群から選択される重鎖と、配列番号３７及び配列番号３９からなる群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２４８７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標））または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。

【２４８８】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また、ＴＩＬ注入の代わりにＭＩＬ及びＰＢＬの注入、ならびに本明細書に記載のＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１　阻害剤及び／またはＣＴＬＡ－４阻害剤など）の投与を含み得る。

【実施例】

【２４８９】

ＶＩ．実施例

本明細書に包含される実施形態は、これから以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【２４９０】

実施例１：ＲＥＰ前プロセス及びＲＥＰプロセス用の培地の調製

この実施例は、様々な固形腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製のための手順を説明する。この培地を、本出願及び他の実施例に記載のＴＩＬのうちのいずれかの調製に使用することができる。

【２４９１】

ＣＭ１の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、それらを３７℃の水浴中で温めた（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン）。濾過される容量に適した０．２μｍフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表４１に従ってＣＭ１培地を調製した。４℃で保存する。

【２４９２】

【表４２】

表 41.CM1 の調製

成分	最終濃度	最終体積 500mL	最終体積 IL
RPMI1640	NA	450mL	900mL
ヒト AB 血清、熱不活性化 10%	50mL	100mL	
200mM　L-グルタミン	2mM	5mL	10mL
55mM　BME	55μM	0.5mL	1mL
50mg/mL　硫酸ゲンタマイシン	50μg/mL	0.5mL	1mL

【２４９３】
使用日に、３７℃の水浴中で必要量のＣＭ１を事前に温め、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を追加した。
【２４９４】
表４２に従って必要に応じて追加の補充を行った。
【２４９５】
【表４３】

表 42.必要に応じた CM1 の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200mM	1:100	2mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL　ペニシリン 10,000μg/mL　ストレプトマイシン	1:100	100U/mL　ペニシリン 100μg/mL　ストレプトマイシン
アンホテリシン B	250μg/mL	1:100	2.5μg/mL

【２４９６】
ＣＭ^{2}の調製
調製したＣＭ１を冷蔵庫から取り出すか、または新鮮なＣＭ１を調製した。ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したＣＭ１を滅菌培地ボトル内で同等体積のＡＩＭ－Ｖ（登録商標）と混合することによって、必要な量のＣＭ^{2}を調製した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をＣＭ２培地に追加した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む十分な量のＣＭ^{2}を作製した。ＣＭ２培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、２週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要になるまで４℃で保存した。
【２４９７】
ＣＭ３の調製
使用が必要になった日にＣＭ３を調製した。ＣＭ３は、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地と同じであり、使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した。ＩＬ－２ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ３を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２」とラベル付けする。過剰なＣ

Ｍ３が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。

【２４９８】

ＣＭ４の調製

ＣＭ４は、ＣＭ３と同じであり、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（最終濃度）を追加で補充した。１ＬのＣＭ３毎に、１０ｍＬの２００ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を添加する。ＩＬ－２ストック溶液及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ４を調製する。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＬ／ｍＬ　ＩＬ－２及びＧｌｕｔａＭＡＸ」とラベル付けした。過剰なＣＭ４が存在する場合、培地名、「ＧｌｕｔａＭＡＸ」、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保管した。４℃で７日間保管した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。

【２４９９】

実施例２：ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用

この実施例は、本明細書の実施例のうちのいずれかのＴＩＬプロセスと組み合わせた、追加のＴ細胞成長因子として機能するＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインの使用を説明する。

【２５００】

本明細書に記載のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせから成長させることができる。ＲＥＰ前の完了時に、培養物を、拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）、及びにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の場所及びＳａｎｔｅｇｏｅｔｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．，２０１３，１１，３７に記載されている。

【２５０１】

結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１処理条件でのＣＤ４＋及びＣＤ８＋細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して増強したＴＩＬ拡張（＞２０％）が観察できることを示し得る。ＩＬ－２単独培養物と比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理した培養物から取得されたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主にＣＤ８＋集団への歪みがあった。ＩＦＮ－γ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２単独で処理したＴＩＬと比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理したＴＩＬで上昇した。

【２５０２】

実施例３：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ、単核細胞またはＭＮＣとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。

【２５０３】

放射線照射された各ＭＮＣフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体及びインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下でＲＥＰ内のＴＩＬを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。

【２５０４】

ＴＩＬのＲＥＰには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたＭＮＣフィーダー細胞が必要である。フィーダーＭＮＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＲＥＰフラスコ内のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。フィーダーロット

は、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。

【２５０５】

ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＭＮＣ細胞の細胞生存性が喪失する。

【２５０６】

フィーダーロットを、２つの基準：１）共培養でＴＩＬを１００倍超拡張する能力、及び２）複製不全で評価した。

【２５０７】

フィーダーロットを、直立したＴ２５組織培養フラスコ内で培養された２つの主要なＲＥＰ前　ＴＩＬ株を利用して、ｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。各ＴＩＬ株は、ＲＥＰでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの放射線照射されたＭＮＣフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。

【２５０８】

１回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、すべての条件及びすべてのフィーダーロットを試験するために、同じＲＥＰ前ＴＩＬ株の十分なストックが利用可能であった。

【２５０９】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計６つのＴ２５フラスコがあった：ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃１（２フラスコ）、ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃２（２フラスコ）、及びフィーダー対照（２フラスコ）。ＴＩＬ株番号１及び番号２を含むフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【２５１０】

Ａ．実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍ＣＭ２培地を調製し、３７℃の水浴中で温める。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４０ｍＬのＣＭ２を調製する。使用まで保温する。ＩＬ－２を含まない２０ｍＬの予熱したＣＭ２を、使用したＴＩＬ株の名前がラベル付けされた２本の５０ｍＬコニカルチューブの各々に入れる。ＬＮ２ストレージから２つの指定されたＲＥＰ前ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、３７℃の水浴内の密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【２５１１】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブ中の２０ｍＬのＣＭ２に直ちに移した。細胞を洗浄し、４００×ＣＦで５分間遠心分離するために、ＩＬ－２なしのＣＭ２を使用して４０ｍＬにＱＳ。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された５ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。

【２５１２】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート（２０μＬ）を重複して取り出した。計数を記録した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した３７℃、５％　CO_2インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＣＭ２中で1×10^6細胞／ｍＬに希釈した。

【２５１３】

ｍｉｎｉ－ＲＥＰの０日目まで、加湿した３７℃のインキュベーターで必要な数のウェ

ルにおいて、２４ウェル組織培養プレートの１ウェル当たり２ｍＬで培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の２４ウェル組織培養プレートで異なるＴＩＬ株を培養した。

【２５１４】

０日目、Ｍｉｎｉ－ＲＥＰを開始する試験されるフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製したＣＭ２の一部を分注し、それを細胞の培養のために３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充した。（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５００ｍＬのＣＭ２培地を調製する）。

【２５１５】

相互汚染を防ぐために各ＴＩＬ株を別々に操作し、ＴＩＬ培養物を入れた２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【２５１６】

無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、約１ｍＬの培地を、使用されるＴＩＬの各ウェルから取り出し、２４ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【２５１７】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、残りの培地をウェル内のＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、ＴＩＬロット名のラベルが付いた５０ｍＬコニカルチューブに移し、容量を記録した。

【２５１８】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ５０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を４００×ＣＦで回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ^{2}培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、１．３×１０^{6}細胞／ｍＬを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【２５１９】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。カウントしながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した５％　CO_2、３７℃インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

【２５２０】

ＴＩＬ細胞を含有する５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された温かいＣＭ^{2}中、１．３×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【２５２１】

第２のＴＩＬ株について、上記のステップを繰り返した。

【２５２２】

ＴＩＬを実験用のＴ２５フラスコに入れる直前に、ＴＩＬを、以下の通り１：１０に希釈して１．３×１０^{5}細胞／ｍＬの最終濃度にした。

【２５２３】

ＭＡＣＳ　ＧＭＰ　ＣＤ３ピュア（ＯＫＴ３）作用溶液を調製するＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍＬ）を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。

【２５２４】

実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬに対して６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であり、こ

れは、２０ｍＬ毎に６０μＬの１０μｇ／ｍＬ溶液、または各フィーダーロットについて試験した６つのフラスコすべてで３６０μＬに相当する。

【２５２５】

試験した各フィーダーロットについて、４００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬＯＫＴ３を、１０μｇ／ｍＬの作業濃度で作製した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験する場合、１６００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３：１６μＬの１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１．５８４ｍＬのＣＭ２培地を作製する）。

【２５２６】

Ｔ２５フラスコを調製するフィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内のＣＭ２に成分が添加される。

【２５２７】

さらなる情報を表４３に提供する。

【２５２８】

【表４４】

表 43.溶液情報。

構成要素	共培養フラスコ内の容量	対照(フィーダーのみ)フラスコ内の容量
CM^2 + 3000 IU/mL IL-2	18mL	19mL
MNC: CM^2+3000IU IL-2 中 1.3×10^7/mL (最終濃度 1.3×10^7/フラスコ)	1mL	1mL
OKT3: CM^2 中 10 μL/mL=3000IU IL-2	60 μL	60 μL
TIL: 3000IU の IL-2 を含む CM^2 中の 1.3×10^5/mL (最終濃度 1.3×10^5/フラスコ)	1mL	0

【２５２９】

フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり７８×10^6フィーダー細胞の最小値が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍＬバイアルは、凍結時に１００×10^6個の生細胞を有していた。液体Ｎ２ストレージからの解凍時の５０％の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも２つの１ｍＬバイアルのフィーダー細胞を解凍して、各ＲＥＰに推定１００×10^6個の生細胞を与えることが推奨された。あるいは、１．８ｍＬバイアルで供給された場合、１つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。

【２５３０】

フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットにＩＬ－２を含まないおよそ５０ｍＬのＣＭ２を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルをＬＮ２ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーバッグから取り出し、７０％　ＥｔＯＨでスプレーまたはワイプし、ＢＳＣに移した。

【２５３１】
トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、５０ｍＬのコニカルチューブ中の３０ｍＬの温かいＣＭ^{2}に直ちに移した。バイアルを少量のＣＭ^{2}で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた４ｍＬの温かいＣＭ^{2}に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数を記録した。
【２５３２】
３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた温かいＣＭ^{2}中、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬで細胞を再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。
【２５３３】
共培養物を準備する。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。４．５ｍＬのＣＭ^{2}培地を１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬの血清ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０ ^{6}細胞／ｍＬのＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬのコニカルチューブ中の４．５ｍＬの培地に添加した。ＴＩＬストックバイアルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第２のＴＩＬ株に対して繰り返した。
【２５３４】
単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬのピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに１ｍＬ（１．３×１０^{7}細胞）を移した。６０μＬのＯＫＴ３作用ストック（１０μｇ／ｍＬ）を各フラスコに追加した。２つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。
【２５３５】
各ＴＩＬロットの１ｍＬ（１．３×１０^{5}）を、対応するラベルの付いたＴ２５フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。５日目まで乱さなかった。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。
【２５３６】
５日目、培地変更３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むＣＭ２を調製した。各フラスコに１０ｍＬが必要である。１０ｍＬピペットを使用して、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１０ｍＬの温かいＣＭ２を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、７日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。
【２５３７】
７日目、採取インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍＬの培地を取り出し、対照フラスコの各々から１５ｍＬの培地を取り出した。
【２５３８】
１０ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、ＴＩＬを計数した。７日目に計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。
【２５３９】
フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、ＴＩＬを含むフラスコは、０日目からの倍率拡張について評価した。
【２５４０】

７日目、フィーダー対照フラスコの１４日目までの継続フィーダー対照フラスコの７日目の計数を完了した後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５ｍＬの新鮮なＣＭ^{2}培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。

【２５４１】

１４日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ１７ｍＬの培地を取り出した。５ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【２５４２】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。ＴＩＬは、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２５４３】

Ｂ．結果及び承認基準プロトコル

結果ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また０日目と比較して、ＲＥＰ培養の７日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。すべてのフィーダーロットは、ＲＥＰ培養の７日目までのＴＩＬ成長の１００倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの１４日目の計数は、７日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【２５４４】

承認基準フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製ＴＩＬ株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表４４に示すように、２倍であった。

【２５４５】

【表４５】

表 44.承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNC の照射及び複製不全	7 日目及び 14 日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各 TIL の少なくとも 100 倍の拡張(最低 1.3×10^{7} 個の生細胞)

【２５４６】

３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養した場合に、ＭＮＣフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、ＲＥＰの７日目及び１４日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（ＴＶＣ）によって評価した。

【２５４７】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数から７日目及び１４日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【２５４８】

フィーダー細胞がＴＩＬ拡張をサポートする能力を評価した。ＴＩＬ成長は、ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、７日目に、ＴＩＬ培養物は最低１００倍の拡張を

達成した（すなわち、ＲＥＰの０日目に培養された生ＴＩＬ細胞の総数の１００倍超）。
【２５４９】
承認基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットの偶発性試験ＭＮＣフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。
【２５５０】
ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。
【２５５１】
適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。
【２５５２】
実施例４：ＩＬ－２ストック溶液の調製
この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン－２を、ｒｈＩＬ－２の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。
【２５５３】
手順。０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬの滅菌水を、５０ｍＬのコニカルチューブに移した。１ｍＬの１Ｎ酢酸を、５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。チューブを２～３回反転させながら十分に混合した。Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターを使用した濾過によってＨＡｃ溶液を滅菌した。
【２５５４】
ＰＢＳ中の１％　ＨＳＡを調製する。４ｍＬの２５％　ＨＳＡストック溶液を、１５０ｍＬの滅菌フィルターユニット内の９６ｍＬのＰＢＳに追加した。溶液を濾過した。４℃で保管した。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、フォームに記入する。
【２５５５】
ｒｈＩＬ－２ストック溶液を調製した（最終濃度６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）。ｒｈＩＬ－２の各ロットは異なり、必要な情報は、以下のような製造業者の分析証明書（ＣＯＡ）に見出された：１）バイアル当たりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）、及び３）推奨０．２％　ＨＡｃ再構成体積（ｍＬ）。
【２５５６】
以下の等式を使用して、ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％ＨＳＡの体積を計算した。
【２５５７】
【数２】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量}(mg) \times \text{生物活性}\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ \text{体積}\ (mL) = 1\%\ HSA\ \text{体積}\ (mL)$$

【２５５８】
例えば、ｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１（Ｃｅｌｌｇｅｎｉｘ）のＣＯＡによると、１ｍｇバイアルの比活性は、２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。ｒｈＩＬ－２を２ｍＬの０．２％ＨＡｃ中で再構成することが推奨される。
【２５５９】
【数３】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\frac{IU}{mL}}\right)-2mL=2.167mL\ HSA$$

【２５６０】
ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。３ｍＬシリンジに取り付けた１６Ｇ針を使用して、推奨体積の０．２％　ＨＡｃをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを３回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算された容量の１％ＨＳＡをバイアルに添加した。
【２５６１】
ｒｈＩＬ－２溶液の保管。短期保管（７２時間未満）の場合、４℃でバイアルを保管した。長期保管（７２時間超）の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで－２０℃でクライオバイアル内で保管した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から６ヶ月後に有効期限が切れた。Ｒｈ－ＩＬ－２ラベルに、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体積を含めた。
【２５６２】
実施例５：凍結保存プロセス
この実施例では、ＣｒｙｏＭｅｄ制御速度冷凍庫、モデル７４５４（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、本明細書に記載の手順で調製したＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。
【２５６３】
使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック（ＣＳ７５０フリーザーバッグに対応）、７５０ｍＬバッグ用凍結保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、及びＣｒｙｏＳｔｏｒｅ　ＣＳ７５０冷凍バッグ（ＯｒｉＧｅｎ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。
【２５６４】
凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度、及び－８０℃の終了温度まで毎分１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ１－４℃で待つ、ステップ２：－４℃まで１．０℃／分（試料温度）、ステップ３：－４５℃まで２０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ４：－１０．０℃まで１０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ５：－２０℃まで０．５℃／分（チャンバ温度）、及びステップ６：－８０℃まで１．０℃／分（試料温度）。
【２５６５】
実施例６：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス
上記または以下で開示されるプロセスは、ＣＭ１培地及びＣＭ^{2}培地を、合成培地（例えば、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　ＳＦＭ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、例えば、ＤＭ１及びＤＭ２を含む）で置き換えることによって行われ得る。
【２５６６】
実施例７：凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的ＧＥＮ２産生
この実施例は、Ｉｏｖａｎｃｅ　Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．のｃＧＭＰ製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセスの例示的なｃＧＭＰ製造を説明する。
【２５６７】

【表４６】

表 45.プロセス拡張の例示的な計画

推定日(播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積(mL)
0	腫瘍解剖	G-REX-100MCS 当たり≦50 個の望ましい腫瘍断片	G-REX-100MCS　1 フラスコ	≦1000
11	REP 播種	5~200×10^6 個の生細胞/G-REX-500MCS	G-REX-500MCS　1 フラスコ	≦5000
16	REP 分割	1×10^9 個の生細胞/G-REX-500MCS	G-REX-500MCS≦5 フラスコ	≦25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≦530

【２５６８】
【表４７】

表 46.フラスコ容積

フラスコタイプ	作業容積/フラスコ(mL)
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【２５６９】
０日目のＣＭ１培地の調製ＢＳＣ内で、試薬をＲＰＭＩ１６４０培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒトＡＢ血清（１００．０ｍＬ）、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）を加熱する
【２５７０】
ＢＳＣから不要な材料を取り出した。ＢＳＣから培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣの中に残した。
【２５７１】
ＩＬ－２アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２アリコート（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２：ロット番号及び有効期限を記録した。
【２５７２】
ＩＬ－２ストック溶液を培地に移した。ＢＳＣ内で、１．０ｍＬのＩＬ－２ストック溶液を、調製されたＣＭ１の０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１の０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。
【２５７３】
Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをＢＳＣの中に通過させた。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ（Ｗ３０１３１３０）をＢＳＣの中に通過させた。
【２５７４】

すべての完全なＣＭ１の０日目培地をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはＧＲｅｘ１００ＭＣＳ。

【２５７５】

０日目の腫瘍洗浄培地の調製ＢＳＣ内で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２またはＷ３０１２７３５）を１本の５００ｍＬのＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（５．０ｍＬ）。１Ｌの０．２２ミクロンフィルターユニット（Ｗ１２１８８１０）を通して調製されたゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳを濾過した。

【２５７６】

０日目の腫瘍処理腫瘍検体を取得し、即時に処理のために２～８℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄１は、８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄１」皿に移す。この後、腫瘍洗浄２及び腫瘍洗浄３が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死及び／または脂肪性組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の３０％未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪性組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片（最大６つの中間断片）に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を、およそ３×３×３ｍｍのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」６ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大５０片のために液滴を充填した。

【２５７７】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を５０ｍＬのコニカルチューブに移した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのためのＢＳＣを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコをＢＳＣの中に通過させた。腫瘍断片をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【２５７８】

以下のパラメータにおいてＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをインキュベートした：Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。計算：培養の時間、下限＝培養の時間＋２５２時間、上限＝培養の時間＋２７６時間。

【２５７９】

プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。

【２５８０】

１１日目－培地の調製インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。

【２５８１】

３本の１０００ｍＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル及び３本の１０００ｍＬのＡＩＭ－Ｖ（Ｗ３００９５０１）ボトルを、インキュベーター内で３０分間以上温めた。インキュベーターからＲＰＭＩ１６４０培地を取り出した。ＲＰＭＩ１６４０培地を調製した。培地を濾過した。３つのＩＬ－２の１．１ｍＬのアリコート（６×10^6ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。インキュベーターからＡＩＭ－Ｖ培地を取り出した。ＩＬ－２をＡＩＭ－Ｖに追加した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ及びリピータポンプ移送セットを、ＢＳＣの中に無菌的に移した。

【２５８２】

１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。Ｂａｘａポンプを準備した。１０

ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。培地を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒにポンプで注入した。Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグからポンプマティックを取り出した。

【２５８３】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地を試料採取した。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。ＢＳＣに、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。試薬をＢＳＣから２～８℃に移した。１Ｌ移送パックを準備した。（プロセス注記５．１１に従って）ＢＳＣ溶接の外側で、「完全なＣＭ^{2}の１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの１Ｌ移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なＣＭ^{2}の１１日目培地をインキュベートした。

【２５８４】

１１日目－ＴＩＬ採取前処理表。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％　CO_2．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。３００ｍＬ移送パックを準備した。移送パックをＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに溶接した。

【２５８５】

ＴＩＬ採取及びＴＩＬ採取の開始のためにフラスコを準備する。ＴＩＬが採取された。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を３００ｍＬの移送パックに移した。付着した細胞について膜を点検した。

【２５８６】

フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。ＴＩＬ及び「上清」移送パックを熱融着した。ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。試料採取のために上清移送パックを準備した。

【２５８７】

Ｂａｃ－Ｔ試料を引き出した。ＢＳＣ内で、１Ｌ「上清」移送パックからおよそ２０．０ｍＬの上清を引き上げ、無菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。

【２５８８】

試料計画に従ってＢａｃＴを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたＢａｃＴとラベル付けされた５０ｍＬコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

【２５８９】

ＴＩＬをインキュベートした。必要とされるまで、ＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷２。生細胞濃度÷２。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×０．９。上限：生細胞濃度の平均×１．１。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。

【２５９０】

ＴＩＬ懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。総ＴＩＬ細胞体積（Ａ）。取り出された細胞計数試料の体積（４．０ｍＬ）（Ｂ）調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。

【２５９１】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。平均生細胞濃度＊：総体積、総生細胞：Ｃ＝ＡｘＢ．

【２５９２】

フローサイトメトリーのための計算：総生ＴＩＬ細胞数が、４．０×１０^{7}個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために１．０×１０^{7}個の細胞を取得するための体積を計算した。

【２５９３】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞：１．０×１０^{7}個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を１．０×１０^{7}個の細胞Ａで割った

もの。

【２５９４】

２．０×１０^{8}個の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算し、過剰なＴＩＬを取り出し、必要に応じてＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰ＴＩＬを計算した。

【２５９５】

凍結のための標的細胞濃度が１．０×１０^{8}細胞／ｍＬである過剰なＴＩＬ細胞に追加するＣＳ－１０培地の量を計算した。必要に応じて、過剰なＴＩＬを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０を追加した。

【２５９６】

バイアルを充填した。１．０ｍＬの細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が≦０．５ｍＬである場合、体積が０．５ｍＬになるまでＣＳ１０をバイアルに追加する。

【２５９７】

凍結保存のための１×１０^{7}個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。

【２５９８】

試料の凍結保存コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０をゆっくりと追加し、追加された０．５ｍＬのＣＳ１０の体積を記録した。

【２５９９】

１１日目－フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の３つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはｃｒｙｏｔｈｅｒｍを準備した。３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍにおいて約３～５分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。

【２６００】

移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。

【２６０１】

フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第４のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍ内で約３～５分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した（Ｂ）。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。

【２６０２】

必要に応じて希釈液を調製し、４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。４．０ｍＬを差し引い

た総フィーダー細胞体積が取り出された。５×１０^{9}個の生フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。

【２６０３】

１．０ｍＬシリンジ及び１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を引き上げ、ＯＫＴ３を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。

【２６０４】

１１日目　Ｇ－ＲＥＸ充填及びシード設定Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ。「完全なＣＭ^{2}の１１日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに溶接した。フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。ＴＩＬをＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを３７．０±２．０℃でインキュベートした。CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。

【２６０５】

インキュベーション時間帯を計算した。１６日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間＋１０^{8}時間。上限：インキュベーションの時間１３２時間。

【２６０６】

１１日目　過剰ＴＩＬ凍結保存。該当：過剰ＴＩＬバイアルを凍結させた。凍結前にＣＲＦが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをＣＲＦから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。ＬＮ２における保管場所を記録した。

【２６０７】

１６日目　培地の調製ＡＩＭ－Ｖ培地を事前に温めた。培地バッグ１、２、及び３について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが１２～２４時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグのメス型ポートのうちの１つに取り付けた。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定し、ラベル付けした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ＢＳＣから取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行われ得るＴＩＬ採取中に使用された。

【２６０８】

ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地の１バッグ当たりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。１００．０ｍＬのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を等分した。ＩＬ－２をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）に追加した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。ステージＢａｘａポンプ。培地を配合することを準備した。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）＋ＩＬ－２をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2．完全なＣＭ４の１６日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【２６０９】

１６日目　ＲＥＰ分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％CO_2。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。１Ｌの移送パックを準備し、ＴＩＬ懸濁液としてラベル付けし、１Ｌの重量を量った。

【２６１０】
Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳの減容。約４．５Ｌの培養上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒに移した。
【２６１１】
ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。
【２６１２】
ＴＩＬ採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。
【２６１３】
ＴＩＬ採取。ＴＩＬ懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。ＴＩＬを含む移送パックを熱融着した。上清を含む１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。
【２６１４】
無菌性及びＢａｃＴ試験サンプリング。調製したＢａｃＴラベル付けされた１５ｍＬのコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。ＢＳＣ内で、各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。
【２６１５】
マイコプラズマ試料を取り出した。３ｍＬシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬを取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬコニカルチューブに入れた。
【２６１６】
播種用の移送パックを準備した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をＢＳＣから取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。ＴＩＬ懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。５．０ｍＬを差し引いた総ＴＩＬ細胞体積が試験のために取り出された。
【２６１７】
総生ＴＩＬ細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種するＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの最大数は５であった。播種するフラスコの計算された数が５つを超えた場合、５つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。
【２６１８】
二次培養用のフラスコの数を計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる２つのＧ－ＲＥＸ－５００Ｍフラスコ毎に「ＣＭ４の１６日目培地」の１つの１０Ｌバッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第１のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを充填した。培地をポンプで注入するように準備し、４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しいＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が５つを超える場合、５つのみが細胞懸濁液の体積全

体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。ポンプで注入するためのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターからＴＩＬを取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。（プロセス注記５．１１に従って）「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。ＴＩＬ懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【２６１９】

フラスコにＴＩＬ懸濁液を播種した。計算されたＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【２６２０】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５　％　CO_2．フラスコをインキュベートした。

【２６２１】

２２日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出す時間範囲を決定した。

【２６２２】

２２日目　洗浄緩衝液の調製１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣ内で、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグに取り付けた。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣから外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される２つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコ毎に、１つの１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅを３０００ｍＬバッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、３０００ｍＬのＯｒｉｇｅｎバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン２５％を３０００ｍＬのバッグに追加した。１２０．０ｍＬの最終体積のヒトアルブミン２５％を取得する。

【２６２３】

ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、５．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を取り出した。ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。

【２６２４】

等分されたＣＲＦブランクバッグＬＯＶＯ洗浄緩衝液。１００ｍＬのシリンジを使用して、無針注入ポートから７０．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を引き上げた。

【２６２５】

すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×10^6ＩＵ／ｍＬ））を解凍した。５０μＬのＩＬ－２ストック（６×10^6ＩＵ／ｍＬ）を「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。

【２６２６】

凍結保存調製。５つのクライオカセットを２～８℃に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【２６２７】

細胞計数希釈液を調製した。ＢＳＣ内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の別個の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。４つのクライオバイアルをバイアル番号（１～４）でラベル付けした。使用されるＢＳＣの下でバイアルを保存した。

【２６２８】

２２日目　ＴＩＬ採取インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５％±１．５％．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコを取り外した。ＴＩＬ収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約４．５Ｌの上清をＧ－ＲＥＸ５０

０ＭＣＳから上清バッグに移した。
【２６２９】
ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。ＴＩＬ採取。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬの収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じ、すべてのクランプが閉じていることを確実にした。細胞懸濁液をＬＯＶＯソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。
【２６３０】
細胞計数を行った。ＮＣ－２００及びプロセス注記５．１４を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。ＬＯＶＯソースバッグの重量を量った。総生ＴＩＬ細胞を計算した。総有核細胞を計算した。
【２６３１】
マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。
【２６３２】
「ＴＩＬ　Ｇ－ＲＥＸ採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅを取り付けた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが取り付けられていることを検証し、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを確認した。
【２６３３】
最終製剤及び充填標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのＣＳ－１０及びＬＯＶＯ洗浄緩衝液の体積を計算した。ＣＲＦブランクを調製した。
【２６３４】
最終製品に追加するＩＬ－２の体積を計算した。所望される最終ＩＬ－２濃度（ＩＵ／ｍＬ）－３００ＩＵ／ｍＬ。ＩＬ－２作業ストック：　６　×　１０４　ＩＵ／ｍＬ．
接続装置を組み立てた。４Ｓ－４Ｍ６０をＣＣ２細胞接続に滅菌溶接した。ＣＳ７５０クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。ＣＳ－１０バッグを４Ｓ－４Ｍ６０のスパイクに溶接した。ＩＬ－２とともにＴＩＬ調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　６×１０４」アリコートから決定されたＩＬ－２の量を取り出した。配合されたＴＩＬバッグをラベル付けした。配合されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＣＳ１０を追加した。シリンジを交換した。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬのシリンジに引き込み、装置上の６０ｍＬシリンジを交換した。ＣＳ１０を追加した。ＣＳ－７５０バッグを準備した。細胞を分注した。
【２６３５】
最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を５０ｍＬコニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。
【２６３６】
目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグ

を低温パック上で、または２～８℃で保持した。

【２６３７】

細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、２．０ｍＬの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように１５ｍＬコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：１つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。ＩＦＮ－γを計算した。最終製品バッグを熱融着した。

【２６３８】

以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。

【２６３９】

【表４８】

表 47.試料計画。

試料	容器の数	各々に追加する試料体積	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
IFN-γ	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5mL	2mL クライオバイアル

【２６４０】

無菌性及びＢａｃＴ試験。試験試料採取。ＢＳＣ内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。

【２６４１】

最終製品の凍結保存。制御速度冷凍庫（ＣＲＦ）を準備した。ＣＲＦが設定されていることを検証した。ＣＲＦプローブを設定した。最終製品及び試料をＣＲＦに入れた。４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦ実行を進めるために必要な時間を決定した。ＣＲＦが完了し、保管された。実行の完了後にＣＲＦを停止させた。カセット及びバイアルをＣＲＦから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相ＬＮ２に移した。保管場所を記録した。

【２６４２】

最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目ＲＥＰのＣＤ３＋細胞の決定、（２２日目）グラム染色法（ＧＭ

Ｐ）、（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌内毒素試験、（１６日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）、（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲによるマイコプラズマＤＮＡ検出（ＧＭＰ）、許容される外観属性、（２２日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）（２２日目）、（２２日目）ＩＦＮ－ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、ＴＩＬ製品を分析するために用いられる。

【２６４３】

実施例８：ＧＥＮ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態

０日目

腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。５ｍＬのゲンタマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）を５００ｍＬボトルのＨＢＳＳに添加した。５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、ＯＫＴ３希釈に使用する１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで３７℃で保管するか、または凍結させた。３７℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞をカウントした。

【２６４４】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、5×10^{4}～5×10^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が1×10^{9}細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、1×10^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加した。

【２６４５】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬの腫瘍洗浄培地をＯＫＴ３アリコート（１００μＬ）に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、第２のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積２Ｌに調整した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【２６４６】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。０日目：１５μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中３０ｎｇ／ｍＬ～６０μＬ最大約１アリコート。

【２６４７】

５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした６ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地をさらなる使用のために利用可能にした。５０ｍＬの腫瘍洗浄培地を、各１００ｍｍペトリ皿に追加した。

【２６４８】

解剖皿のふたの下の定規を参照として使用して、腫瘍を２７mm^{3}断片（３×３×３ｍｍ）に解剖した。６０個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを調製した（一般に、１フラスコ当たり６０個の断片）。

【２６４９】

断片チューブ１～断片チューブ４とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を計算した。

【２６５０】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳを播種する。Ｄ０（０日目）とラベル付けする。

【２６５１】

Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ中の培養物への腫瘍断片の追加滅菌条件下で、腫瘍断片培養

物（Ｄ０）１とラベル付けしたＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ及び断片チューブとラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ１を回転させ、同時にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、回転している間にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに追加した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに移送された断片の数を記録した。

【２６５２】

断片がＧＲＥＸフラスコの底に配置された時点で、７ｍＬの培地を吸引し、７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。拡張された特徴付け用の５つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで－２０℃で保管した。

【２６５３】

１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコ毎に繰り返す。

【２６５４】

７日目～８日目

フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に３７℃の水浴中で３～５分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の最適範囲は、５×１０４～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。

【２６５５】

総生フィーダー細胞数が２×１０^{9}細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、２×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに追加した。

【２６５６】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬのＨＢＳＳを１００μＬのＯＫＴ３アリコートに移す。上下に３回ピペッティングして混合する。２つのアリコートを調製した。

【２６５７】

ＯＫＴ３製剤の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬバイアル当たり約１０×アリコート。－８０℃で保管した。７日目／８日目：３０μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中６０ｎｇ／ｍＬ～１２０μｌ最大約２アリコート。

【２６５８】

シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべて添加されたことを確認した。培地量を合計２Ｌに調整した。第２のＯＫＴ３アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【２６５９】

フィーダー細胞懸濁液を含むＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコの準備。０日目に生成されたＧ－ＲＥＸフラスコの数に従って処理するためにＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を記録した。Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベーターから取り出し、第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。

【２６６０】

フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：１本の１０ｍＬシリンジをＧ－ＲＥＸ１００フラスコに接続し、５ｍＬの培地を引き上げた。５つの１ｍＬアリコート（拡張された特徴付け用に５ｍＬ）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特徴付け用に５つのアリコート（最終断片培養上清）を－２０℃で保管した。各Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコにラベル付けし、繰り返した。

フラスコの数に応じた、特徴付け用の５～２０×１ｍＬ試料：
５ｍＬ＝１フラスコ
１０ｍＬ＝２フラスコ
１５ｍＬ＝３フラスコ
２０ｍＬ＝４フラスコ
【２６６１】
フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳに播種し続け、Ｇ－ＲＥＸ１００　ＭＣＳフラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに重量で５００ｍＬの第２のフィーダー細胞バッグを重力移送し（１ｇ＝１ｍＬと想定）、量を記録した。７日目培養とラベル付けし、Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコ毎に繰り返した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。
【２６６２】
１０～１１日目
第１のＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、１０ｍＬシリンジを使用して７ｍＬの前処理培養上清を取り出した。７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。
【２６６３】
フラスコを注意深く混合し、新たな１０ｍＬシリンジを使用して１０ｍＬの上清を取り出し、Ｄ１０／１１マイコプラズマ上清とラベル付けした１５ｍＬのチューブに移す。
【２６６４】
フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。
１フラスコ＝４０ｍＬ
２フラスコ＝２０ｍＬ／フラスコ
３フラスコ＝１３．３ｍＬ／フラスコ
４フラスコ＝１０ｍＬ／フラスコ
【２６６５】
合計４０ｍＬをすべてのフラスコから取り出し、「１０／１１日目ＱＣ試料」とラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保管すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。
【２６６６】
必要になるまで－２０℃以下で拡張された特徴付けのために５つのアリコート（前処理培養上清）を保管した。１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの前処理培養上清を接種した。
【２６６７】
細胞懸濁液をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの内容物をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、一度に約１００ｍＬの液体移送を監視した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの容量が５００ｍＬに低減したとき、移送を停止した。
【２６６８】
移送ステップ中、１０ｍＬシリンジを使用し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳからシリンジに１０ｍＬの細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。１つのフラスコのみの場合：２つのシリンジを使用して合計２０ｍＬを取り出した。フラスコが２つの場合：１フラスコ当たり１０ｍＬを取り出した。フラスコが３つの場合：１フラスコ当たり７ｍＬを取り出した。フラスコが４つの場合：１フラスコ当たり５ｍＬを取り出した。細胞懸濁液を１本の一般的な５０ｍＬのコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及びＱＣ試料までインキュベーター内で保管する。ＱＣに必要な細胞の総数は、約２０ｅ６細胞であった：４×０．５ｍＬの細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。
【２６６９】
アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、またはＩＦＮ－γもしくはグランザイムＢアッセイのための最小１０×１０^{6}細胞
マイコプラズマのための１×１０^{6}細胞
ＣＤ３＋／ＣＤ４５＋のためのフローサイトメトリーのための５×１０^{6}細胞
【２６７０】
Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。
【２６７１】
ＱＣ試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも１５×１０^{8}細胞が必要であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ（１×１０^{6}細胞／平均生存濃度）、フロー（５×１０^{6}細胞／平均生存濃度）及びＩＦＮ－ｇアッセイ（５×１０^{6}細胞～１×１０^{6}細胞を含み、８～１０×１０^{6}細胞が、ＩＦＮ－γアッセイに必要である。
【２６７２】
１０×１０^{6}細胞／ｍＬで凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイアルの数を計算した。
【２６７３】
１６～１７日目
洗浄緩衝液の調製（１％　ＨＳＡ　Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ　Ａ）。ＨＳＡ及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅを５Ｌバッグに移して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積１２５ｍＬの２５％ＨＳＡを５Ｌバッグに移した。１０ｍＬまたは４０ｍＬの洗浄緩衝液を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０４ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した（ＩＬ－２を事前に調製した場合は１０ｍＬ、ＩＬ－２を新たに調製した場合は４０ｍＬ）。
【２６７４】
Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ＋１％　ＨＳＡに添加する再構成ＩＬ－２の量を計算した：再構成ＩＬ－２の量＝（ＩＬ－２の最終濃度×最終量）／ＩＬ－２の比活性（標準アッセイに基づく）。ＩＬ－２の最終濃度は、６×１０４ＩＵ／ｍＬであった。最終体積は、４０ｍＬであった。
【２６７５】
再構成ＩＬ－２に必要なＩＬ－２の計算された初期体積を取り出し、「ＩＬ－２　６×１０４ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した。事前に調製したアリコートから１００μＬのＩＬ－２　６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬを、１０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を含有する「ＩＬ－２　６×１０４ＩＵ／ｍＬ」とラベル付けしたチューブに追加した。
【２６７６】
約４５００ｍＬの上清をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべてのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコで繰り返した。
【２６７７】
６０ｍＬの上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。＋２～８℃で保管した。
【２６７８】
細胞収集細胞を計数した。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つの１５ｍＬコニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適な範囲は、５×１０４～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。（１：１０希釈が推奨された）。１：１０希釈の場合、事前に調製した４５００μＬのＡＩＭ Ｖに、５００μＬのＣＦを追加する。希釈倍率を記録した。
ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前（生＋死）を計算した＝
平均総細胞
濃度（ＴＣ濃度ＬＯＶＯ前）
（生＋死）
Ｘ
ソースバッグの体積

ＴＶＣ（総生細胞）ＬＯＶＯ前（生）を計算した＝
平均総生細胞
濃度（ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前）
（生）
Ｘ
ＬＯＶＯソースバッグの体積
【２６７９】
総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}超であった場合、５×１０^{8}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。５×１０^{8}÷平均ＴＣ濃度（ステップ１４．４４）＝取り出す体積
【２６８０】
総細胞（ＴＣ）数が≦５×１０^{9}以下であった場合、４×１０^{6}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。４×１０^{6}÷平均ＴＣ濃度＝取り出す体積。
【２６８１】
総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、１５０×１０^{9}生細胞の保持を可能にすべきである。ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前５×１０^{8}もしくは４×１０^{6}を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。
【２６８２】
バッグに残っている残りの総細胞を計算した。ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前を計算した。［平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのＴＣ　ＬＯＶＯ前］を計算した。
【２６８３】
残存する細胞の総数に従って、表４８の対応するプロセスを選択する。
【２６８４】
【表４９】

表４８．セルの総数。

総細胞：	保持液（ｍＬ）
０＜総細胞≦３１×１０^{9}	１１５
３１×１０^{9}＜総細胞≦７１×１０^{9}	１６５
７１×１０^{9}＜総細胞≦１１０×１０^{9}	２１５
１１０×１０^{9}＜総細胞≦１１５×１０^{9}	２６５

【２６８５】
使用したプロセスに対応して添加するＩＬ－２の量を選択する。次のように計算された体積：保持量×２×３００ＩＵ／ｍＬ＝必要とされるＩＬ－２のＩＵ。必要なＩＬ－２のＩＵ／６×１０４ＩＵ／ｍＬ＝ＬＯＶＯ後バッグに追加するＩＬ－２の体積。添加したすべての体積を記録した。さらなる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。
【２６８６】
細胞製品を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。
【２６８７】
得られたクライオバイアル試料に対して、内毒素、ＩＦＮ－γ、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。

【２６８８】
実施例９：ＧＥＮ２及びＧＥＮ３の例示的なプロセス
この実施例は、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスを示す。Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスのＴＩＬは、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスのプライミングによる第１の拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、放射線照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。
【２６８９】
Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製品の製造は、２つの相からなる：１）急速拡張前（ＲＥＰ前）及び２）急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）。ＲＥＰ前中に、切除腫瘍を、各寸法２～３ｍｍの５０個以下の断片に切断し、血清含有培養培地（１０％ＨｕＳＡＢを補充したＲＰＭＩ１６４０培地）及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で１１日間培養した。１１日目にＴＩＬを採取し、大規模二次ＲＥＰ拡張に導入した。ＲＥＰは、５日間の３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を補充した５Ｌ体積のＣＭ２中の１５０μｇのモノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）を装填した５×１０^{9}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の共培養におけるＲＥＰ前由来の２００×１０^{6}個以下の生細胞の活性化からなる。１６日目に、培養物の体積を９０％減少させ、細胞画分を１フラスコ当たり１×１０^{9}個以上の生リンパ球で複数のＧ－ＲＥＸ－５００フラスコに分割し、ＣＭ４で５ＬにＱＳする。ＴＩＬをさらに６日間インキュベートする。ＲＥＰを２２日目に採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。
【２６９０】
Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製品の製造は、３つの相からなる：１）プライミングによる第１の拡張プロトコル、２）急速な第２の拡張プロトコル（急速拡張相またはＲＥＰとも称される）、及び３）継代培養分割。プライミングによる第１の拡張ＴＩＬ増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法２～３ｍｍ以下の１２０個以下の断片に切断した。プライミングによる第１の拡張の０日目に、ＯＫＴ－３を装填したおよそ２．５×１０^{8}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞のフィーダー層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々内のおよそ１００ｃｍ^{2}の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が５００ｍＬの血清含有ＣＭ１培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む３つの１００ＭＣＳ容器に分布し、その中で７日間培養した。７日目に、ＯＫＴ－３を負荷したおよそ５×１０^{8}個の同種異系の放射線照射されたＰＢＭＣフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、５００ｍＬのＣＭ^{2}培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０μｇのＯＫＴ－３で培養することによってＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始を、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３を装填したフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器内のプライミングによる第１の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移送によってより大きい容器にスケーリングし、移し（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）、追加の４ＬのＣＭ４培地を添加するプロセスステップを含めた。１６日目にＲＥＰ細胞を採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。
【２６９１】
全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、よりスケーラブルであり、かつ簡単に修正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。
【２６９２】

【表５０】

表 49.例示的な Gen2 及び例示的な Gen3 製造プロセスの比較

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前-0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G-REX-100MCS　11 日 1L の CM1 培地 +　IL-2　(6000　IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つのフラスコに均等に分割した。1 つのフラスコ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 500mL の CM1 培地中で 7 日間 +　IL-2　(6000　IU/mL) 2.5×10^{8} フィーダー細胞/フラスコ 15ug　OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に指向する、11 日目、 $<200\times10^{6}$　TIL (1)5L　CM^{2} 培地中の G-REX-500MCS IL-2　(3000　IU/mL) 5×10^{9} フィーダー細胞 150ug　OKT-3	REP に指向する、7 日目、すべての細胞、同じ G-REX-100MCS 500CM^{2} 培地を添加する IL-2　(6000　IU/mL) 5×10^{8} フィーダー細胞/フラスコ 30ug の OKT-3/フラスコ
TIL の増殖またはスケールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G-REX-500MCS に分割する 4.5L　CM4 培地+IL-2(3000IU/mL) $\geqq1\times10^{9}$　TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G-REX-500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添加する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する、 LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO 自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【２６９３】

０日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を３回洗浄し、断片をランダム化し、２つのプールに分けた（プロセス毎に１つのプール）。Ｇｅｎ２プロセスの場合、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を含有する１ＬのＣＭ１培地を含む１つのＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を含有する５００ｍＬのＣＭ１を含む１つのＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。Ｇ－ＲＥＸ　Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを９０％減容させたＧｅｎ２プロセスの場合、収集した細胞懸濁

液を新たなＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移して、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）＋５×１０^{9}フィーダー細胞及びＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含有するＣＭ２培地中で１１日目にＲＥＰを開始した。細胞が拡張し、プロトコルに従って１６日目にＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を有するＣＭ４培地を含む複数のＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスの場合、ＲＥＰの開始は７日目に起こり、同じＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳをＲＥＰの開始に使用した。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）及び５×１０^{8}個のフィーダー細胞を３０ｕｇのＯＫＴ－３とともに含有する５００ｍＬのＣＭ^{2}培地を各フラスコに添加した。９～１１日目に、培養をスケールアップした。Ｇ－ＲＥＸ１００Ｍの全体積（１Ｌ）をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含有する４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【２６９４】

比較には、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４及びＬ４０５５）と１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）の３つの異なる腫瘍を含めた。

【２６９５】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、ＣＭ１培地（培養培地１）、ＣＭ２培地（培養培地２）、及びＣＭ４培地（培養培地４）を事前に調製し、４℃で保持した。ＣＭ１培地及びＣＭ^{2}培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。

【２６９６】

Ｌ４０５５腫瘍の場合、ＲＥＰの開始及びスケールアップ時に、培地を事前に３７℃で最大２４時間温めた。

【２６９７】

結果達成された生細胞の総数について、Ｇｅｎ３の結果はＧｅｎ２の３０％以内であった。Ｇｅｎ３最終製品は、再刺激後により高いＩＮＦ－γ産生を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、存在する固有の全ＣＤＲ３配列によって測定される、増加したクローンの多様性を示した。Ｇｅｎ３最終製品は、より長い平均テロメア長を示した。

【２６９８】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、２つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総ＲＥＰ前細胞（ＴＶＣ）を採取し、Ｇｅｎ２プロセスの場合は１１日目に、Ｇｅｎ３プロセスの場合は７日目に計数した。２つのＲＥＰ前群を比較するために、細胞計数を培養物中に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表５０に示されるように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して、１断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。ＲＥＰ前ＴＶＣを７で割り、その後、１１を掛けて計算した、１１日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【２６９９】

【表５１】

表 50.REP 前の細胞計数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M10^{8}5T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
REP 前における断片当たりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の REP 前における Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

*L4055、濾過されていない培地。

【２７００】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの場合、ＴＶＣをプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、２２日目（Ｇｅｎ２）及び１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣ数を確立した。その後、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡張を、採取したＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算した。表５１に示されるように、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３を比較すると、倍率拡張はＬ４０５４の場合では同様であり、Ｌ４０５５の場合、倍率拡張はＧｅｎ２プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地をＲＥＰ開始日の前に２４温めた。Ｍ１０８５Ｔの場合のＧｅｎ３でもより高い倍率拡張が観察された。ＲＥＰ　ＴＶＣを１６で割り、その後、２２を掛けて計算した、２２日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【２７０１】

【表５２】

表 51.TIL 最終製品の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍 ID	L4054		L4055		M10^{8}5T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC/断片(採取時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張　採取/REP 開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
22 日目の REP 採取における Gen3 外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

*L4055、濾過されていない培地。

【２７０２】

表５２：　ＴＩＬ最終製品の生存率％：採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【２７０３】

採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ製品を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【２７０４】

【表５３】

表 52.REP の生存率(TIL 最終製品)

腫瘍 ID	L4054		L4055		M10^{8}5T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【２７０５】

１フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞計数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つまたは３つのフラスコに播種するの

に十分な大きさであるという予想に基づいた。
【２７０６】
【表５４】

表 53.Gen3 プロセスでのフルスケール 2 及び 3 フラスコへの外挿推定細胞数計算

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3 プロセス	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ	2 フラスコ	3 フラスコ
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【２７０７】
免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型マーカー比較。３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５、及びＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡張を受けた。採取時に、ＲＥＰ　ＴＩＬ最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞パーセンテージは９０％超であった。
【２７０８】
Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから採取したＴＩＬと比較して、より高いＣＤ８及びＣＤ２８発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスは、より高いＣＤ４＋パーセンテージを示した。
【２７０９】
Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセス由来のＴＩＬと比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。
【２７１０】
活性化及び疲弊マーカーを２つの腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５由来のＴＩＬで分析して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３　ＴＩＬ拡張プロセス由来の最終ＴＩＬ製品を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２プロセスとの間で同等であった。
【２７１１】
再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取日、Ｇｅｎ２の場合は２２日目、Ｇｅｎ３の場合は１６日目に、ＴＩＬは、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、コーティングした抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｍ１０８５Ｔでの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７ビーズを使用して行った。すべての条件で再刺激の２４時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析を、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した３つの腫瘍で、Ｇｅｎ３プロセス由来のＩＦＮγのより高い産生が観察された。
【２７１２】
培養培地中のＩＬ－２レベルの測定Ｇｅｎ２プロセスとの間のＩＬ－２消費量を比較するために、腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５で、ＲＥＰの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、Ｒ＆Ｄ製の定量化ＥＬＩＳＡキットによって測定した。一般的な傾向は、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスではＩＬ－２濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってＧｅｎ３のＲＥＰ開始時のＩＬ－２濃度がより高い（６０００ＩＵ／ｍＬ）ことに起因する可能性がある。
【２７１３】
代謝基質及び代謝物分析Ｄ－グルコース及びＬ－グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ＡＴＰの形態でエネルギーを産生するためにミトコンドリアによ

って利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

【２７１４】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地を、Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスの両方で、ＲＥＰ開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Ｇｅｎ２の場合は１１日目、１６日目、及び２２日目、Ｇｅｎ３の場合は７日目、１１日目、及び１６日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度についてＣＥＤＥＸバイオアナライザーで分析した。

【２７１５】

Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。Ｌ－グルタミンの分解に対抗するために、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を補充した。２つの腫瘍株では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中のＬ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の減少、ならびにＲＥＰ全体でアンモニアの増加を示した。Ｇｅｎ２アームでは、Ｌ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

【２７１６】

テロメアは、Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによって繰り返される。Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＬ４０５４及びＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２と同等のテロメア長を示した。

【２７１７】

ＣＤ３分析各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の採取したＴＩＬ最終製品をサンプリングし、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

【２７１８】

表５４は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５４における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１９９個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。

【２７１９】

【表５５】

表 54. L4054 の Gen2 プロセスと Gen3 プロセスとの間で共有される uCDR3 配列の比較。

# uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4054	8915	4355(48.85%)	205	199(97.07%)
Gen3-L4054	-	18130	-	223

【２７２０】

表５５は、採取したＴＩＬ細胞製品のＬ４０５５における共有される固有のＣＤＲ３配

列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１８３３個の配列がＧｅｎ３最終製品とＧｅｎ２最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３最終製品と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。

【２７２１】

【表５６】

表 55. L4055 の Gen2 プロセスと Gen3 プロセスとの間で共有される uCDR3 配列の比較。

# uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4055	12996	6599(50.77%)	1843	1833(99.45%)
Gen3-L4055	-	27246	-	2616

【２７２２】

ＣＭ１及びＣＭ^{2}培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスで使用するまで４℃で保持した。

【２７２３】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日に、腫瘍Ｌ４０５５の場合、培地を３７℃で事前に２４時間温めた。

【２７２４】

これらのプロセスで収集した上清中にＬＤＨは測定されなかった。

【２７２５】

Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞計数を、Ｋ２　ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ細胞カウンターを使用して実行した。

【２７２６】

腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用のＴＩＬ製品、テロメア長、及びＣＤ３－ＴＣＲｖｂ分析などの試料は入手できなかった。

【２７２７】

結論この実施例では、３つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡張された表現型特徴付け、ならびにＧｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセス間の培地消費に関して比較する。

【２７２８】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。

【２７２９】

ＲＥＰ前採取は、７日目ではなく１１日目に起こり、ＲＥＰ採取は、１６日目ではなく２２日目に起こると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＴＶＣの数値が近いことを示し、初期活性化により、ＴＩＬの成長が増強したことを示す。

【２７３０】

Ｇｅｎ３プロセスでの追加フラスコ（２つまたは３つ）の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスの１６日目の採取時にＴＶＣで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培養物の早期活性化がＴＩＬ処理時間を短縮したことを示す。

【２７３１】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。

【２７３２】

表現型特徴付けに関して、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＧｅｎ３プロセスでの３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋及びＣＤ２８＋発現が観察された。

【２７３３】

Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。

【２７３４】

Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの持続期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。

【２７３５】

ＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）産生は、分析した３つの腫瘍において、Ｇｅｎ２と比較してＧｅｎ３最終製品において３倍高かった。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスがより高機能でより強力なＴＩＬ製品を生成したことを示し、Ｇｅｎ３でのＣＤ８及びＣＤ２８発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現へのＧｅｎ３の肯定的な傾向を示唆した。

【２７３６】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３との間のＴＩＬ最終製品のテロメア長は同等であった。

【２７３７】

グルコース及び乳酸塩レベルは、Ｇｅｎ２最終製品とＧｅｎ３最終製品との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びＧｅｎ２と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Ｇｅｎ３プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。

【２７３８】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してほぼ２倍の処理時間の短縮を示し、これにより、Ｇｅｎ３プロセスによって拡張されたＴＩＬ製品の売上原価（ＣＯＧ）の有意な削減がもたらされるであろう。

【２７３９】

ＩＬ－２消費は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費の一般的な傾向を示しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高かった。

【２７４０】

Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【２７４１】

Ｇｅｎ３プロセスを使用して、ＲＥＰ前の０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３の追加により、ＴＩＬの初期活性化が可能になり、ＴＩＬ成長が可能になった。

【２７４２】

表５６は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。

【２７４３】

【表５７】

表 56.例示的な Gen3 プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen2 の実施形態	プロセス Gen3 の実施形態
REP 前-0 日目	50 個以下の断片 1X　G-REX-100MCS 1L 培地 IL-2　(6000　IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 つ以下のフラスコ 2L 以下の培地(500mL/フラスコ) IL-2　(6000　IU/mL) 2.5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug の OKT3/フラスコ
REP 開始	REP に指向した新鮮な TIL 11 日目 $200e^6$ 個以下の生細胞 5×10^9 フィーダー細胞 G-REX-500MCS 5L　CM^2 培地+IL-2(3000IU/mL) 150μg の OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10^8 フィーダー細胞 30μg の OKT3/フラスコ G-REX-100MCS 500mL 培地+IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養またはスケールアップ	5 つ以下の　G-REX-500MCS 1×10 個以下の生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	4 つ以下の　G-REX-500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L/フラスコ 10~11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存した製品 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN_2 中 300IU/mL の IL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【２７４４】

実施例１０：例示的なＧＥＮ３プロセス（ＧＥＮ３．１とも称される）

この実施例は、「ＴＩＬ拡張のためのＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Ｇｅｎ３プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞（ＴＶＣ）出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Ｇｅｎ３実施形態をさらなる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例ではＧｅｎ３．１と称する。

【２７４５】

いくつかの実施形態では、Ｇｅｎ３．１　ＴＩＬ製造プロセスは、以下の４つのオペレーター介入を有する。

１．腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの０日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約３×３ｍｍ（合計で最大２４０個の断片）を生成し、１～４つのＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ内で培養した。各フラスコは、最大６０個の断片、６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ３、及び２．５×１０^{8}個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充した５００ｍＬのＣＭ１またはＤＭ１培地を含んだ。培養物を３７℃で６～８日間インキュベートした。

２．ＴＩＬ培養再活性化：７～８日目に、いずれの場合も６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ３、及び５×１０^{8}個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充したＣＭ^{2}またはＤＭ１培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を３７℃で３～４日間インキュベートした。

３．培養のスケールアップ：１０～１１日目に生じる。培養のスケールアップ中に、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳの全内容物を、いずれの場合も３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４ＬのＣＭ４またはＤＭ２を含むＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに移した。採取するまでフラスコを３７℃で５～６日間インキュベートした。

４．採取／洗浄／製剤化：１６～１７日目に、フラスコを減容させ、プールする。細胞を濃縮し、１％ＨＳＡを含有するＰｌａｓｍａＬｙｔｅ Ａ ｐＨ７．４で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０と１：１の比で配合し、３００ＩＵ／ｍＬの最終濃度までｒｈＩＬ－２を補充した。

【２７４６】

ＤＰを制御された速度の凍結で凍結保存し、気相液体窒素中で保管した。＊完全標準ＴＩＬ培地１、２、または４（ＣＭ１、ＣＭ２、ＣＭ４）は、上記のように、合成培地（ＤＭ１またはＤＭ２）と称されるＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞無血清拡張培地の代用となり得た。

【２７４７】

プロセスの説明０日目に、腫瘍を３回洗浄し、その後、３×３×３の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、３つのプールに分割した。１つのランダム化断片プールを各群に導入し、３つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。

【２７４８】

全ＴＩＬ拡張プロセスにわたって、腫瘍Ｌ４０６３拡張を標準培地で行い、腫瘍Ｌ４０６４拡張を合成培地（ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。

【２７４９】

ＣＭ１完全培地１：２ｍＭ ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、１０％ヒトＡＢ血清、ゲンタマイシン（５０ｕｇ／ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（５５μＭ）を補充したＲＰＭＩ＋グルタミン。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２７５０】

ＣＭ^{2}完全培地２：５０％ ＣＭ１培地＋５０％ ＡＩＭ－Ｖ培地。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２７５１】

ＣＭ４完全培地４：ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）を補充したＡＩＭ－Ｖ。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地製剤。

【２７５２】

ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）を補充したＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。

【２７５３】

ＤＭ１： ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌ

ｌ　ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ。６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【２７５４】

ＤＭ２：　ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ。３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終製剤。

【２７５５】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち、完全培地（ＣＭ）及び合成培地（ＤＭ）を事前に調製し、使用前日まで４℃で保持し、プロセス日前に事前に最長２４時間にわたってインキュベーター内で３７℃で温めた。

【２７５６】

ＴＩＬ培養再活性化は、両方の腫瘍で７日目に起こった。スケールアップは、Ｌ４０６３では１０日目、Ｌ４０６４では１１日目に起こった。両方の培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【２７５７】

達成した結果Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスの細胞計数及び生存率％を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

【２７５８】

腫瘍毎に、断片を同数の３つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。３つの異なるプロセスについて、総生細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、７日目の再活性化のＴＶＣ、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップのＴＶＣ、及び１６／１７日目の採取時のＴＶＣとして決定した。

【２７５９】

７日目及び１０／１１日目の細胞計数をＦＩＯで測定した。倍率拡張を、１６／１７日目の採取時のＴＶＣを７日目の再活性化日のＴＶＣで割ることによって計算した。３つの群を比較するために、採取日のＴＶＣを、０日目の培養物中に添加した断片の数で割って、１断片当たりの生細胞の平均を計算した。

【２７６０】

Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、細胞計数及び生存率アッセイを行った。Ｇｅｎ３．１－試験プロセスは、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０プロセスよりも多くの１断片当たりの細胞数をもたらした。

【２７６１】

総生細胞数及び倍率拡張、プロセス中の生存率％再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率％を行った。１６／１７日目の採取日に、最終ＴＶＣを生存率％の放出基準と比較した。評価したすべての条件は、７０％の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

【２７６２】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終製品の表現型特徴付け。最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団パーセントは、すべての条件で、ＴＣＲα／β細胞、ＣＤ４＋細胞、及びＣＤ８＋細胞で一貫していた。

【２７６３】

ＲＥＰ　ＴＩＬの拡張表現型分析を行った。ＴＩＬ製品は、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０と比較してＧｅｎ３．１条件でより高いＣＤ４＋細胞パーセンテージを示し、両方の条件でＧｅｎ３．１条件と比較してＧｅｎ３．０でより高いＣＤ８＋集団由来のＣＤ２８＋細胞パーセンテージを示した。

【２７６４】

Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスから採取したＴＩＬは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞でのＣＤ２７及びＣＤ５６発現、ならびにＣＤ４＋ゲート細胞集団での同等のＣＤ２８発現と同等の表現型マーカーを示した。ＴＩＬ最終製品のメモリーマーカーの比較：

【２７６５】

１６日目に採取したＴＩＬの凍結試料を分析のために染色した。ＴＩＬメモリーステータスは、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。ＴＩＬ最終製品の活性化及び疲弊マーカーの比較：

【２７６６】

活性化及び疲弊マーカーは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞上でゲートされたＧｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。

【２７６７】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取したＴＩＬは、Ｌ４０６３及びＬ４０６４用のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｇｅｎ３．０プロセスと比較して、分析した２つの腫瘍で、より高いＧｅｎ３．１プロセスからのＩＦＮγ産生が観察された。

【２７６８】

培養培地中のＩＬ－２レベルの測定すべての条件及びプロセス間のＩＬ－２消費レベルを比較するために、細胞上清を、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）／１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。

【２７６９】

全体的なＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のＩＬ－２消費に関して同等であった。Ｌ４０６３及びＬ４０６４用に収集した使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析。

【２７７０】

代謝物分析使用済み培地の上清を、Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、すべての条件で、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取時に、Ｌ４０６３及びＬ４０６４から収集した。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。

【２７７１】

合成培地は、完全培地（２ｇ／Ｌ）と比較してより高いグルコース濃度４．５ｇ／Ｌを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でＧｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスにおいて同等であった。

【２７７２】

乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Ｇｅｎ３．０条件とＧｅｎ３．１条件との間、及び再活性化拡張に使用した２つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。

【２７７３】

いくつかの場合において、標準基礎培地は、２ｍＭのＬ－グルタミンを含有し、培養条件下でＬ－グルタミンのＬ－グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）で補充された。

【２７７４】

いくつかの場合において、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にＬ－グルタミンを含有せず、最終濃度が２ｍＭになるまでＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみで補充された。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）は、Ｌ－アラニンとＬ－グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でＬ－グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分解しない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低いが十分な濃度のＬ－グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。

【２７７５】
いくつかの場合において、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。Ｌ４０６４の場合、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。
【２７７６】
アンモニア濃度は、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、２ｍＭのグルタミン＋２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。さらに、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。３つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。
【２７７７】
Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによるテロメア反復：Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセス下でのＬ４０６３及びＬ４０６４のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（１３０１白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同等のテロメア長を示した。
【２７７８】
【２７７９】
ＴＣＲ　Ｖβレパートリー分析
各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、ＴＩＬ最終製品をＴ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。
【２７８０】
３つのパラメータを３つの条件間で比較した。
●固有のＣＤＲ３（ｕＣＤＲ３）の多様性指数
●ｕＣＤＲ３共有％
●ｕＣＤＲ３の上位８０％の場合：
○共有されるｕＣＤＲ３コピーの％を比較する
○固有のクロノタイプの頻度を比較する
【２７８１】
対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：９７５個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ３．１試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。
【２７８２】
対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞製品で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：２１６３個の配列がＧｅｎ３試験最終製品とＧｅｎ３．１試験最終製品との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。
【２７８３】
異なるプロセスについて、１６日目の採取時に収集した1×10^{6}個の細胞から特定された固有のＣＤ３配列の数。Ｇｅｎ３．１試験条件は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ３．０と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。
【２７８４】
シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックであり、両方の腫瘍に対するＧｅｎ３．１条件は、Ｇｅｎ３プロセスよりもわずかに高い多

様性を示し、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーが Ｇｅｎ３．０プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【２７８５】

追加として、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーは、腫瘍Ｌ４０６３及びＬ４０６４の両方でＧｅｎ３．０プロセスの対応するレパートリーと８７％を超える重複を示した。

【２７８６】

再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４の使用済み培地のＩＬ－２濃度の値は、期待値を下回った（Ｇｅｎ３．１対照及びＧｅｎ３．０条件と同様であった）。

【２７８７】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取できなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。

【２７８８】

結論０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３を含むＧｅｎ３．１試験条件は、Ｇｅｎ３．０及びＧｅｎ３．１対照と比較して、１６日目の採取時の細胞用量のＴＶＣがより高いことを示した。Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＶＣ最終製品は、Ｇｅｎ３．０よりも約２．５倍高かった。

【２７８９】

試験した腫瘍試料の両方について、０日目にＯＫＴ－３及びフィーダーを添加したＧｅｎ３．１試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、０日目に最大４つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、８０～１００×10^9ＴＩＬである可能性があった。

【２７９０】

最終ＴＩＬ製品の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Ｇｅｎ３．１試験とＧｅｎ３．０プロセスとの間で維持された。

【２７９１】

最終ＴＩＬ製品のＩＦＮ－γ産生は、分析した２つの腫瘍において、Ｇｅｎ３．０と比較して、０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１で３倍高く、Ｇｅｎ３．１プロセスが強力なＴＩＬ製品を生成したことを示唆する。

【２７９２】

試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地へのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。

【２７９３】

１１日目及び１０日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Ｇｅｎ３．０最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。

【２７９４】

０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１プロセスは、Ｇｅｎ３．０と比較して、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【２７９５】

図３２は、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地及びＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒ無血清培地を、Ｇｅｎ３最適化プロセスＴＩＬ拡張に使用することができる。ＣＴＳ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｒの場合、培地のＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を最終濃度４ｍＭに増加させるために無血清培地が推奨される。

【２７９６】
実施例１１：ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ１８を分泌する修飾されたＴＩＬの産生及び特徴付け
　この研究では、ＩＬ－１８を分泌する修飾されたＴＩＬを産生し、ＩＬ－１８の発現及び分泌を、最小限のヒトＩＬ－２プロモーターに連結されたＮＦＡＴ応答性エレメントを含むＮＦＡＴプロモーターを使用して制御する。修飾されたＴＩＬは、以下に記載されるように特徴付けられる。
【２７９７】
　分泌型ＩＬ－１８構築物。ＩＬ－１８配列は、例えば、図３４Ｂ及び３４Ｃに示されるように合成され、目的の遺伝子のＣａｓ９－ＧＦＰカセットを置き換えることによってｐＬｅｎｔｉウイルスベクターに挿入される。ｐＬｅｎｔｉウイルスベクターは、ＥＦ－１ａコアプロモーターによって駆動される遺伝子発現を有する自己不活性化レンチウイルスベクターである。レンチウイルスを作製するために、ｐＬｅｎｔｉベクター及びヘルパーベクター（ＶＳＶ－Ｇ、Ｇａｇ／Ｐｏｌ）を２９３Ｔ細胞に同時トランスフェクトした。ウイルス上清を２～３日目の培養上清から収集し、続いて超遠心分離して、ＴＩＬ形質導入のためにレンチウイルスを濃縮する。
【２７９８】
　分泌型ＩＬ－１８形質導入Ｐｒｅ－ＲＥＰ　ＴＩＬの発現及びシグナル伝達。ヒト腫瘍試料を約３ｍｍの小片に解剖し、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍｌ）を含有する推奨培養培地を含むＧｒｅｘ１０中で培養する。ＲＥＰ前細胞をＴｒａｎｓＡｃｔで２日間活性化し、続いてレンチウイルスを用いた遺伝子形質導入をさらに２日間行う。次いで、形質導入されたＲＥＰ前細胞を、放射線照射されたＰＢＭＣ、抗ＣＤ３抗体及び３，０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を用いたＲＥＰ拡張プロセスにおいて、さらに１１日間増殖させる。
【２７９９】
　細胞を洗浄し、さらに5日間インキュベートし、続いてフローサイトメトリー分析のために採取して、分泌型ＩＬ－１８発現細胞の発現を確認する。
【２８００】
　表面サイトカイン発現の検証後、Ｔ細胞の機能性を調べる。ＩＬ－２の存在下または非存在下で培養中で5日後に細胞増殖を追跡するために、ｐＳＴＡＴ５の細胞内染色のために、細胞を収集し、血清を一晩飢餓させることもできる。
【２８０１】
　ＲＥＰ細胞に対するＩＬ－１８の免疫調節効果を特徴付けるために、ゲーティングされたＣＤ８＋ＣＤ３＋Ｔ細胞及びＣＤ４＋ＣＤ３＋Ｔ細胞サブセットの両方で、新たに解凍されたＲＥＰ細胞を用いて表現型分析を行う。以下の発現を評価する：ＣＤ２７、ＰＤ１、ＴＩＭ３、ＣＤ６２Ｌ、ＴＯＸ、Ｔ－ｂｅｔ、ＣＤ３８、ＣＸＣＲ３、Ｅｏｍｅｓ、及びＣＤ２５。
【２８０２】
実施例１２：例示的な遺伝子形質導入プロセス
　ＲＥＰ前細胞を、１００万細胞／ｍｌの刺激培地の初期濃度でプレートする。刺激培地は、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＩＬ－７（２０ｎｇ／ｍｌ）を添加した、ＣＭ２培地中のＴｒａｎｓａＡＣＴ（１：１００）からなる。刺激の２日後、１Ｅ５細胞を、ＩＬ－１５（１０ｎｇ／ｍｌ）及びＩＬ－７（２０ｎｇ／ｍｌ）及びＬｅｎｔｉ－ｂｏｏｓｔｅｒ（１：１００）を含むＣＭ２培地で処理した４８ウェルプレートで、Ｒｅｔｒｏｎｅｃｔｉｏｎ（１：１００）に播種する。この後、４５分間で２０００ｇのスピンが続く。インキュベーター内で３７℃でさらに２日間培養した後、遺伝子形質導入されたＴＩＬ細胞を、１１日間のＲＥＰプロセスのためにさらに拡張する。
【２８０３】
実施例１３：ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ－１２を発現する修飾されたＴＩＬの産生及び特徴付け、ならびにＰＤ－１の発現の低下
　この研究では、膜アンカーされたＩＬ－１２免疫調節融合タンパク質及び内因性ＰＤ－

１発現を低減するための１つ以上のｓｈＲＮＡを有する修飾ＴＩＬを作製する。図３７は、膜アンカーされたＩＬ－１２（ＴｅＩＬ－１２）及びＰＤ－１　ｓｈＲＮＡの発現を可能にする例示的な核酸構築物を示す。図３７に示されるように、膜アンカーされた免疫調節性ＩＬ－１２の発現は、最小限のヒトＩＬ－２プロモーターに連結されたＮＦＡＴ応答性エレメントを含むＮＦＡＴプロモーターを使用して制御され、例えば、表５７を参照されたい。ｓｈＲＮＡは、ＰｏｌＩＩＩプロモーター（Ｕ６）の制御下にある。

【２８０４】

ウイルス調製及びＴ細胞形質導入

レンチウイルスを作製するために、テザリングされたサイトカイン遺伝子配列（表５７）及びＰＤ－１　ｓｈＲＮＡ（表５８）及びパッケージングヘルパーベクター（ＶＳＶ－Ｇ、Ｇａｇ／Ｐｏｌ）を含有するｐＬｅｎｔｉベクターを、２９３Ｔ細胞に同時トランスフェクトする。レンチウイルス上清を２～３日目の培養上清から収集し、続いて超遠心分離（１２０，０００ｇ）して、ＴＩＬ形質導入のためにレンチウイルスを濃縮する。Ｔ細胞形質導入の前に、ＲＥＰ前細胞をＴｒａｎｓＡＣＴ（１：１００）で２日間刺激する。１Ｅ５活性化されたＲＥＰ前細胞を、濃縮レンチウイルスでプレコーティングされた４８ウェルプレートのレトロネクチンに添加する。遺伝子形質導入の２日後、ＲＥＰ前細胞を、本明細書に記載の方法によるＲＥＰプロセスまたはさらなる表現型特性評価及び機能アッセイのために採取する。

【２８０５】

【表５８－１】

表 57-TeIL-12/shRNA 構築物の配列

構築物	DNA 配列
6XNFAT 結合モチーフ	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGA(配列番号300)
IL-2min プロモーター	CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG(配列番号 301)

【表５８－２】

TeIL-12	ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGCACT CCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTACC CCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGCCGGAGGAG GACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTGCTGGGCTCTGGT AAGACCTTAACCATCCAGGTCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACG TGTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGCCTGCTGCTCCTGCACAAG AAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGGATATCCTTAAAGACCAGAAGGAGCC CAAGAACAAAACCTTCCTGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGGCGCTT TACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTTCTCCGTGAAG TCTTCCAGGGGATCTTCTGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACC CTGTCGGCTGAGCGCGTCCGTGGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTG GAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGAGTCCTTGCCCATC GAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGAGAACTACACCTCC TCCTTCTTTATACGCGACATCATCAAGCCTGACCCCCCTAAAAACCTGCAGC TGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTATCCTGGGAGTACCCCG ACACCTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGT GCAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAAA CCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAACGCGAGCATCTCCGTACGGGCAC AGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTTCCGTGTTC TGGAGGAGGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACC CGGGTATGTTTCCTTGTCTGCACCACTCTCAGAACTTGCTCCGTGCCGTCTC GAATATGCTGCAGAAGGCCCGCCAGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAG TGAGGAGATCGATCATGAGGACATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGG AGGCTTGTCTGCCGCTGGAGTTGACAAAGAACGAGAGCTGCCTCAATAGCC GCGAGACTTCCTTCATCACCAACGGCTCCTGCCTCGCGAGCCGTAAGACCT CCTTTATGATGGCGCTGTGCCTGTCAAGTATCTACGAAGATCTGAAAATGT ATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGAACGCAAAACTCCTGATGGATCCCAAGC GCCAAATTTTCTTGGACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTGATGC AGGCCCTGAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGAGG AACCCGACTTTTACAAGACAAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTACACGCGT TCCGCATTCGGGCCGTGACCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTC GTCCGGCGGGGGGGGCTCCGGTGGGGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCAG GTGGCGGCGGCTCCGGCGGAGGTTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAA TCACTCTGATTTCCGTCAACGGAATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTG CTTTGCTCCCAGATGTAGAGAGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGA GAGCGTGAGGCCTGTGTGA(配列番号 302)

【表５８－３】

IRES	CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAA GGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGG CAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAG GGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAA GGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGAC CCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCA AAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCAGTGCC ACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCG TATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGAT CTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAA AAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAAC ACGATGATAA(配列番号 303)
U6 プロモーター	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTG TTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTAC AAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAA AATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTT CGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC(配列番号 304)

【２８０６】
【表５９】

表 58-PD-1　shRNA 配列

構築物	DNA 配列
PD-1 shRNA #1	GGATTTCCAGTGGCGAGAGAACTCGAGTTCTCTCGCCACTGGAAATCC (配列番号 305)
PD-1 shRNA #2	CATTGTCTTTCCTAGCGGAATCTCGAGATTCCGCTAGGAAAGACAATG (配列番号 306)
PD-1 shRNA #3	CAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCTCGAGCTCTCTTTGATCTGCGCCTTG (配列番号 307)
PD-1 shRNA #4	AAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTCGAGGCTCTCTTTGATCTGCGCCTT (配列番号 308)
PD-1 shRNA #5	ATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTCGAGTTTAGCACGAAGCTCTCCGAT (配列番号 309)
PD-1 shRNA #6	AGTATGCCACCATTGTCTTTCCTCGAGGAAAGACAATGGTGGCATACT (配列番号 310)
PD-1 shRNA #7	GGATTTCCAGTGGCGAGAGAACTCGAGTTCTCTCGCCACTGGAAATCC (配列番号 311)

【２８０７】

フローサイトメトリー
ＴＩＬ　ＴｅＩＬ－１２及びＰＤ－１の発現は、免疫蛍光染色及びフローサイトメトリー分析を使用して評価される。
【２８０８】
Ｔ細胞数及び生存率
ＴＩＬ拡張後にＲＥＰ細胞を採取する。生細胞数は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２細胞カウンターマシン（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して、ＡＯＰＩアッセイによって評価する。
【２８０９】
ＲＥＰ前及びＲＥＰプロセス
ヒト腫瘍試料を約３ｍｍの小片に解剖し、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍｌ）を含有する推奨培養培地を含むＧｒｅｘ１０中で培養する。１１日間の培養後、ＲＥＰ前細胞を２日間の活性化及び２日間のレンチウイルス形質導入のために採取する。次いで、形質導入されたＲＥＰ前細胞を、放射線照射されたＰＢＭＣ、抗ＣＤ３抗体及び３，０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を用いたＲＥＰ拡張プロセスにおいて、さらに１１日間増殖させる。
【２８１０】
上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、系及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。
【２８１１】
すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。
【２８１２】
本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【２８１３】
当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図１】

プロセス2A：ステップA～Eから約22日

1. ステップA

患者の腫瘍試料を取得する

2. ステップB

断片化及び第１の拡張

3日～14日

3. ステップC

第１の拡張から第２の拡張へと移行
ストレージ及び閉鎖系なし

4. ステップD

第２の拡張
IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞
閉鎖系

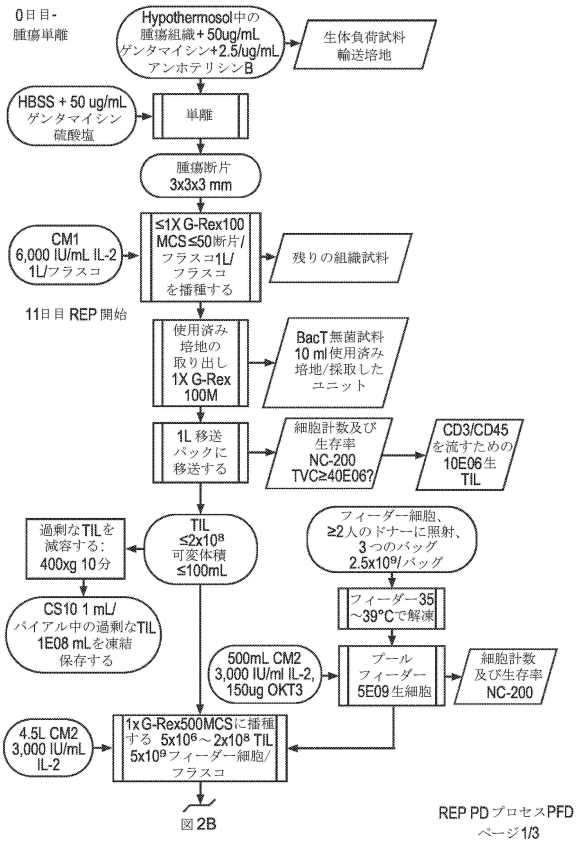
5. ステップE

ステップDからのTILを採取する
閉鎖系

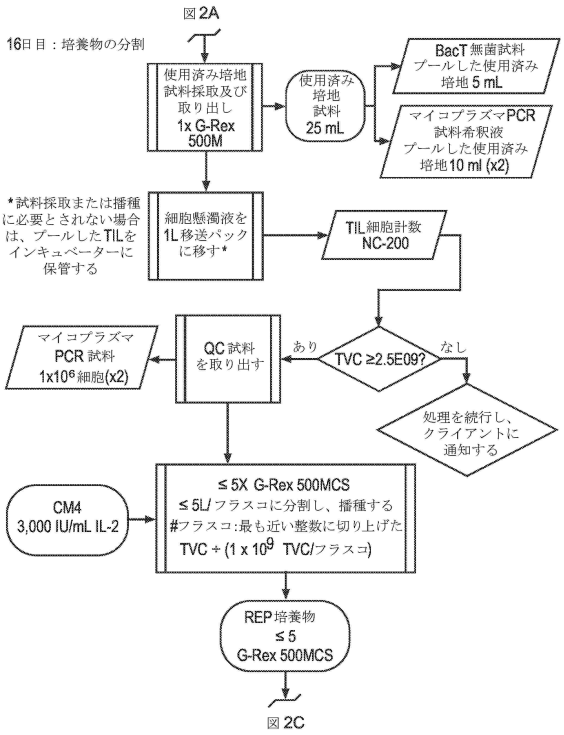
6. ステップF

最終製剤及び/または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図２Ａ】

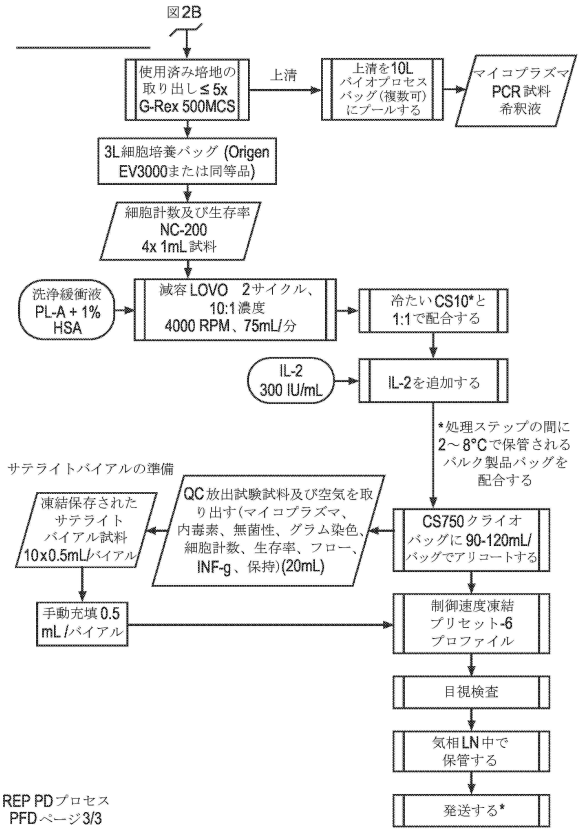


【図２Ｂ】



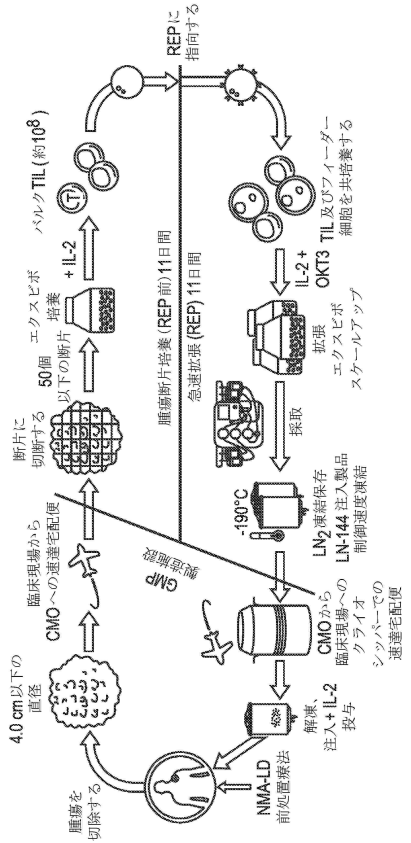
REP PD プロセス
PFD ページ 2/3

【図２Ｃ】

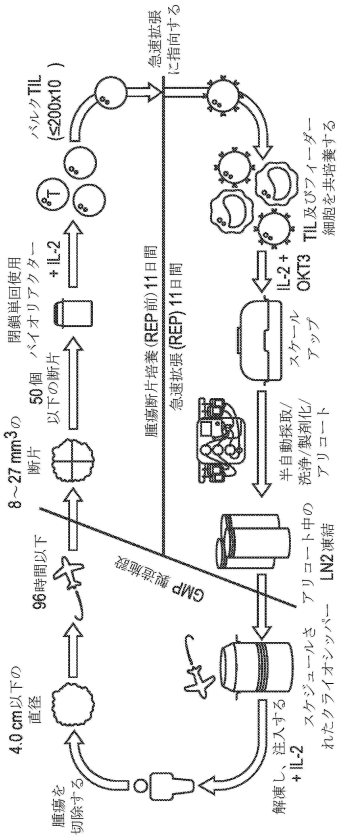


REP PD プロセス
PFD ページ3/3

【図３】



【図４】



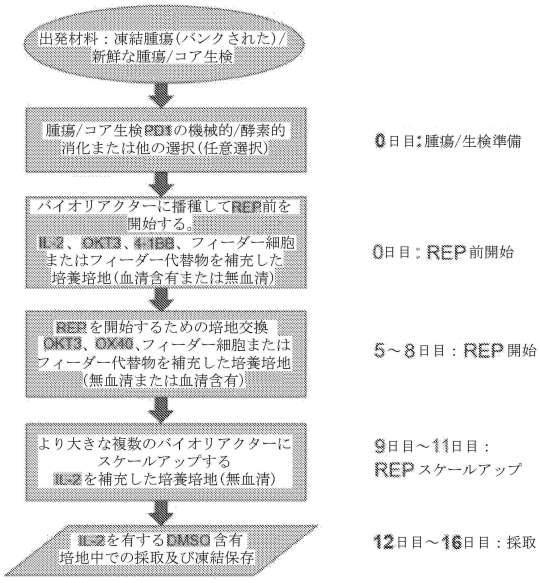
【図５】

プロセス**1C**: ステップ**A**～**E**について**43**～**55**日	プロセス**2A**: ステップ**A**～**E**から約**22**日
1. ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する	**1.** ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する
2. ステップ**B** 断片化及び第１の拡張 **11**日～**21**日	**2.** ステップ**B** 断片化及び第１の拡張 **3**日～**14**日
3. ステップ**C** 第１の拡張から第２の拡張へと移行 選択までの任意選択のストレージ	**3.** ステップ**C** 第１の拡張から第２の拡張へと移行 ストレージ及び閉鎖系なし
4. ステップ**D** 第２の拡張 **IL-2**、**OKT-3**、抗原提示フィーダー細胞 任意選択で１回以上繰り返す	**4.** ステップ**D** 第２の拡張 **IL-2**、**OKT-3**、抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系
5. ステップ**E** ステップ**D**からの**TIL**を採取する	**5.** ステップ**E** ステップ**D**からの**TIL**を採取する 閉鎖系
6. ステップ**F** 最終製剤及び/または注入バッグへの移行	**6.** ステップ**F** 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図６】

プロセス ステップ	プロセス **1C** 実施形態	プロセス**2A** 実施形態	利点
REP前	• **10**個の**GREX-10**フラスコ当たり**4**個の断片 • **11**～**21**日間	• **1**つの**GREX-100M**フラスコ当たり**40**個の断片 • **11**日間	• フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 • 培養時間の短縮 • ステップ数の削減 • 閉鎖系に適している
REP前から**REP**への移行	• **REP**前**TIL**を選択のために表現型決定されるまで凍結し、次いで解凍して**REP**に進む（約**30**日目） • **REP**は、**>40×10⁶ TIL**を必要とする	• **REP**前**TIL**は、**11**日目に直接**REP**に移動する • **REP**は、**25**～**200×10⁶ TIL**を必要とする	• **REP**前から**REP**プロセスの短縮 • ステップ数の削減 • 表現型決定選択の排除 • 閉鎖系に適している
REP	• **REP 0**日目に**6**つの**GREX-100M**フラスコ • **REP 0**日目に**5×10⁶ TIL**及び**5×10⁸ PBMC**フィーダー/フラスコ • **REP 7**日目に**18**～**36**個のフラスコに分割する • **14**日目	• **11**日目に**1**つの**GREX-500M**フラスコ • **11**日目に**25**～**200×10⁶ TIL**及び**5x10⁹ PBMC**フィーダー • **16**日目に**6**個以下の**GREX- 500M**フラスコに分割する • **11**日間	• ステップ数の削減 • **REP**期間の短縮 • フラスコ間の**TIL**の閉鎖系移送 • 閉鎖系培地交換
採取	• 遠心分離によって採取した**TIL**	• **LOVO**自動細胞洗浄システムを介して採取した**TIL**	• ステップ数の削減 • 自動細胞洗浄 • 閉鎖系 • 洗浄中の製品損失の低減
最終 製剤化	• **Hypothermosol**中の新鮮な製品 • 単回注入バッグ • 限定された発送安定性	• **LN_2**中で保管された**PlasmaLyte-A＋1% HSA**及び**CS10**中の凍結保存製品 • 複数のアリコート • より長い発送安定性	• 発送の柔軟性 • 柔軟な患者スケジューリング • よりタイムリーな放出試験
全体の推定プロセス時間	• **43**～**55**日	• **22**日	• 患者へのより速い転向

【図７】



【図８Ａ】

プロセス**2A**: ステップ**A**～**E**から約**22**日	プロセス**GEN 3**：ステップ**A**～**E**から約**14**～**18**日
ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップ**B**前に凍結され得る）	ステップ**A** 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップ**B**前に凍結され得る）
ステップ**B** 第１の拡張 （IL-2を含む培地による約3日～14日間成長させた容器当たり少なくとも40個の断片への物理的断片化）	ステップ**B** プライミングによる第１の拡張 （IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地で約1日～7日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化）
ステップ**C** 第１の拡張から第２の拡張へと移行 （ステップBのTILは、11日目にステップD、任意選択でステップBに直接移動）	ステップ**C** プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行 （ステップBのTILは、7日目にステップDに直接移動）
ステップ**D** 第２の拡張 （密閉容器内にIL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL）	ステップ**D** 急速な第２の拡張 （IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL；10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加）
ステップ**E** ステップDからのTILを採取する （閉鎖系を介して採取されたTIL）	ステップ**E** ステップDからのTILを採取する
ステップ**F** 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）	ステップ**F** 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図８Ｂ】

プロセスGEN 3:ステップA～Eから約14～18日

ステップA
患者の腫瘍試料を取得する
（任意選択で、ステップB前に凍結され得る）

ステップB
プライミングによる第１の拡張
（IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～７日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化）

ステップC
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行
（ステップBのTILは、７日目にステップDに直接移動）

ステップD
急速な第２の拡張
（IL-2、OKT-3、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL；10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加）

ステップE
ステップDからのTILを採取する

ステップF
最終製剤及び/または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｃ】

実施形態GEN 3.0: ステップA～Eから約14～18日	実施形態GEN 3.1対照： ステップA～Eから 約14～18日	実施形態GEN 3.1試験/F: ステップA～Eから 約14～18日
ステップA 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップB前に凍結され得る）	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップB前に凍結され得る）	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップB前に凍結され得る）
ステップB プライミングによる第１の拡張 （IL-2を含む培地による約1日～7/8日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化）	ステップB プライミングによる 第１の拡張 （IL-2及びOKT-3を含む培地による約1日～7/8日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化）	ステップB プライミングによる 第１の拡張 （IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地により約1日～7/8日間成長させた容器当たり最大60個の断片の物理的断片化）
ステップC プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行 （ステップBのTILは、7日目/8日目にステップDに直接移動）	ステップC プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行 （ステップBのTILは、7日目/8日目にステップDに直接移動）	ステップC プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行 （ステップBのTILは、7日目/8日目にステップDに直接移動）
ステップD 急速な第２の拡張 （IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL；10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加）	ステップD 急速な第２の拡張 （IL-2、OKT-3、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL；10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加）	ステップD 急速な第２の拡張 （IL-2、OKT-3、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL；10～11日目にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加）
ステップE ステップDからのTILを採取する	ステップE ステップDからの TILを採取する	ステップE ステップDからの TILを採取する
ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図８Ｄ】

修正したGen 2様プロセス：ステップA～Eから約22日

ステップA
患者の腫瘍試料を取得する
（任意に、ステップB前に凍結され得；
任意に、腫瘍試料は、コア/小生検であり得る）

ステップB1
初期培養
容器当たり最大60個の腫瘍断片または最大10個のコア/小生検の物理的断片化、IL-2を含む成長培地中で3日間成長したTIL

ステップB2
プライミングによる第１の拡張
IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む
成長培地中で 8日間成長したTIL）

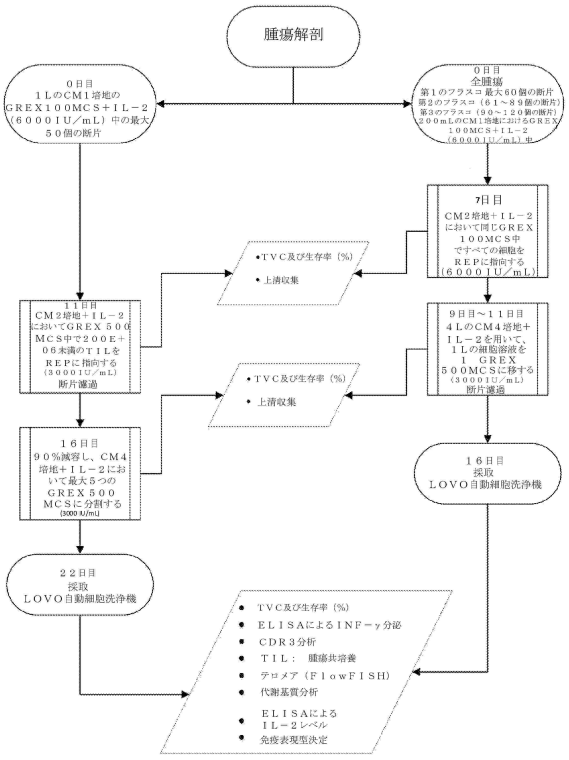
ステップC
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行
（ステップBのTILは、11日目にステップDに直接移動）

ステップD
急速な第２の拡張
（体積を低下させ、IL-2、OKT-3、及び50X抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（medium）において成長したTIL、16日目にスケールアップ、及びさらなるIL-2を添加）

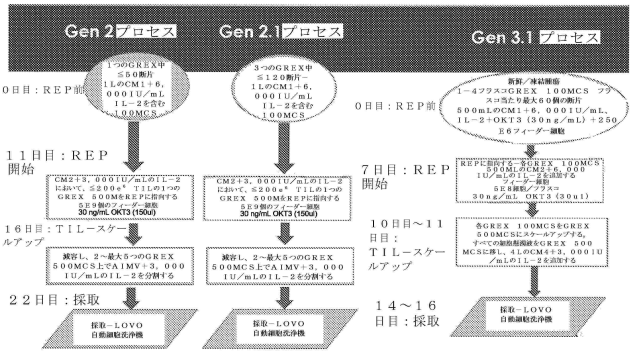
ステップE
ステップDからのTILを採取する

ステップF
最終製剤及び/または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図９】



【図１０】



【図１１】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたGen 3.0
ＲＥＰ前－０日目	≦５０個の断片／１つのＧ－Ｒｅｘ１００ＭＣＳ－１１日	≦１８０個の断片／３つのＧ－Ｒｅｘ、事前配合されたＣＭ１加温培地１００ＭＣＳ－１１日	新鮮または凍結腫瘍１つのＧ－Ｒｅｘ当たり≦３０個の断片～最大６０個の断片を有する全腫瘍１００ＭＣＳ（最大４つのＧ－Ｒｅｘ）、事前に配合された加温培地－７日。ＲＥＰ前、フィーダー２．５Ｅ８細胞＋ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ＭＬ）
ＲＥＰ開始	ＲＥＰに指向する－１１日目－＜２００Ｅ６ ＴＩＬ１つのＧ－Ｒｅｘ ５００ＭＣＳ	ＲＥＰに指向する－１１日目－＜２００Ｅ６ ＴＩＬ１つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ中の事前配合されたＣＭ２加温培地	ＲＥＰに指向する－７日目－すべての組成ＴＩＬ－同じＧ－Ｒｅｘ １００ＭＣＳ（１００ＭＣＳ、最大４つのＧＲＥＸ）、標準培地または合成培地（無血清）。追加のフィーダー５ Ｅ８細胞＋ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ＭＬ）
ＴＩＬの増殖またはスケールアップ	１～５つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ１６日目に分割する	２～５つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ事前配合されたＣＭ４加温培地１６日目に分割する	Ｇ－ＲＥＸ １００ＭＣＳから、ＴＩＬ懸濁液をＧ－ＲＥＸ ５００ＭＣＳ、最大４つのＧＲＥＸ ５００ＭＣＳに移す－標準培地または合成培地（無血清）１０日目または１１日目にスケールアップする
採取	２２日目に採取する、ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機	２２日目に採取する、ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機（５回の洗浄サイクル）	１４日目または１６日目に採取するＬＯＶＯ自動細胞洗浄機（５回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品 ＬＮ２中の３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ２－ＣＳ１０、複数のアリコート	凍結保存した製品 ＬＮ２中の３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ２－ＣＳ１０、複数のアリコート	凍結保存した製品 ＬＮ２中の３００１Ｕ／ｍｌのＩＬ２－ＣＳ１０、複数のアリコート
プロセス時間	２２日	２２日	１６日

【図１２】

プロセス日	条件	Gen 3.1
6日目、REP前開始	培地 CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	フィーダー(250 E+06)	+

プロセス日	条件	Gen 3.1
7日目、REP開始	培地 CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	7日目に追加された OKT-3 (30ng/mL)	+
	7日目に追加されたフィーダー	500 E06
	日数での総フィーダー	750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
9～11日目-スケールアップ	G-REX 100MCSから、TIL懸濁液を1つのG-REX 500MCS（最大3つのGREX 500MCS）に移す	あり
16日目-採取	LOVO自動細胞洗浄機	あり

【図１３】

プロセス比較	主なプロセス変化	利点
Gen 2：Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG-Rex500MCSフラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の倍加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1：Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス（22日から） • プロセス中の全フィーダー層を低減する • 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP • 100MCSスケールから500MCS • 複数のREP前のフラスコを計量する • 標準培地及び合成培地（無血清）	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 純度を低減する（フィーダー） • 同等またはより高い用量。

【図１４】

プロセス比較	主なプロセス変化	所望の改善	成功の判断基準	成果
Gen 2：Gen 3.0	• 14～16日 • 最大4つのフラスコの断片を用いてREPを開始する。 • 100MCSスケールから500MCS	• 増加した有効性 • 改善された有効性 • 低下したプロセス時間	• INF-gにより測定されるように有効性を増加する✓ • 同等の表現型✓ • 同等の用量✓ • 同等の純度✓（フィーダー細胞） • クローンの多様性を維持する✓	• Gen2を上回って増加した有効性 • CD8細胞におけるCD28の改善した発現 • Gen 3.1における16日目までに達したフラスコの最大容量 • 低減したフィーダー細胞使用 • 増加した多様性

【図１５】

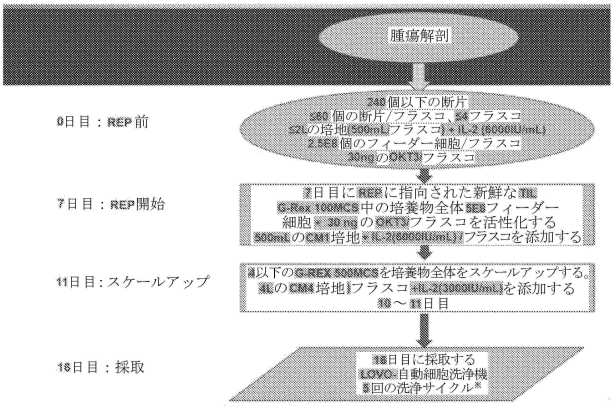
プロセス	Gen 2	Gen 3
L4054	標準培地	標準培地
L4055	標準培地	標準培地
M10851	標準培地	標準培地

標準培地：
REP前：CM1
REP開始：CM2
分割またはスケールアップ：CM4

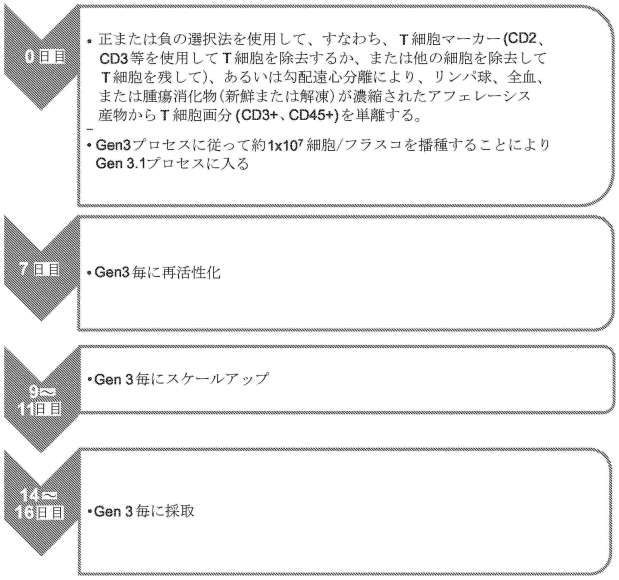
プロセス	Gen 3	Gen 3.1 対照	Gen 3.1
L4063	標準培地	標準培地	標準培地
L4064	合成培地	合成培地	合成培地

合成培地：
プロセスの各日におけるCTS Optimizer
（無血清培地）

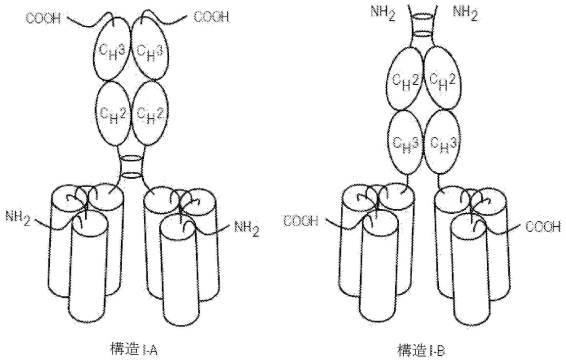
【図１６】



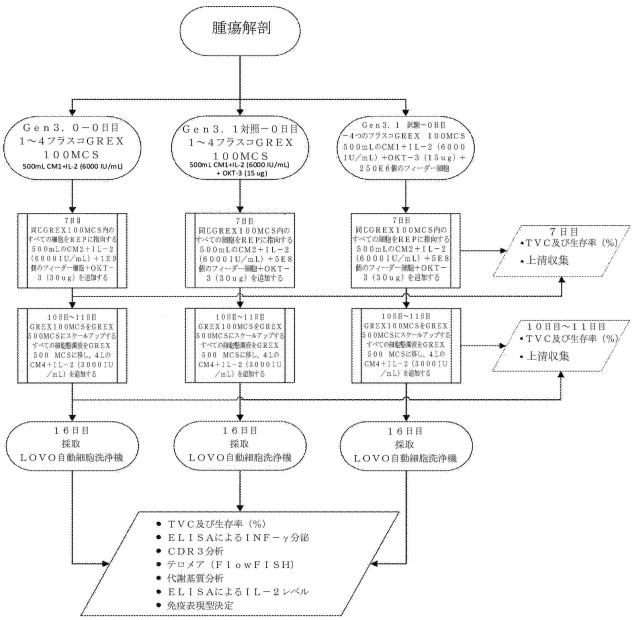
【図１７】



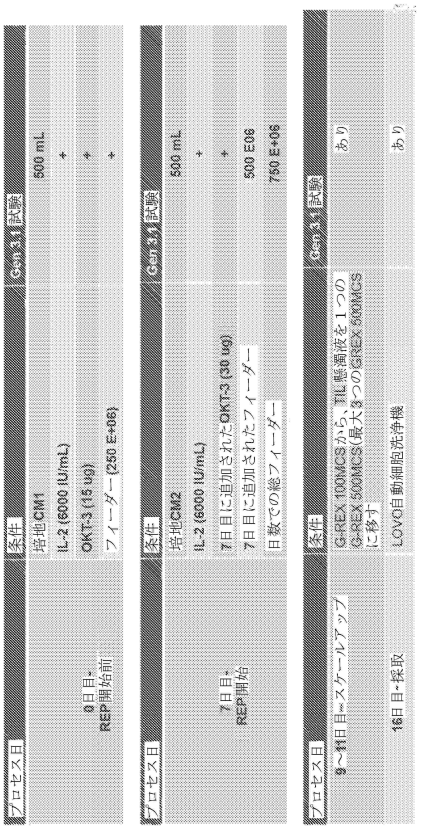
【図１８】



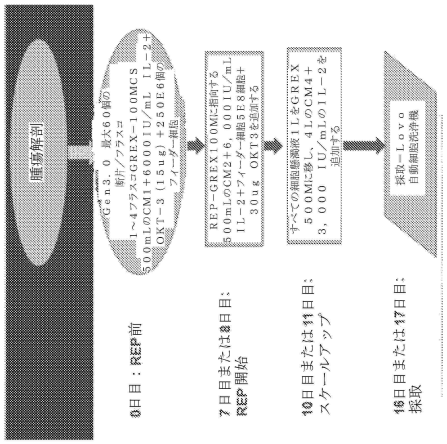
【図１９】



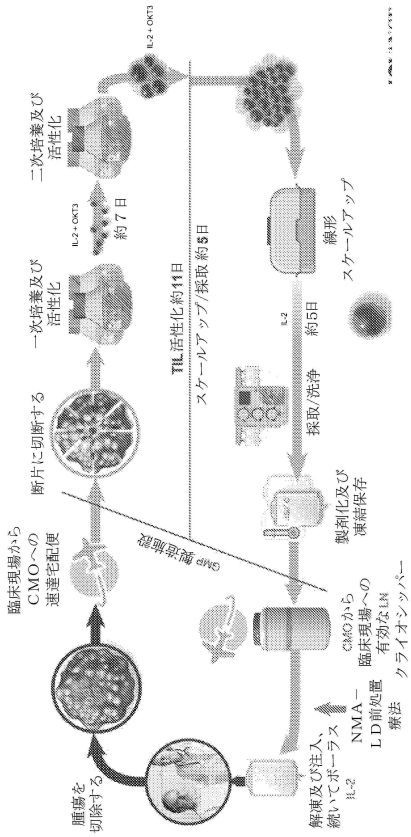
【図２０】



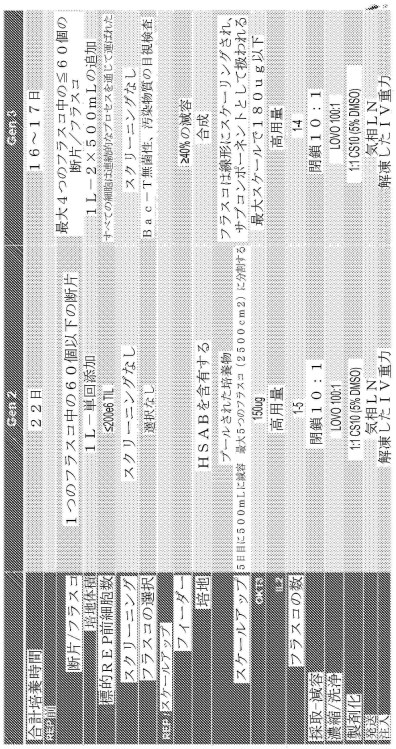
【図２１】



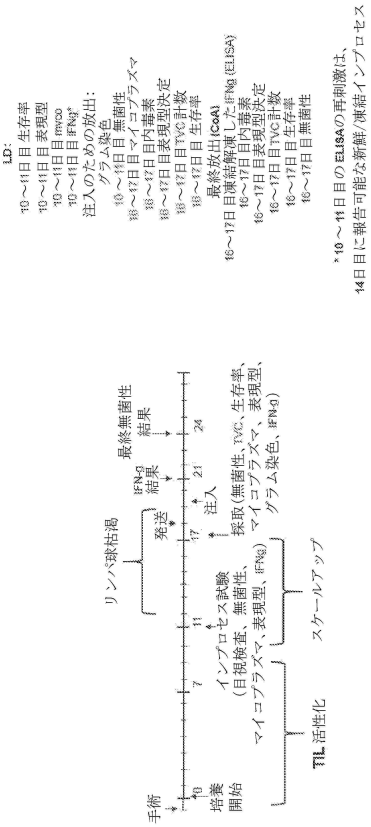
【図２２】



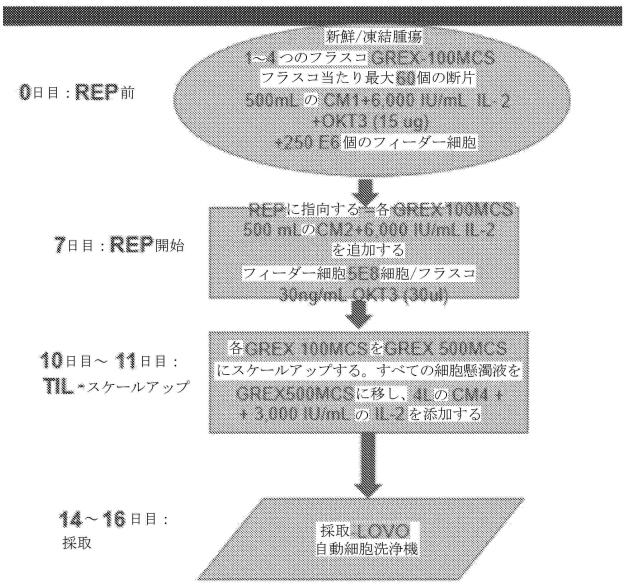
【図２３】



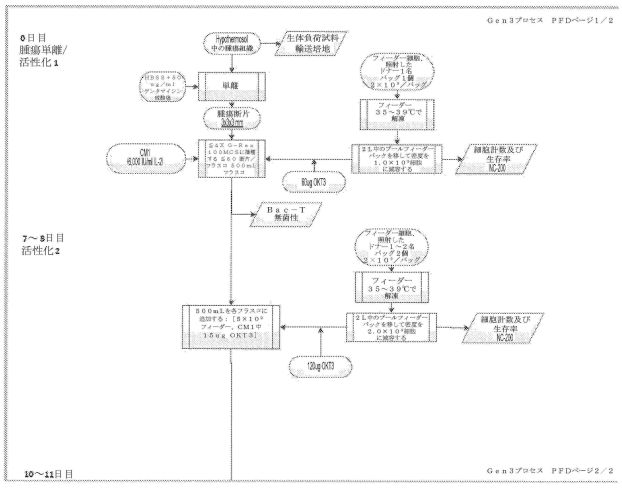
【図２４】



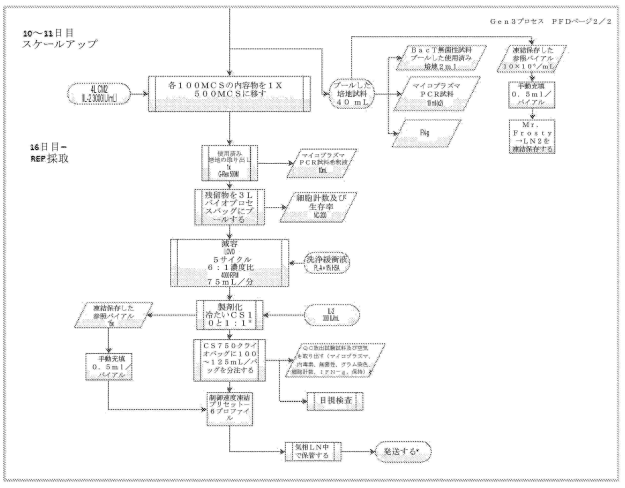
【図２５】



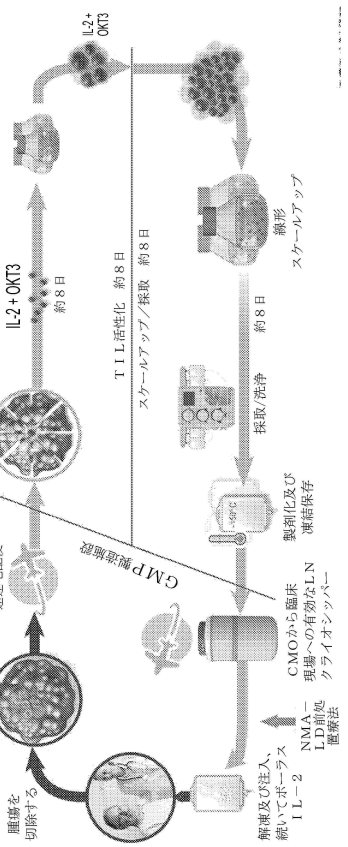
【図２６Ａ】



【図２６Ｂ】



【図２７】



【図２８】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
REP前：0日目	≦50個の断片/1つのG-Rex 100MCS・11日	≦180個の断片/3つのG-Rex、1つのG-Rex当たり≦30個の断片を有する合計等事前配合されたCM1加温培地 100MCS・11日	新鮮または凍結腫瘍 1つのG-Rex当たり≦30個の断片～最大60個の断片を有する合計等事前に配合された加温培地：TIL、REP前、フィーダー250e6細胞＋OKT-3 (15ug)
REP開始	REPに指向する：11日目： <20e9 TIL 1つのG-Rex 500MCS	REPに指向する：7日目：すべての細胞TIL-同じG-Rex 100MCS（100MCS、最大4つのGREX）、標準培地または合成培地（無血清）、フィーダー— 500e8 細胞＋OKT-3 (30ug)の追加	
TILの増殖またはスケールアップ	1～5つのG-REX 500MCS事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	2～5つのG-REX 500MCS事前配合されたCM2加温培地 16日目に分割する	G-REX 100MCSから、TIL懸濁液をG-REX 500MCS、最大4つのGREX 500 MCSに移す：標準培地または合成培地（無血清） 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）	14日目または16日目に採取する LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終製剤	凍結保存した製品LN中の300IU/mlのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品LN中の300IU/mlのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品LN中の300IU/mlのIL2-CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図２９】

プロセス比較	プロセス変更	差異
Gen 2：Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する • 2つのG-Rex500MCSフラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したTILパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の増加の可能性 • プロセス中のプロセス冗長性
	• 新鮮または凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス（22日から）	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間
	• プロセス中の全フィーダー層を低減する	• 低減した試薬試験
Gen 2.1：Gen 3.1	• 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 • 断片で開始したREP • 100MCSスケールから500MCS • 複数のREP前のフラスコを計量する • 標準培地及び合成培地（無血清）	• 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 純度を低減する（フィーダー） • 同等またはより高い用量。

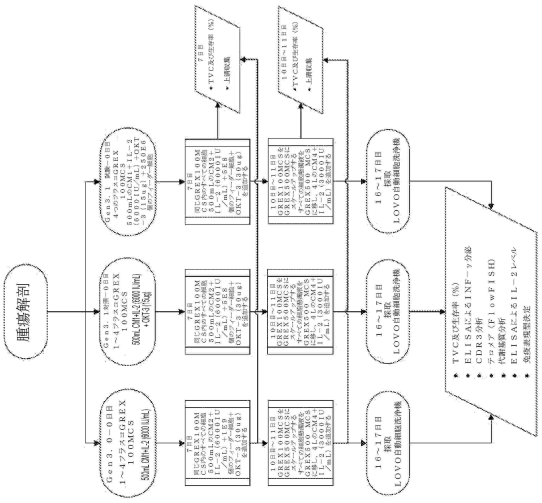
【図３０】

表２．Ｇｅｎ３最適化条件の説明。

プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1試験
0日目：腫瘍断片の単離及び活性化	培地 (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	フィーダー	-	-	2.5E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1試験
7～8日目：TIL培養再活性化	培地 (*)	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	フィーダー	1 E+09	500 E+06	500E+06
	7日目までに添加されたフィーダーの合計	1E+09	500 E+06	750E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1試験
10～11日目：培養のスケールアップ	GREX 100から、IL-2を含むAIM培地を含有する1つのGREX 500に、全TIL懸濁液を移す（3000 IU/mL）			
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1試験
16～17日目：採取/洗浄/製剤化	LOVO自動細胞洗浄機及びCS10による凍結保存。			

(*)培地は、標準培地またはCTS無血清培地であり得る。

【図３１】



【図３２】

ステップ	Gen 3プロセス－最適化
0日目 腫瘍単離及び 活性化	240個以下の断片 60個以下の断片/フラスコ 4つ以下のフラスコ 2L以下の培地（500mL/フラスコ） IL-2（6000IU/mL） 2.5×10^8個のフィーダー細胞/フラスコ 15ugのOKT3/フラスコ
7～8日目 再活性化	REPに指向した新鮮なTIL 培養物全体を活性化する 5×10^8個のフィーダー細胞 30 ug OKT3/フラスコ G-Rex 100MCS 500mLの培地＋IL-2（6000IU/mL）を添加する
10～11日目 スケールアップ またはTIL 継代培養	4つ以下のG-REX 500MCS 1LをGREX 100MCSからGREX 500MCS に移して培養物全体をスケールアップし、 4Lの培地＋IL-2（3000 IU/mL）/フラスコを添加する
16～17日目： 採取	採取 LOVO-自動細胞洗浄機 Plasmalyte 1% HSAで凍結保存：CS10

【図３３】

試験	合格判定基準	Gen 3.1試験対Gen 3.0プロセス
細胞計数（TVC）	Gen 3.1 > 30%からプロセスGen 3.0	Met
生存率（%）	≥70%の生存率	Met
免疫表現型決定（%CD3+/ %CD45+）	Gen 3.1とGen 3.0プロセスとの間の≤5%の差	Met
IFNγ分泌	Gen 3.1≥からプロセスGen 3.0	Met

【図３４Ａ】

6X NFAT IL-2最小プロモーター配列

Tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtt
tcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcat
acagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattg
gtcccgggacatttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaa
tcactactcacagtaacctcaactcctg

【図３４Ｂ】

NFAT-IL18 DNA配列

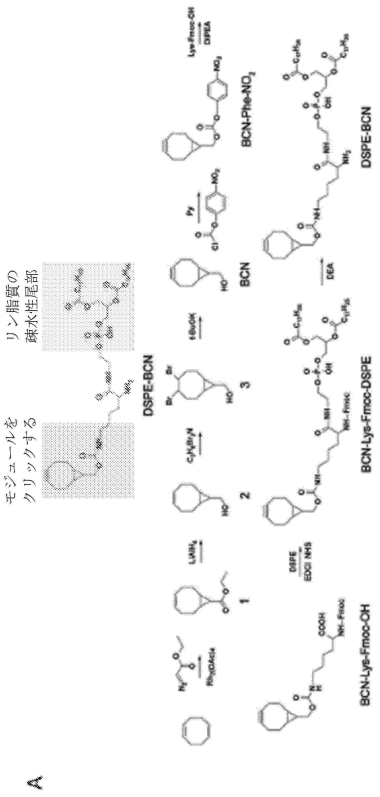
Tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtt
tcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcat
acagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattg
gtcccgggacattttgacacccccataatattttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaa
tcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGGACCTGGATTTTGTTCCTGGTGGCTGCAGCCACTCG
GGTCCACAGCTACTTCGGCAAGCTGGAGAGTAAACTTTCCGTGATCCGCAACCTCAACGACCAAGTGCT
GTTCATTGACCAGGGCAACCGCCCCCTCTTTGAAGACATGACCGACAGCGATTGTCGTGACAATGCGCC
CCGCACCATCTTTATAATTTCCATGTACAAGGATAGCCAGCCGCGGGGAATGGCGGTAACGATCTCGGT
GAAGTGTGAAAAAATCTCGACCCTGTCATGCGAGAACAAGATCATTTCCTTCAAAGAGATGAATCCACC
CGACAACATCAAGGACACCAAGTCCGACATCATCTTCTTCCAGCGCAGCGTGCCTGGGCATGACAACAA
GATGCAGTTCGAGAGCTCGTCTTACGAGGGCTATTTCCTGGCCTGCGAGAAGGAGCGTGACCTGTTCAA
GCTTATCCTGAAGAAGGAGGACGAGCTGGGGGACCGCAGCATCATGTTTACAGTGCAGAACGAGGATT
AA

【図３４Ｃ】

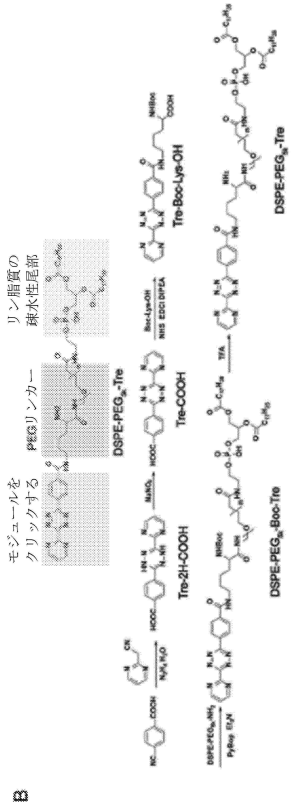
NFAT-DR-IL18 DNA配列

Tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtt
tcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcat
acagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattg
gtcccgggacattttgacacccccataatattttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaa
tcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCGGCAACTC
GCGTACATAGCTATTTCGGCAAGCTGGAGAGCAAACTATCAGTGATCCGCAACCTCAACGACCAGGTCT
TGTTTATTGACCAGGGCAACCGCCCCCTGTTCGAAGACATGACAGACAGCGATTGTCGCGACAATGCTC
CTCGCACCATCTTTATCATCTCCAAGTACTCCGATTCTCGAGCCAGAGGTCTCGCCGTGACCATCTCCGTG
AAGTGCGAGAAGATATCCACTCTTTCATGCGAGAACAAGATCATTTCCTTCAAGGAGATGAATCCACCC
GACAACATCAAGGACACCAAGTCCGACATCATCTTCTTCGCTCGTGTGCCTGGCCACGGCCGCAAGACC
CAGTTCGAGAGTTCCAGCTACGAGGGCTACTTCCTGGCCTGTGAGAAAGAGCGGGACCTTTTCAAATTG
ATTCTGAAGAAGGAGGACGAGCTGGGCGACCGTAGCATCATGTTTACGGTGCAGAACGAGGATTAA

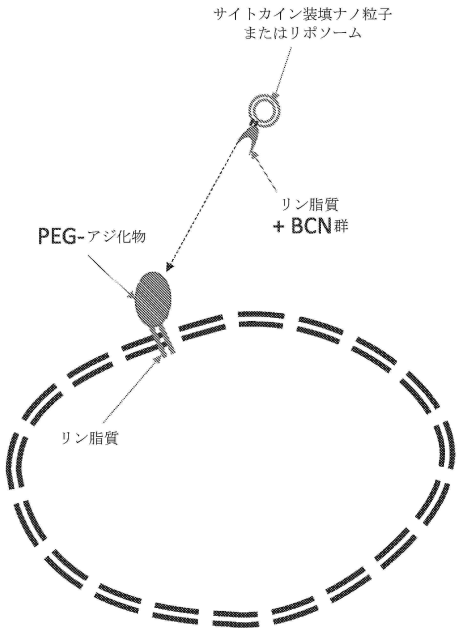
【図３５Ａ】



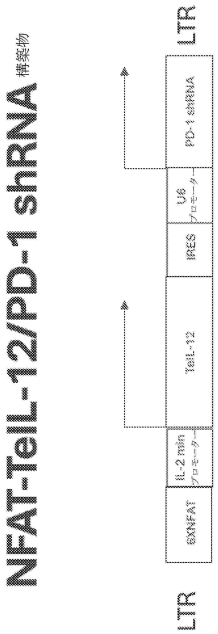
【図３５Ｂ】



【図３６】



【図３７】



【配列表】

2025503987000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061471

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/17 A61P35/00 C12N5/0783
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/210131 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) column 575; claims; examples paragraph [0311] - paragraph [0312] -----	1-29,31, 52-66, 68-83, 119-133, 135-140, 146-153
X	WO 2020/096988 A2 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 14 May 2020 (2020-05-14) cited in the application claims; examples ----- -/--	1-29,31, 52-66, 68-83, 119-133, 135-140, 146-153

X Further documents are listed in the continuation of Box C.

X See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 May 2023	26/05/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Armandola, Elena

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/061471

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/061471

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/100023 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 23 May 2019 (2019-05-23) paragraph [1072] - paragraph [1075]; claims; examples paragraph [1045]	9-29,31, 52-63, 68-76
X	WO 2021/226061 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 11 November 2021 (2021-11-11) page 6 - page 26; claims; figures	9-25, 52-63, 68-76
X	WO 2018/182817 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]; WARDELL SETH [US] ET AL.) 4 October 2018 (2018-10-04) paragraph [0315]; claims; examples	9-25, 52-63, 68-76
X,P	WO 2022/165260 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]; ZHANG YONGLIANG; CUBAS RAFAEL) 4 August 2022 (2022-08-04) paragraph [2905]; claims; examples	1-7, 52-66, 68-83, 119-133, 135-140, 146-153
X,P	WO 2022/170219 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]; VOGT FREDERICK G [US]) 11 August 2022 (2022-08-11) paragraph [0028]; claims; examples	1-7, 52-66, 68-83, 119-133, 135-140, 146-153

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/061471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019210131 A1	31-10-2019	AU 2019257749 A1	22-10-2020
		BR 112020021660 A2	02-02-2021
		CA 3098303 A1	31-10-2019
		CN 112368003 A	12-02-2021
		EP 3784254 A1	03-03-2021
		IL 278231 A	30-11-2020
		JP 2021521846 A	30-08-2021
		KR 20210005138 A	13-01-2021
		MA 52533 A	03-03-2021
		SG 11202010319R A	27-11-2020
		TW 202014195 A	16-04-2020
		US 2021130779 A1	06-05-2021
		US 2022010278 A1	13-01-2022
		US 2022396768 A1	15-12-2022
		US 2022396769 A1	15-12-2022
		US 2022403333 A1	22-12-2022
		US 2022403334 A1	22-12-2022
		WO 2019210131 A1	31-10-2019
WO 2020096988 A2	14-05-2020	AU 2019374761 A1	10-06-2021
		CA 3118624 A1	14-05-2020
		CL 2021001178 A1	21-01-2022
		CN 113272421 A	17-08-2021
		CO 2021007362 A2	30-08-2021
		CR 20210295 A	09-07-2021
		EP 3877513 A2	15-09-2021
		IL 282919 A	30-06-2021
		JP 2022506586 A	17-01-2022
		KR 20210091213 A	21-07-2021
		PE 20211292 A1	20-07-2021
		PH 12021551033 A1	14-02-2022
		SG 11202104615V A	29-06-2021
		TW 202039830 A	01-11-2020
		US 2022090018 A1	24-03-2022
		WO 2020096988 A2	14-05-2020
WO 2019100023 A1	23-05-2019	AU 2018368786 A1	18-06-2020
		BR 112020009663 A2	10-11-2020
		CA 3082484 A1	23-05-2019
		CN 111601883 A	28-08-2020
		CR 20200251 A	17-07-2020
		EP 3710576 A1	23-09-2020
		IL 274584 A	30-06-2020
		JP 2021503281 A	12-02-2021
		KR 20200100060 A	25-08-2020
		PH 12020550642 A1	22-03-2021
		SG 11202004457X A	29-06-2020
		TW 201932594 A	16-08-2019
		US 2020277573 A1	03-09-2020
		US 2021309968 A1	07-10-2021
		WO 2019100023 A1	23-05-2019
WO 2021226061 A1	11-11-2021	CA 3176826 A1	11-11-2021
		EP 4146794 A1	15-03-2023
		TW 202208617 A	01-03-2022
		WO 2021226061 A1	11-11-2021
WO 2018182817 A1	04-10-2018	AU 2018243355 A1	31-10-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/061471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		EP 3910055 A1	17-11-2021
		ES 2874335 T3	04-11-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		HU E054829 T2	28-10-2021
		IL 269543 A	28-11-2019
		JP 7169291 B2	10-11-2022
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		JP 2023011778 A	24-01-2023
		JP 2023012510 A	25-01-2023
		JP 2023012511 A	25-01-2023
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		PL 3601533 T3	16-08-2021
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		SI 3601533 T1	30-09-2021
		TN 2019000273 A1	07-01-2021
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 11202803 B1	21-12-2021
		US 11517592 B1	06-12-2022
		US 11529372 B1	20-12-2022
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020
		US 2020289569 A1	17-09-2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/061471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		US 2021353677 A1	18-11-2021
		US 2021361712 A1	25-11-2021
		US 2021361713 A1	25-11-2021
		US 2021379111 A1	09-12-2021
		US 2022000923 A1	06-01-2022
		US 2022000924 A1	06-01-2022
		US 2022000925 A1	06-01-2022
		US 2022008469 A1	13-01-2022
		US 2022362301 A1	17-11-2022
		US 2022387494 A1	08-12-2022
		US 2022387495 A1	08-12-2022
		US 2022387496 A1	08-12-2022
		US 2022387497 A1	08-12-2022
		US 2022387498 A1	08-12-2022
		US 2022395533 A1	15-12-2022
		US 2023012086 A1	12-01-2023
		US 2023015649 A1	19-01-2023
		US 2023045899 A1	16-02-2023
		US 2023133298 A1	04-05-2023
		WO 2018182817 A1	04-10-2018
WO 2022165260 A1	04-08-2022	TW 202241508 A	01-11-2022
		WO 2022165260 A1	04-08-2022
WO 2022170219 A1	11-08-2022	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*31/675 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/675		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*38/19 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/19		
Ｃ１２Ｎ	*15/867 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/87 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/87	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/113 (2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	

(32)優先日　令和4年11月4日(2022.11.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国，ペンシルベニア州 １９４０１ ウェスト ノーリトン ヘムロック ロード ２１２０
(72)発明者　ファーディス，マリア
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０，サン カルロス，アバディーン ドライブ １０５
(72)発明者　キュバス，ラファエル
アメリカ合衆国，フロリダ州 ３３６４７ タンパ パイン スラスト ウェイ ８４０４
(72)発明者　ジャン，ヨンリャン
アメリカ合衆国，フロリダ州 ３３５４３ ウェスレイ チャペル ディアボーン ドライブ １４３６

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AB01 AC20 BA02 BB19 BB34 BD39 CA24 CA44
4C084　AA13 BA44 DA01 MA02 MA55 MA57 MA65 MA66 NA05 NA14
ZB261 ZB262 ZC751
4C086　AA01 AA02 BC50 DA35 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZC75
4C087　AA01 AA02 BB43 BB64 BB65 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZC75