



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112368003 A

(43) 申请公布日 2021.02.12

(21) 申请号 201980042525.2

(22) 申请日 2019.04.26

(30) 优先权数据

62/663,885 2018.04.27 US

62/680,821 2018.06.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.12.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/029286 2019.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/210131 EN 2019.10.31

(71) 申请人 艾欧凡斯生物治疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 C·夏尔提-考多 K·里特皮柴

(74) 专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

代理人 李晓

(51) Int.Cl.
A61K 35/17 (2006.01)
C12N 5/09 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

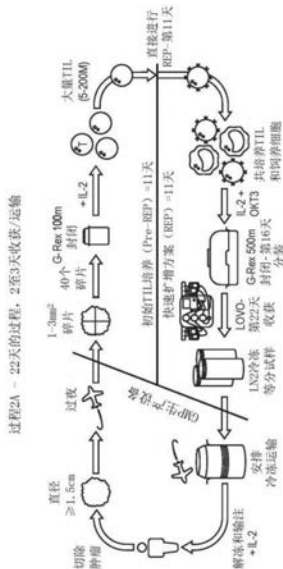
权利要求书16页 说明书146页
序列表81页 附图26页

(54) 发明名称

肿瘤浸润淋巴细胞的基因编辑及其在免疫治疗中的用途

(57) 摘要

本发明提供了扩增TIL和产生治疗性TIL群的改进和/或缩短的方法,包括在封闭系统中扩增TIL群的新型方法,该方法在更短时间内得到了TIL的改善的功效、改善的表型和增强的代谢健康,同时减少了微生物污染并降低了成本。该方法可以包括对至少一部分TIL进行基因编辑以增强其治疗功效。此类TIL可用于治疗方案。



1. 一种将肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 扩增成治疗性TIL群的方法, 其中, 所述方法包括:
 - (a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片, 由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;
 - (b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中; 其中, 所述肿瘤碎片来自患者切除的肿瘤;
 - (c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增, 产生第二TIL群; 其中, 第一次扩增在提供第一透气表面积 of 的封闭容器中进行; 第一次扩增进行约3天至14天, 获得第二TIL群; 第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍; 从步骤(b) 到步骤(c) 的转变在不打开系统的情况下发生;
 - (d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC) 进行第二次扩增, 产生第三TIL群; 其中, 第二次扩增进行约7天至14天, 获得第三TIL群; 第三TIL群是治疗性TIL群; 第二次扩增在提供第二透气表面积 of 的封闭容器中进行; 从步骤(c) 到步骤(d) 的转变在不打开系统的情况下发生;
 - (e) 收获从步骤(d) 获得的治疗性TIL群; 其中, 从步骤(d) 到步骤(e) 的转变在不打开系统的情况下发生;
 - (f) 将从步骤(e) 收获的TIL群转移至输液袋; 其中, 从步骤(e) 到步骤(f) 的转变在不打开系统的情况下发生; 以及
 - (g) 在所述方法期间的任何时间, 对至少一部分TIL进行基因编辑。
2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述方法还包括以下步骤: 使用冷冻保存方法冷冻保存步骤(f) 的包含收获的TIL群的输液袋。
3. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述冷冻保存方法使用1:1比率的收获的TIL群与冷冻保存培养基进行。
4. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞PBMC。
5. 根据权利要求4所述的方法, 其中, 所述PBMC是经辐照且同种异体的。
6. 根据权利要求4所述的方法, 其中, 在步骤(d) 的第9天至第14天中的任何一天将PBMC添加到细胞培养基中。
7. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。
8. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(e) 中的收获使用基于膜的细胞处理系统进行。
9. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(e) 中的收获使用LOVO细胞处理系统进行。
10. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 多个碎片包括约4个至约50个碎片, 每个碎片的体积为约 27mm^3 。
11. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 多个碎片包括约30个至约60个碎片, 总体积为约 1300mm^3 至约 1500mm^3 。
12. 根据权利要求9所述的方法, 其中, 多个碎片包括约50个碎片, 总体积为约 1350mm^3 。
13. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 多个碎片包括约50个碎片, 总质量为约1克至约1.5克。
14. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供所述细胞培养基。
15. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(d) 中的细胞培养基还包含IL-15和/或IL-

21。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述IL-2的浓度为约10,000IU/mL至约5,000IU/mL。

17. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述IL-15的浓度为约500IU/mL至约100IU/mL。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述IL-21的浓度为约20IU/mL至约0.5IU/mL。

19. 根据前述权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(f)中的输液袋是含有HypoThermosol的输液袋。

20. 根据权利要求3所述的方法, 其中, 所述冷冻保存培养基包含二甲基亚砷(DMSO)。

21. 根据权利要求17所述的方法, 其中, 所述冷冻保存培养基包含7%至10%的DMSO。

22. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(c)中的第一阶段和步骤(e)中的第二阶段各自在10天、11天或12天内进行。

23. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(c)中的第一阶段和步骤(e)中的第二阶段各自在11天内进行。

24. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行约10天至约22天。

25. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行约20天至约22天。

26. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行约15天至约20天。

27. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行约10天至约20天。

28. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行约10天至约15天。

29. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行22天以下。

30. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行20天以下。

31. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行15天以下。

32. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)进行10天以下。

33. 根据权利要求2所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(f)和冷冻保存进行22天以下。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法, 其中, 在步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含足以达到TIL的治疗有效剂量的TIL。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中, 足以达到治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的方法, 其中, 步骤(b)至步骤(e)在单个容器中进行; 其中, 与在超过一个的容器中进行步骤(b)至步骤(e)相比, 在单个容器中进行步骤(b)至步骤(e)使得每个切除的肿瘤的TIL产量增加。

37. 根据权利要求1至36中任一项所述的方法, 其中, 在步骤(d)的第二阶段期间, 在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。

38. 根据权利要求1至37中任一项所述的方法, 其中, 当给受试者施用, 步骤(d)中的第三TIL群提供增加的疗效、增加的干扰素- γ 产量、增加的多克隆性、增加的平均IP-10和/或增加的平均MCP-1。

39. 根据权利要求1至38中任一项所述的方法, 其中, 当给受试者施用, 步骤(d)中的第三TIL群提供至少5倍以上的干扰素- γ 产量。

40. 根据权利要求1至39中任一项所述的方法, 其中, 步骤(d)中的第三TIL群是治疗性TIL群, 相对于第二TIL群, 所述治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的

亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

41. 根据权利要求1至40中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自第三TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出:CD57表达增加和CD56表达降低。

42. 根据权利要求1至41中任一项所述的方法,其中,与开放系统相比,所述方法降低了微生物污染的风险。

43. 根据权利要求1至42中任一项所述的方法,其中,将来自步骤(g)的TIL输注到患者体内。

44. 根据权利要求1至43中任一项所述的方法,其中,多个碎片包括约4个碎片。

45. 根据权利要求1至44中任一项所述的方法,其中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,所述细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。

47. 根据权利要求45所述的方法,其中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。

48. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。

49. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,对第一次扩增的TIL或第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

50. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,基因编辑在第一次扩增之后和第二次扩增之前进行。

51. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,基因编辑在步骤(c)之前、步骤(d)之前或步骤(e)之前进行。

52. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,在所述第一次扩增和/或所述第二次扩增期间,所述细胞培养基包含OKT-3;并且在将OKT-3引入所述细胞培养基之前进行基因编辑。

53. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,在所述第一次扩增和/或所述第二次扩增期间,所述细胞培养基包含OKT-3;并且在将OKT-3引入所述细胞培养基之后进行基因编辑。

54. 根据权利要求1至47中任一项所述的方法,其中,从所述第一次扩增起始日开始,所述细胞培养基包含OKT-3;并且在TIL暴露于OKT-3之后进行基因编辑。

55. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

57. 根据权利要求55所述的方法, 其中, 所述一种以上免疫检查点基因选自: PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

58. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强, 所述免疫检查点基因选自: CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD) 和/或NOTCH配体mDLL1。

59. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括使用可编程核酸酶, 所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。

60. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

61. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括CRISPR法。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中, 所述CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

63. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括TALE法。

64. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括锌指法。

65. 治疗患有癌症的受试者的方法, 所述方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL), 其中, 所述方法包括以下步骤:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片, 由受试者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增, 产生第二TIL群; 其中, 第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行; 第一次扩增进行约3天至14天, 获得第二TIL群; 第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍; 从步骤(b) 到步骤(c) 的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC) 进行第二次扩增, 产生第三TIL群; 其中, 第二次扩增进行约7天至14天, 获得第三TIL群; 第三TIL群是治疗性TIL群; 第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行; 从步骤(c) 到步骤(d) 的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 收获从步骤(d) 获得的治疗性TIL群; 其中, 从步骤(d) 到步骤(e) 的转变在不打开系统的情况下发生;

(f) 将从步骤(e) 收获的TIL群转移至输液袋; 其中, 从步骤(e) 到步骤(f) 的转变在不打开系统的情况下发生;

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

(h) 给患者施用治疗有效剂量的第三TIL群, 所述第三TIL群来自步骤(g) 的输液袋; 以及

(i) 在所述方法的步骤(a) 至步骤(f) 期间的任何时间, 对至少一部分TIL进行基因编辑。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中, 在步骤(e) 收获的治疗性TIL群包含足以达到

TIL在步骤(h)中施用的治疗有效剂量的TIL。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中,足以达到在步骤(h)中施用的治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞APC是PBMC。

69. 根据权利要求68所述的方法,其中,在步骤(d)的第9天至第14天中的任何一天将PBMC添加到细胞培养基中。

70. 根据权利要求65至69中任一项所述的方法,其中,在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL细胞之前,已给患者施用了非清髓性淋巴细胞耗竭方案。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中,所述非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以 $60\text{mg}/\text{m}^2$ /天的剂量施用环磷酰胺2天,然后以 $25\text{mg}/\text{m}^2$ /天的剂量施用氟达拉滨5天的步骤。

72. 根据权利要求65至71中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括在步骤(h)中给患者施用TIL细胞后的第二天开始用高剂量IL-2方案治疗患者的步骤。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中,所述高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注方式施用 $600,000\text{IU}/\text{kg}$ 或 $720,000\text{IU}/\text{kg}$,直至耐受。

74. 根据权利要求65至73中任一项所述的方法,其中,步骤(d)中的第三TIL群是治疗性TIL群,相对于第二TIL群,所述治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

75. 根据权利要求65至74中任一项所述的方法,其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出:CD57表达增加和CD56表达降低。

76. 根据权利要求65至75中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自:黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌NSCLC、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌HNSCC)、肾癌和肾细胞癌。

77. 根据权利要求65至76中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自黑色素瘤、HNSCC、宫颈癌和NSCLC。

78. 根据权利要求65至77中任一项所述的方法,其中,所述癌症是黑色素瘤。

79. 根据权利要求65至78中任一项所述的方法,其中,所述癌症是HNSCC。

80. 根据权利要求65至79中任一项所述的方法,其中,所述癌症是宫颈癌。

81. 根据权利要求65至80中任一项所述的方法,其中,所述癌症是NSCLC。

82. 根据权利要求65至81中任一项所述的方法,其中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,所述细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。

83. 根据权利要求82所述的方法,其中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。

84. 根据权利要求82所述的方法,其中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。

85. 根据权利要求65至84中任一项所述的方法,其中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。

86. 根据权利要求65至84中任一项所述的方法,其中,对所述第一次扩增的TIL或所述第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

87. 根据权利要求65至84中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑在所述第一次扩增之后和所述第二次扩增之前进行。

88. 根据权利要求65至84中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑在步骤(c)之前、步骤(d)之前或步骤(e)之前进行。

89. 根据权利要求65至88中任一项所述的方法,其中,在所述第一次扩增和/或所述第二次扩增期间,所述细胞培养基包含OKT-3;并且在将OKT-3引入所述细胞培养基之前进行基因编辑。

90. 根据权利要求65至88中任一项所述的方法,其中,在所述第一次扩增和/或所述第二次扩增期间,所述细胞培养基包含OKT-3;并且在将OKT-3引入所述细胞培养基之后进行基因编辑。

91. 根据权利要求65至88中任一项所述的方法,其中,从所述第一次扩增起始日开始,所述细胞培养基包含OKT-3;并且在TIL暴露于OKT-3之后进行基因编辑。

92. 根据权利要求65至91中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

93. 根据权利要求92所述的方法,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

94. 根据权利要求92所述的方法,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

95. 根据权利要求65至91中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

96. 根据权利要求65至95中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。

97. 根据权利要求65至95中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

98. 根据权利要求65至95中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括CRISPR法。

99. 根据权利要求98所述的方法,其中,所述CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

100. 根据权利要求65至95中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括TALE法。

101. 根据权利要求65至95中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括锌指法。

102. 将肿瘤浸润淋巴细胞TIL扩增成治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括:

(a) 将来自患者切除肿瘤的经处理的肿瘤碎片加入封闭系统中,获得第一TIL群;

(b) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,

产生第二TIL群；其中，第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行；第一次扩增进行约3天至14天，获得第二TIL群；第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍；从步骤(a)到步骤(b)的转变在不打开系统的情况下发生；

(c) 通过向第二TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增，产生第三TIL群；其中，第二次扩增进行约7天至14天，获得第三TIL群；第三TIL群是治疗性TIL群；第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行；，从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生；

(d) 收获从步骤(c)获得的治疗性TIL群；其中，从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生；

(e) 将步骤(d)收获的TIL群转移至输液袋；其中，从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生；以及

(f) 在所述方法期间的任何时间，对至少一部分TIL进行基因编辑。

103. 根据权利要求102所述的方法，其中，在步骤(d)中收获的治疗性TIL群包含足以达到TIL的治疗有效剂量的TIL。

104. 根据权利要求103所述的方法，其中，足以达到治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

105. 根据权利要求104所述的方法，其中，所述方法还包括以下步骤：使用冷冻保存方法冷冻保存包含收获的TIL群的输液袋。

106. 根据权利要求105所述的方法，其中，所述冷冻保存方法使用1:1比率的收获的TIL群与冷冻保存培养基进行。

107. 根据权利要求102所述的方法，其中，所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞PBMC。

108. 根据权利要求107所述的方法，其中，所述PBMC是经辐照且同种异体的。

109. 根据权利要求108所述的方法，其中，在步骤(c)的第9天至第14天中的任何一天将PBMC添加到细胞培养基中。

110. 根据权利要求102所述的方法，其中，所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

111. 根据权利要求102所述的方法，其中，使用LOVO细胞处理系统进行步骤(d)中的收获。

112. 根据权利要求62所述的方法，其中，多个碎片包括约4个至约50个碎片，每个碎片的体积为约 27mm^3 。

113. 根据权利要求102所述的方法，其中，多个碎片包括约30个至约60个碎片，总体积为约 1300mm^3 至约 1500mm^3 。

114. 根据权利要求103所述的方法，其中，多个碎片包括约50个碎片，总体积为约 1350mm^3 。

115. 根据权利要求102所述的方法，其中，多个碎片包括约50个碎片，总质量为约1克至约1.5克。

116. 根据权利要求102所述的方法，其中，多个碎片包括约4个碎片。

117. 根据权利要求102所述的方法，其中，在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供所述第二细胞培养基。

118. 根据权利要求102所述的方法，其中，步骤(e)中的输液袋是含有HypoThermosol的

输液袋。

119. 根据权利要求102所述的方法, 其中, 步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自在10天、11天或12天内进行。

120. 根据权利要求102所述的方法, 其中, 步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自在11天内进行。

121. 根据权利要求102所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(e)进行约10天至约22天。

122. 根据权利要求102所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(e)进行约10天至约20天。

123. 根据权利要求102所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(e)进行约10天至约15天。

124. 根据权利要求102所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(e)进行22天以下。

125. 根据权利要求105所述的方法, 其中, 步骤(a)至步骤(e)和冷冻保存进行22天以下。

126. 根据权利要求102至125中任一项所述的方法, 其中, 步骤(b)至步骤(e)在单个容器中进行; 其中, 与在超过一个的容器中进行步骤(b)至步骤(e)相比, 在单个容器中进行步骤(b)至步骤(e)使得每个切除的肿瘤的TIL产量增加。

127. 根据权利要求102至126中任一项所述的方法, 其中, 在步骤(c)的第二阶段期间, 在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。

128. 根据权利要求102至127中任一项所述的方法, 其中, 步骤(d)中的第三TIL群是治疗性TIL群, 相对于第二TIL群, 所述治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群; 相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞, 获自治疗性TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征: CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

129. 根据权利要求102至128中任一项所述的方法, 其中, 相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞, 获自治疗性TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出: CD57表达增加和CD56表达降低。

130. 根据权利要求102至129中任一项所述的方法, 其中, 与开放系统相比, 所述方法降低了微生物污染的风险。

131. 根据权利要求102至130中任一项所述的方法, 其中, 将来自步骤(e)的TIL输注到患者体内。

132. 根据权利要求102至131中任一项所述的方法, 其中, 所述封闭容器包括单个生物反应器。

133. 根据权利要求132所述的方法, 其中, 所述封闭容器包括G-REX-10。

134. 根据权利要求132所述的方法, 其中, 所述封闭容器包括G-REX-100。

135. 根据权利要求102至134中任一项所述的方法, 其中, 在步骤(d)中, 以APC:TIL为25:1至100:1的比率, 将抗原呈递细胞(APC)添加到第二TIL群的细胞培养基中。

136. 根据权利要求135所述的方法, 其中, 所述细胞培养基具有 2.5×10^9 个APC: 100×10^6 个TIL的比率。

137. 根据权利要求102至134中任一项所述的方法, 其中, 在步骤(c)中, 以APC:TIL为25:1至100:1的比率, 将抗原呈递细胞APC添加至第二TIL群的细胞培养基中。

138. 根据权利要求137所述的方法, 其中, 所述细胞培养基具有 2.5×10^9 个APC: $100 \times$

10^6 个TIL的比率。

139. 根据权利要求102至138中任一项所述的方法,其中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,所述细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。

140. 根据权利要求139所述的方法,其中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。

141. 根据权利要求139所述的方法,其中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。

142. 根据权利要求102至141中任一项所述的方法,其中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。

143. 根据权利要求102至141中任一项所述的方法,其中,对所述第一次扩增的TIL或所述第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

144. 根据权利要求102至141中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑在所述第一次扩增之后和所述第二次扩增之前进行。

145. 根据权利要求102至141中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑在步骤(b)之前、步骤(c)之前或步骤(d)之前进行。

146. 根据权利要求102至145中任一项所述的方法,其中,在所述第一次扩增和/或所述第二次扩增期间,所述细胞培养基包含OKT-3;以及在将OKT-3引入所述细胞培养基之前进行基因编辑。

147. 根据权利要求102至145中任一项所述的方法,其中,在所述第一次扩增和/或所述第二次扩增期间,所述细胞培养基包含OKT-3;以及在将OKT-3引入所述细胞培养基之后进行基因编辑。

148. 根据权利要求102至145中任一项所述的方法,其中,从所述第一次扩增起始日开始,所述细胞培养基包含OKT-3;以及在TIL暴露于OKT-3之后进行基因编辑。

149. 根据权利要求102至148中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

150. 根据权利要求149所述的方法,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

151. 根据权利要求149所述的方法,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

152. 根据权利要求102至148中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

153. 根据权利要求102至152中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断

裂。

154. 根据权利要求102至152中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

155. 根据权利要求102至152中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括CRISPR法。

156. 根据权利要求155所述的方法, 其中, 所述CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

157. 根据权利要求102至152中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括TALE法。

158. 根据权利要求102至152中任一项所述的方法, 其中, 所述基因编辑包括锌指法。

159. 用于治疗患有癌症的受试者的扩增的TIL群, 其中, 所述扩增的TIL群是可通过包括以下步骤的方法获得的第三TIL群:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片, 由受试者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增, 产生第二TIL群; 其中, 第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行; 第一次扩增进行约3天至14天, 获得第二TIL群; 所述第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍; 从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增, 产生第三TIL群; 其中, 第二次扩增进行约7天至14天, 获得第三TIL群; 第三TIL群是治疗性TIL群; 第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行; 从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 收获从步骤(d)获得的治疗性TIL群; 其中, 从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生; 以及

(f) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋; 其中, 从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;

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

(h) 在所述方法期间的任何时间, 对至少一部分TIL进行基因编辑。

160. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群, 其中, 所述方法还包括权利要求1至158中任一项所述的一种以上特征。

161. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群, 其中, 在第一次扩增、第二次扩增或两者期间, 所述细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。

162. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群, 其中, 对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。

163. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群, 其中, 对所述第一次扩增的TIL或所述第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

164. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群, 其中, 所述基因编辑在所述第一次扩增之后和所述第二次扩增之前进行。

165. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群, 其中, 所述基因编辑在步骤(c)之前、步骤(d)之前或步骤(e)之前进行。

166. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群,其中,所述基因编辑使至少一部分扩增的TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

167. 根据权利要求166所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

168. 根据权利要求166所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群,其中,所述一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

169. 根据权利要求166所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群,其中,所述基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

170. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群,其中,所述基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。

171. 根据权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群,其中,所述基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

172. 冷冻保存组合物,其中,所述冷冻保存组合物包含:权利要求159所述的用于治疗患有癌症的受试者的TIL群、包含DMSO的冷冻保护剂和电解质溶液。

173. 根据权利要求172所述的冷冻保存组合物,其中,所述冷冻保存组合物还包含一种以上稳定剂和一种以上淋巴细胞生长因子。

174. 根据权利要求173所述的冷冻保存组合物,其中,所述一种以上稳定剂包括人血清白蛋白HSA,所述一种以上淋巴细胞生长因子包括IL-2。

175. 根据权利要求174所述的冷冻保存组合物,其中,包含DMSO的冷冻保护剂和电解质溶液以约1.1:1至约1:1.1的比率存在。

176. 根据权利要求174所述的冷冻保存组合物,其中,所述冷冻保存组合物包含:约 1×10^6 至约 9×10^{14} 的TIL群、约30mL至约70mL的包含DMSO的冷冻保护剂、约30mL至约70mL的电解质溶液、约0.1g至约1.0g的HSA和约0.001mg至约0.005mg的IL-2。

177. 将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法,包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含OKT-3和/或4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 可选地添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞 (APC) 进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;第二次扩增在提供第二透气表面积 of 的封闭容器中进行;从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF (BR3) 及它们的组合的分子的表达。

178. 根据权利要求177所述的方法,其中,所述方法包括:通过在包含IL-2、OKT-3和4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增;其中,从第0天或第1天开始,OKT-3和4-1BB激动剂抗体可选地存在于细胞培养基中。

179. 根据权利要求177或178所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB及它们的组合的分子的表达。

180. 根据权利要求177或178所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制PD-1的表达。

181. 根据权利要求177或178所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制LAG-3的表达。

182. 根据权利要求177或178所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制TIM-3的表达。

183. 根据权利要求177或178所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制CISH的表达。

184. 根据权利要求177或178所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统,用于抑制CBLB的表达。

185. 根据权利要求177至184中任一项所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统。

186. 根据权利要求177至184中任一项所述的方法,其中,所述电穿孔步骤包括递送转

录激活因子样效应物 (TALE) 系统。

187. 根据权利要求177至184中任一项所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送锌指系统。

188. 根据权利要求177至187中任一项所述的方法, 其中, 所述基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基包含DMSO、电解质溶液、可选的HSA和可选的IL-2。

189. 治疗患有癌症的受试者的方法, 所述方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL), 所述方法包括以下步骤:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片, 由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含OKT-3和/或4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天, 来进行第一次扩增;

(d) 可选地添加OKT-3, 产生第二TIL群; 其中, 第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行; 其中, 第一次扩增进行约1天至3天, 获得第二TIL群; 第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍; 从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤; 其中, 无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞 (APC) 进行第二次扩增, 产生第三TIL群; 其中, 第二次扩增进行约7天至11天, 获得第三TIL群; 第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行; 从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群, 提供收获的TIL群; 其中, 从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生; 其中, 收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋; 其中, 从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群; 以及

(k) 从输液袋向患者施用治疗有效剂量的收获的TIL群;

其中, 电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF (BR3) 及它们的组合的分子的表达。

190. 根据权利要求189所述的方法, 其中, 所述方法包括: 通过在包含IL-2、OKT-3和4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增; 其中, 从第0天或第1天开始, OKT-3和4-1BB激动剂抗体可选地存在于细胞培养基中。

191. 根据权利要求189或190所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB及它们的组合的分子的表达。

192. 根据权利要求189或190所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑

制PD-1的表达。

193. 根据权利要求189或190所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑制LAG-3的表达。

194. 根据权利要求189或190所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑制TIM-3的表达。

195. 根据权利要求189或190所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑制CISH的表达。

196. 根据权利要求189或190所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统、转录激活因子样效应物 (TALE) 系统或锌指系统, 用于抑制CBLB的表达。

197. 根据权利要求189至196中任一项所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统。

198. 根据权利要求189至196中任一项所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送转录激活因子样效应物 (TALE) 系统。

199. 根据权利要求189至196中任一项所述的方法, 其中, 所述电穿孔步骤包括递送锌指系统。

200. 根据权利要求189至196中任一项所述的方法, 其中, 所述基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基包含DMSO、电解质溶液、可选的HSA和可选的IL-2。

201. 用于治疗患有癌症的受试者的扩增的TIL群, 其中, 所述扩增的TIL群是可由包括以下步骤的方法获得的收获的TIL群:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片, 由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含OKT-3和/或4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天, 来进行第一次扩增;

(d) 可选地添加OKT-3, 产生第二TIL群; 其中, 第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行; 第一次扩增进行约1天至3天, 获得第二TIL群; 第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍; 从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤; 其中, 无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞 (APC) 进行第二次扩增, 产生第三TIL群; 其中, 第二次扩增进行约7天至11天, 获得第三TIL群; 第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行; 从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群, 提供收获的TIL群; 其中, 从步骤(g)到步骤(h)

的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砷的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的分子的表达。

202. 根据权利要求201所述的扩增的TIL群,包括:通过在包含IL-2、OKT-3和4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增;其中,从第0天或第1天开始,OKT-3和4-1BB激动剂抗体可选地存在于细胞培养基中。

203. 根据权利要求201或202所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB及它们的组合的分子的表达。

204. 根据权利要求201或202所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制PD-1的表达。

205. 根据权利要求201或202所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制LAG-3的表达。

206. 根据权利要求201或202所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制TIM-3的表达。

207. 根据权利要求201或202所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制CISH的表达。

208. 根据权利要求201或202所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制CBLB的表达。

209. 根据权利要求201至208所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统。

210. 根据权利要求201至208所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括传递转录激活因子样效应物(TALE)系统。

211. 根据权利要求201至208所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括递送锌指系统。

212. 根据权利要求201至211所述的扩增的TIL群,其中,所述基于二甲基亚砷的冷冻保存培养基包含DMSO、电解质溶液、可选的HSA和可选的IL-2。

213. 根据权利要求201至211所述的扩增的TIL群,其中,所述电穿孔步骤包括脉冲电穿孔步骤。

214. 根据权利要求1至58中任一项所述的方法,其中,所述基因编辑包括CRISPR法,所

述CRISPR法包括使用高保真Cas9。

肿瘤浸润淋巴细胞的基因编辑及其在免疫治疗中的用途

技术领域

[0001] 本文描述了扩增肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 并产生治疗性TIL群的方法。此外,本文公开了基因编辑TIL的方法以及经基因编辑的TIL在治疗疾病 (例如癌症) 中的用途。

背景技术

[0002] 使用过继性转移的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL, tumor infiltrating lymphocyte) 治疗大体积、难治性的癌症代表了一种治疗预后不良患者的有效方法。Gattinoni等, Nat. Rev. Immunol., 2006, 6, 383-393。成功的免疫治疗需要大量的TIL, 商业化需要稳健可靠的方法。由于细胞扩增的技术、物流和监管问题, 这是一项需要实现的挑战。由于其速度和效率, 基于IL-2的TIL扩增、随后进行“快速扩增过程” (REP, rapid expansion process) 已成为TIL扩增的优选方法。Dudley等, Science, 2002, 298, 850-54; Dudley等, J. Clin. Oncol., 2005, 23, 2346-57; Dudley等, J. Clin. Oncol., 2008, 26, 5233-39; Riddell等, Science 1992, 257, 238-41; Dudley等, J. Immunother., 2003, 26, 332-42。REP可以在14天内使TIL扩增1000倍, 尽管它需要通常来自多个供体的、大量过量 (例如200倍) 的经辐照的同种异体外周血单核细胞 (PBMC, peripheral blood mononuclear cell), 也称为单核细胞 (MNC)) 作为饲养细胞 (feeder cell), 以及抗CD3抗体 (OKT3) 和高剂量的IL-2。Dudley等J. Immunother. 2003, 26, 332-42。经历REP程序的TIL在黑色素瘤患者的宿主免疫抑制后产生了成功的过继性细胞治疗。目前的输注接受参数 (infusion acceptance parameter) 依赖于TIL组成的读数 (例如CD28、CD8或CD4阳性) 以及REP产物的倍数扩增和活力。

[0003] 目前的TIL生产方法受到时长、成本、无菌问题以及本文所述的其他因素的限制, 使得此类方法商业化的潜力受到严重限制, 并且由于这些和其他原因, 目前尚无商业方法可用。迫切需要提供TIL生产方法和基于此种方法的治疗, 其适用于商业规模生产, 并获得在多个临床中心用于人类患者的监管批准。此外, 迫切需要能改善患者的反应率和反应强度的更有效的TIL治疗。

发明内容

[0004] 本发明提供了扩增TIL并产生治疗性TIL群的方法。根据示例性实施方式, 对治疗性TIL群的至少一部分进行基因编辑以增强其治疗效果。

[0005] 在一个实施方式中, 本发明提供了将肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 扩增成治疗性TIL群的方法, 该方法包括以下步骤:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片, 由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增, 产生第二TIL群; 其中, 第一次扩增在提供第一透气表面积 of 的封闭容器中进行; 其中, 第一次扩增进行约3天至14天, 获得第二TIL群; 其中, 第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少

50倍;其中,从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至14天,获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 收获从步骤(d)获得的治疗性TIL群;其中,从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生;

(f) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(g) 在该方法期间的任何时间,对至少一部分TIL进行基因编辑。

[0006] 在一些实施方式中,该方法还包括以下步骤:使用冷冻保存方法冷冻保存来自步骤(f)的包含收获的TIL群的输液袋。

[0007] 在一些实施方式中,冷冻保存方法使用1:1比率的收获的TIL群与冷冻保存培养基进行。

[0008] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,PBMC是经辐照且同种异体的。在一些实施方式中,在步骤(d)的第9天至第14天中的任何一天将PBMC添加到细胞培养基中。在一些实施方式中,抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

[0009] 在一些实施方式中,步骤(e)中的收获使用基于膜的细胞处理系统进行。

[0010] 在一些实施方式中,步骤(e)中的收获使用LOVO细胞处理系统进行。

[0011] 在一些实施方式中,多个碎片包括约4个至约50个碎片;其中,每个碎片的体积为约27mm³。

[0012] 在一些实施方式中,多个碎片包括约30个至约60个碎片,碎片总体积为约1300mm³至约1500mm³。

[0013] 在一些实施方式中,多个碎片包括约50个碎片,碎片总体积为约1350mm³。

[0014] 在一些实施方式中,多个碎片包括约50个碎片,碎片总质量为约1克至约1.5克。

[0015] 在一些实施方式中,在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供细胞培养基。

[0016] 在一些实施方式中,步骤(d)中的细胞培养基还包含IL-15和/或IL-21。

[0017] 在一些实施方式中,IL-2浓度为约10,000IU/mL至约5,000IU/mL。

[0018] 在一些实施方式中,IL-15浓度为约500IU/mL至约100IU/mL。

[0019] 在一些实施方式中,IL-21浓度为约20IU/mL至约0.5IU/mL。

[0020] 在一些实施方式中,步骤(f)中的输液袋是含有HypoThermosol的输液袋。

[0021] 在一些实施方式中,冷冻保存培养基包含二甲基亚砜(DMSO)。在一些实施方式中,冷冻保存培养基包含7%至10%的二甲基亚砜(DMSO)。

[0022] 在一些实施方式中,步骤(c)中的第一阶段和步骤(e)中的第二阶段各自在10天、11天或12天内进行。

[0023] 在一些实施方式中,步骤(c)中的第一阶段和步骤(e)中的第二阶段各自在11天内进行。

[0024] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行约10天至约22天。

[0025] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行约20天至约22天。

- [0026] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行约15天至约20天。
- [0027] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行约10天至约20天。
- [0028] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行约10天至约15天。
- [0029] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行22天以下。
- [0030] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行20天以下。
- [0031] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行15天以下。
- [0032] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)进行10天以下。
- [0033] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(f)和冷冻保存进行22天以下。
- [0034] 在一些实施方式中,在步骤(e)中收获的治疗性TIL群包含足以达到TIL的治疗有效剂量的TIL。
- [0035] 在一些实施方式中,足以达到治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。
- [0036] 在一些实施方式中,步骤(b)至步骤(e)在单个容器中进行;其中,与在超过一个的容器中进行步骤(b)至步骤(e)相比,在单个容器中进行步骤(b)至步骤(e)使得每个切除的肿瘤的TIL产量增加。
- [0037] 在一些实施方式中,在步骤(d)的第二阶段期间,在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。
- [0038] 在一些实施方式中,当给受试者施用,步骤(d)中的第三TIL群提供增加的疗效、增加的干扰素- γ 产量、增加的多克隆性(polyclonality)、增加的平均IP-10和/或增加的平均MCP-1。
- [0039] 在一些实施方式中,当给受试者施用,步骤(d)中的第三TIL群提供至少5倍以上的干扰素- γ 产量。
- [0040] 在一些实施方式中,步骤(d)中的第三TIL群是治疗性TIL群,相对于第二TIL群,该治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,该治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。
- [0041] 在一些实施方式中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自第三TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出:CD57表达增加和CD56表达降低。
- [0042] 在一些实施方式中,与开放系统相比,所述方法降低了微生物污染的风险。
- [0043] 在一些实施方式中,将来自步骤(g)的TIL输注到患者体内。
- [0044] 在一些实施方式中,多个碎片包括约4个碎片。
- [0045] 在一些实施方式中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。
- [0046] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。
- [0047] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。
- [0048] 在一些实施方式中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因

编辑。

[0049] 在一些实施方式中,对第一次扩增的TIL或第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

[0050] 在一些实施方式中,基因编辑在第一次扩增之后且在第二次扩增之前进行。

[0051] 在一些实施方式中,基因编辑在步骤(c)之前、步骤(d)之前或步骤(e)之前进行。

[0052] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之前进行基因编辑。

[0053] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0054] 在一些实施方式中,从第一次扩增起始日开始,细胞培养基包含OKT-3;在TIL暴露于OKT-3之后进行基因编辑。

[0055] 在一些实施方式中,基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

[0056] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

[0057] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

[0058] 在一些实施方式中,基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

[0059] 在一些实施方式中,基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。

[0060] 在一些实施方式中,基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指(zinc finger)法及它们的组合的一种以上方法。

[0061] 在一些实施方式中,基因编辑包括CRISPR法。

[0062] 在一些实施方式中,CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

[0063] 在一些实施方式中,基因编辑包括TALE法。

[0064] 在一些实施方式中,基因编辑包括锌指法。

[0065] 在另一个实施方式中,本发明还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括以下步骤:

(a) 通过将患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由受试者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次

扩增进行约3天至14天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至14天,获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 收获从步骤(d)获得的治疗性TIL群;其中,从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(f) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;

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

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

(i) 在该方法的步骤(a)至步骤(f)期间的任何时间,对至少一部分TIL进行基因编辑。

[0066] 在一些实施方式中,在步骤(e)收获的治疗性TIL群包含足以达到TIL在步骤(h)中施用的治疗有效剂量的TIL。

[0067] 在一些实施方式中,足以达到在步骤(h)中施用的治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

[0068] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞(APC)是PBMC。

[0069] 在一些实施方式中,在步骤(d)的第9天至第14天中的任何一天将PBMC添加到细胞培养基中。

[0070] 在一些实施方式中,在步骤(h)中施用治疗有效剂量的TIL细胞之前,已给患者施用了非清髓性(non-myeloablative)淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)方案。

[0071] 在一些实施方式中,非清髓性淋巴细胞耗竭方案包括以 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用环磷酰胺2天,然后以 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用氟达拉滨5天的步骤。

[0072] 在一些实施方式中,该方法还包括在步骤(h)中给患者施用TIL细胞后的第二天开始用高剂量IL-2方案治疗患者的步骤。

[0073] 在一些实施方式中,高剂量IL-2方案包括每8小时以15分钟静脉推注(bolus intravenous infusion)方式施用600,000IU/kg或720,000IU/kg,直至耐受。

[0074] 在一些实施方式中,步骤(d)中的第三TIL群是治疗性TIL群,相对于第二TIL群,该治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,该治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

[0075] 在一些实施方式中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出:CD57表达增加和CD56表达降低。

[0076] 在一些实施方式中,癌症选自:黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、肾癌和肾细胞癌。

[0077] 在一些实施方式中,癌症选自黑色素瘤、HNSCC、宫颈癌和NSCLC。

- [0078] 在一些实施方式中,癌症是黑色素瘤。
- [0079] 在一些实施方式中,癌症是HNSCC。
- [0080] 在一些实施方式中,癌症是宫颈癌。
- [0081] 在一些实施方式中,癌症是NSCLC。
- [0082] 在一些实施方式中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。
- [0083] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。
- [0084] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。
- [0085] 在一些实施方式中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。
- [0086] 在一些实施方式中,对第一次扩增的TIL或第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。
- [0087] 在一些实施方式中,基因编辑在第一次扩增之后且在第二次扩增之前进行。
- [0088] 在一些实施方式中,基因编辑在步骤(c)之前、步骤(d)之前或步骤(e)之前进行。
- [0089] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之前进行基因编辑。
- [0090] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之后进行基因编辑。
- [0091] 在一些实施方式中,从第一次扩增起始日开始,细胞培养基包含OKT-3;在TIL暴露于OKT-3之后进行基因编辑。
- [0092] 在一些实施方式中,基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。
- [0093] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。
- [0094] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。
- [0095] 在一些实施方式中,基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。
- [0096] 在一些实施方式中,基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。
- [0097] 在一些实施方式中,基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

[0098] 在一些实施方式中,基因编辑包括CRISPR法。

[0099] 在一些实施方式中,CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

[0100] 在一些实施方式中,基因编辑包括TALE法。

[0101] 在一些实施方式中,基因编辑包括锌指法。

[0102] 在另一个实施方式中,本发明还提供一种将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 将来自患者切除肿瘤的经处理的肿瘤碎片加入封闭系统中,获得第一TIL群;

(b) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约3天至14天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(a)到步骤(b)的转变在不打开系统的情况下发生;

(c) 通过向第二TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至14天,获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 收获从步骤(c)获得的治疗性TIL群;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 将步骤(d)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(f) 在该方法期间的任何时间,对至少一部分TIL进行基因编辑。

[0103] 在一些实施方式中,在步骤(d)中收获的治疗性TIL群包含足以达到TIL的治疗有效剂量的TIL。

[0104] 在一些实施方式中,足以达到治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

[0105] 在一些实施方式中,该方法还包括以下步骤:使用冷冻保存方法冷冻保存包含收获的TIL群的输液袋。

[0106] 在一些实施方式中,冷冻保存方法使用1:1比率的收获的TIL群与冷冻保存培养基进行。

[0107] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[0108] 在一些实施方式中,PBMC是经辐照且同种异体的。

[0109] 根据权利要求68的方法,其中,在步骤(c)的第9天至第14天中的任何一天将PBMC添加到细胞培养基中。

[0110] 在一些实施方式中,抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

[0111] 在一些实施方式中,使用LOVO细胞处理系统进行步骤(d)中的收获。

[0112] 在一些实施方式中,多个碎片包括约4个至约50个碎片;其中,每个碎片的体积为约 27mm^3 。

[0113] 在一些实施方式中,多个碎片包括约30个至约60个碎片,碎片总体积为约 1300mm^3 至约 1500mm^3 。

[0114] 在一些实施方式中,多个碎片包括约50个碎片,碎片总体积为约 1350mm^3 。

- [0115] 在一些实施方式中,多个碎片包括约50个碎片,碎片总质量为约1克至约1.5克。
- [0116] 在一些实施方式中,多个碎片包括约4个碎片。
- [0117] 在一些实施方式中,在选自G容器和Xuri细胞袋的容器中提供第二细胞培养基。
- [0118] 在一些实施方式中,步骤(e)中的输液袋是含有HypoThermosol的输液袋。
- [0119] 在一些实施方式中,步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自在10天、11天或12天内进行。
- [0120] 在一些实施方式中,步骤(b)中的第一阶段和步骤(c)中的第二阶段各自在11天内进行。
- [0121] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(e)进行约10天至约22天。
- [0122] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(e)进行约10天至约20天。
- [0123] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(e)进行约10天至约15天。
- [0124] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(e)进行22天以下。
- [0125] 在一些实施方式中,步骤(a)至步骤(e)和冷冻保存进行22天以下。
- [0126] 在一些实施方式中,步骤(b)至步骤(e)在单个容器中进行;其中,与在超过一个的容器中进行步骤(b)至步骤(e)相比,在单个容器中进行步骤(b)至步骤(e)使得每个切除的肿瘤的TIL产量增加。
- [0127] 在一些实施方式中,在步骤(c)的第二阶段期间,在不打开系统的情况下将抗原呈递细胞添加到TIL中。
- [0128] 在一些实施方式中,步骤(d)中的第三TIL群是治疗性TIL群,相对于第二TIL群,该治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;其中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自治疗性TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27+表达、CD28+表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。
- [0129] 在一些实施方式中,相对于获自第二细胞群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,获自治疗性TIL群的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出:CD57表达增加和CD56表达降低。
- [0130] 在一些实施方式中,与开放系统相比,所述方法降低了微生物污染的风险。
- [0131] 在一些实施方式中,将来自步骤(e)的TIL输注到患者体内。
- [0132] 在一些实施方式中,封闭容器包括单个生物反应器。
- [0133] 在一些实施方式中,封闭容器包括G-REX-10。
- [0134] 在一些实施方式中,封闭容器包括G-REX-100。
- [0135] 在一些实施方式中,在步骤(d)中,以APC:TIL为25:1至100:1的比率,将抗原呈递细胞(APC)添加到第二TIL群的细胞培养基中。
- [0136] 在一些实施方式中,细胞培养基具有 2.5×10^9 个APC: 100×10^6 个TIL的比率。
- [0137] 在一些实施方式中,在步骤(c)中,以APC:TIL为25:1至100:1的比率,将抗原呈递细胞(APC)添加至第二TIL群的细胞培养基中。
- [0138] 在一些实施方式中,细胞培养基具有 2.5×10^9 个APC: 100×10^6 个TIL的比率。
- [0139] 在一些实施方式中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。
- [0140] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行

基因编辑。

[0141] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。

[0142] 在一些实施方式中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。

[0143] 在一些实施方式中,对第一次扩增的TIL或第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

[0144] 在一些实施方式中,基因编辑在第一次扩增之后且在第二次扩增之前进行。

[0145] 在一些实施方式中,基因编辑在步骤(b)之前、步骤(c)之前或步骤(d)之前进行。

[0146] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之前进行基因编辑。

[0147] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0148] 在一些实施方式中,从第一次扩增起始日开始,细胞培养基包含OKT-3;在TIL暴露于OKT-3之后进行基因编辑。

[0149] 在一些实施方式中,基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

[0150] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

[0151] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

[0152] 在一些实施方式中,基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

[0153] 在一些实施方式中,基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。

[0154] 在一些实施方式中,基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

[0155] 在一些实施方式中,基因编辑包括CRISPR法。

[0156] 在一些实施方式中,CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

[0157] 在一些实施方式中,基因编辑包括TALE法。

[0158] 在一些实施方式中,基因编辑包括锌指法。

[0159] 在另一个实施方式中,本发明提供了已根据本文所述的任何扩增方法进行扩增的治疗性TIL群(例如,用于治疗受试者的癌症);其中,所述治疗性TIL群已被永久性基因编辑。

[0160] 在另一个实施方式中,本发明还提供一种用于治疗患有癌症的受试者的扩增的TIL群,其中,该扩增的TIL群是可通过包括以下步骤的方法获得的第三TIL群:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由受试者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约3天至14天,获得第二TIL群;其中,所述第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至14天,获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 收获从步骤(d)获得的治疗性TIL群;其中,从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(f) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;

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

(h) 在该方法期间的任何时间,对至少一部分TIL进行基因编辑。

[0161] 在一些实施方式中,上述方法还包括本文所述的任一方法和组合物中列举的一种以上特征。

[0162] 在一些实施方式中,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,细胞培养基还包含4-1BB激动剂和/或OX40激动剂。

[0163] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0164] 在一些实施方式中,在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。

[0165] 在一些实施方式中,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑。

[0166] 在一些实施方式中,对第一次扩增的TIL或第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑。

[0167] 在一些实施方式中,基因编辑在第一次扩增之后且在第二次扩增之前进行。

[0168] 在一些实施方式中,基因编辑在步骤(c)之前、步骤(d)之前或步骤(e)之前进行。

[0169] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之前进行基因编辑。

[0170] 在一些实施方式中,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0171] 在一些实施方式中,从第一次扩增起始日开始,细胞培养基包含OKT-3;在TIL暴露

于OKT-3之后进行基因编辑。

[0172] 在一些实施方式中,基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。

[0173] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

[0174] 在一些实施方式中,一种以上免疫检查点基因选自:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 和PKA。

[0175] 在一些实施方式中,基因编辑使至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强,所述免疫检查点基因选自:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

[0176] 在一些实施方式中,基因编辑包括使用可编程核酸酶,所述可编程核酸酶介导在所述一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂。

[0177] 在一些实施方式中,基因编辑包括选自CRISPR法、TALE法、锌指法及它们的组合的一种以上方法。

[0178] 在一些实施方式中,基因编辑包括CRISPR法。

[0179] 在一些实施方式中,CRISPR法是CRISPR/Cas9法。

[0180] 在一些实施方式中,基因编辑包括TALE法。

[0181] 在一些实施方式中,基因编辑包括锌指法。

[0182] 在另一个实施方式中,本发明提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法,该方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含OKT-3和/或4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 可选地添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器(gene editor)的转移;

(f) 使第二TIL群静息(resting)约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其

中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h)收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i)将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j)使用基于二甲基亚砷的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR,Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat)系统、转录激活因子样效应物(TALE,Transcription Activator-Like Effector)系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的分子的表达。

[0183] 在另一个实施方式中,本发明提供了治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),该方法包括以下步骤:

(a)通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b)将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c)通过在包含IL-2且可选地包含OKT-3和/或4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d)可选地添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e)对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f)使第二TIL群静息约1天;

(g)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h)收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i)将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;

(j)使用基于二甲基亚砷的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;以及

(k)从输液袋向患者施用治疗有效剂量的收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的分子的表达。

[0184] 在另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗患有癌症的受试者的扩增的TIL群,

其中,所述扩增的TIL群是可由包括以下步骤的方法获得的收获的TIL群:

(a) 通过将患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含OKT-3和/或4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 可选地添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及它们的组合的分子的表达。

[0185] 在一些实施方式中,该方法包括通过在包含IL-2、OKT-3和4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群来进行第一次扩增;其中,从第0天或第1天开始,OKT-3和4-1BB激动剂抗体可选地存在于细胞培养基中。

[0186] 在另一个实施方式中,本发明提供了冷冻保存组合物,该冷冻保存组合物包含用于治疗患有癌症的受试者的TIL群、包含DMSO的冷冻保护剂和电解质溶液。

[0187] 在一些实施方式中,冷冻保存组合物还可包含一种以上稳定剂(例如HSA)和一种以上淋巴细胞生长因子(例如IL-2)。

[0188] 在一些实施方式中,包含DMSO的冷冻保护剂和电解质溶液以约1.1:1至约1:1.1的比率存在。

[0189] 在一些实施方式中,冷冻保存组合物包含:约30mL至约70mL的包含DMSO的冷冻保护剂;约30mL至约70mL的电解质溶液;约0.1g至约1.0g的HAS以及约0.001mg至约0.005mg的IL-2。

附图说明

- [0190] 图1:显示了过程2A (22天的TIL生产过程)的一个实施方式的图。
- [0191] 图2:显示了TIL生产的1C过程和2A过程的实施方式之间的比较。
- [0192] 图3:显示了1C过程的时间线。
- [0193] 图4:显示了使用更高细胞计数的过程2A进行TIL生产的TIL治疗的一个实施方式的过程,包括施用步骤和联合治疗步骤。
- [0194] 图5:显示了使用更低细胞计数的过程2A进行TIL生产的TIL治疗的一个实施方式的过程,包括施用步骤和联合治疗步骤。
- [0195] 图6:显示了2A过程的一个实施方式的详细示意图。
- [0196] 图7a、7b和7c:描述了包括冷冻保存步骤的过程2A的实施方式的主要步骤。
- [0197] 图8:描述了临床试验设计,包括用过程1C和过程2A的实施方式治疗的队列。
- [0198] 图9:概述了步骤A至步骤F的过程2A的示例性图。
- [0199] 图10:关于过程2A数据收集计划的过程流程图。
- [0200] 图11:快速扩增方案 (REP) 的示例性实施方式的方案。到达后,破碎肿瘤,将肿瘤碎片放入加有IL-2的G-REX烧瓶中进行TIL扩增 (pre-REP扩增),持续11天。对于三重混合物 (triple cocktail) 研究,在pre-REP开始时添加IL-2/IL-15/IL-21。对于快速扩增方案 (REP),将TIL与饲养细胞和OKT3一起培养,REP扩增另外的11天。
- [0201] 图12:显示了过程2A (22天的TIL生产过程)的实施方式的图。
- [0202] 图13:过程1C和过程2A的示例性实施方式的步骤A至步骤F的比较表。
- [0203] 图14:过程1C的一个实施方式和过程2A的一个实施方式的详细比较。
- [0204] 图15:TIL治疗过程的一个实施方式的详细方案。
- [0205] 图16:冷冻保存的TIL的生产过程 (22天) 的一个实施方式的描述。
- [0206] 图17:从Gen 1到Gen 2的过程改进的表。
- [0207] 图18:本发明的TIL生产过程的一个实施方式。
- [0208] 图19:过程2A的过程流程图。
- [0209] 图20:TIL生产过程的一个实施方式的描述,包括与基因编辑过程 (包括本文所述的TALEN法、锌指核酸酶法和CRISPR法) 一起使用的电穿孔步骤。
- [0210] 图21:TIL生产过程的实施方式的描述,包括与基因编辑过程 (包括本文所述的TALEN法、锌指核酸酶法和CRISPR法) 一起使用的电穿孔步骤。
- [0211] 图22:显示了结构I-A和I-B,圆柱表示单个多肽结合结构域。结构I-A和结构I-B包含三个线性连接的TNFRSF结合结构域 (其来自例如4-1BBL或与4-1BB结合的抗体),这些结构域折叠形成三价蛋白,然后通过IgG1-Fc (包括C_H3和C_H2结构域) 与第二个三价蛋白连接,然后通过二硫键 (小的细长椭圆) 将两个三价蛋白连接在一起,从而稳定结构,提供能将六个受体的细胞内信号传导结构域和信号传导蛋白结合在一起形成信号传导复合体的激动剂。TNFRSF结合结构域 (表示为圆柱) 可以是scFv结构域,其包括例如通过接头连接的VH和VL链,该接头可以包含亲水性残基和Gly和Ser序列 (用于柔韧性) 以及Glu和Lys (用于溶解性)。
- [0212] 图23:描述了靶向Pdcd1基因的外显子2的TALEN构建体。

具体实施方式

一、介绍

[0213] 利用通过快速扩增方案 (REP) 离体培养的TIL的过继性细胞治疗已经在宿主免疫抑制后的黑色素瘤患者中产生了成功的过继性细胞治疗。目前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数 (例如CD28、CD8或者CD4阳性) 以及REP产物的扩增数值倍数和活力。

[0214] 目前的REP方案很少考虑将被输注到患者体内的TIL的健康状况。T细胞在从幼稚T细胞到效应T细胞的成熟过程中经历了深刻的代谢转变 (参见Chang等, Nat. Immunol. 2016, 17, 364, 在此明确地整体并入, 特别是对于厌氧和有氧代谢的讨论和标志物)。例如幼稚T细胞依靠线粒体呼吸产生ATP, 而成熟、健康的效应T细胞如TIL是高度糖酵解的, 依靠有氧糖酵解提供它们增殖、迁移、活化和抗肿瘤疗效所需的生物能量学底物。

[0215] 先前论文报道, 在转移前限制TIL中的糖酵解和促进TIL中的线粒体代谢是期望的, 因为严重依赖糖酵解的细胞在过继性转移时会遭受营养缺乏, 这会导致大部分转移的细胞死亡。因此, 本领域教导, 促进线粒体代谢可能会促进体内寿命, 并且事实上建议在诱导免疫应答之前使用糖酵解抑制剂。参见Chang等 (Chang等, Nat. Immunol. 2016, 17 (364), 574-582)。

[0216] 在一些实施方式中, 本发明还涉及评价和量化代谢健康的此种增加的方法。因此, 本发明提供了使用代谢的一种以上常规评价来检测TIL群的相对健康的方法, 该方法包括但不限于糖酵解、氧化磷酸化、备用呼吸能力 (SRC) 和糖酵解储备的速率和量。

[0217] 此外, 在一些实施方式中, 本发明还涉及评价和量化代谢健康的此种增加的方法。因此, 本发明提供了使用代谢的一种以上常规评价来检测TIL群的相对健康的方法, 该方法包括但不限于糖酵解、氧化磷酸化、备用呼吸能力 (SRC) 和糖酵解储备的速率和量。

[0218] 此外, 可选的另外评价包括但不限于ATP产生、线粒体质量和葡萄糖摄取。

[0219] 在一些实施方式中, 本发明还涉及使用基因编辑技术来增强TIL的治疗效果。虽然肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的过继性转移提供了一种有前景望且有效的治疗, 但仍强烈需要能提高患者的反应率和反应强度的更有效的TIL治疗。如本文所述, 本发明的实施方式提供了将TIL扩增成治疗性TIL群的方法, 该治疗性TIL群经基因编辑以提供增强的治疗效果。

二、定义

[0220] 除非另有定义, 否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常所理解的相同含义。本文提及的所有专利和出版物均通过引用整体并入本文。

[0221] 术语“体内”指发生在受试者体内的事件。

[0222] 术语“体外”指在受试者体外发生的事件。体外检测包括使用活细胞或死细胞的基于细胞的检测, 并且还可以包括不使用完整细胞的无细胞检测。

[0223] 术语“离体”指涉及对已从受试者体内移除的细胞、组织和/或器官进行治疗或进行手术的事件。适当地, 该细胞、组织和/或器官可通过手术或治疗方法返回到受试者的身体。

[0224] 术语“快速扩增”指在一周的时间内抗原特异性TIL的数量增加至少约3倍 (或者4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或者9倍), 更优选在一周的时间内增加至少约10倍 (或者20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或者90倍), 或者最优选在一周的时间内增加至少约100倍。下

文概述了许多快速扩增方案。

[0225] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或者“TIL”指最初作为白细胞获得的细胞群，它们已经离开受试者的血流并迁移至肿瘤。TIL包括但不限于CD8⁺细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1和Th17 CD4⁺T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包括原代TIL和次代TIL。“原代TIL”是如本文所述从患者组织样品中获得的那些(有时称为“新鲜收获的”)，“次代TIL”是如本文所讨论的已经扩增或者增殖的任何TIL细胞群，包括但不限于大量TIL(bulk TIL)和扩增的TIL(“REP TIL”或者“post-REP TIL”)。TIL细胞群可以包括经基因修饰(genetically modified)的TIL。

[0226] 本文的“细胞群”(包括TIL)指许多具有共同特征的细胞。通常，群的数量通常为 1×10^6 至 1×10^{10} ，不同的TIL群包含不同的数量。例如，在IL-2存在下，原代TIL的初始增长产生约 1×10^8 个细胞的大量TIL群。通常，进行REP扩增以提供 1.5×10^9 至 1.5×10^{10} 个细胞的群用于输注。

[0227] 本文的“冷冻保存的TIL”指在约-150℃至-60℃范围内进行处理和储存的原代、大量或扩增的TIL(REP TIL)。用于冷冻保存的一般方法也在本文其他地方描述，包括在实施例中。为清楚起见，“冷冻保存的TIL”能够与可用作原代TIL来源的冷冻组织样品区分开。

[0228] 本文的“解冻的冷冻保存的TIL”指先前被冷冻保存然后被处理以恢复至室温以上温度(包括但不限于细胞培养温度或可将TIL施用于患者的温度)的TIL群。

[0229] TIL通常可以利用细胞表面标志物在生物化学上定义，或者通过其浸润肿瘤和影响治疗的能力在功能上来定义。TIL通常可通过表达以下生物标志物中的一种以上来分类：CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。此外，或者，TIL可通过在重新引入患者后其浸润实体瘤的能力在功能上定义。

[0230] 术语“冷冻保存培养基(cryopreservation media)”或者“冷冻保存培养基(cryopreservation medium)”指可用于细胞的冷冻保存的任何培养基。此类培养基可以包括包含7%至10%DMSO的培养基。示例性的培养基包括CryoStor CS10、Hyperthermasol以及它们的组合。术语“CS10”指购自Stemcell Technologies或者Biolife Solutions的冷冻保存培养基。CS10培养基可以用商品名“CryoStor[®] CS10”来指代。CS10培养基是包含DMSO的无血清无动物成分的培养基。

[0231] 术语“中枢记忆T细胞”指人细胞中CD45R0⁺并且组成性地表达CCR7(CCR7^高)和CD62L(CD62^高)的T细胞亚群。中枢记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中枢记忆T细胞的转录因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2和BMI1。在TCR触发后，中枢记忆T细胞主要分泌IL-2和CD40L作为效应分子。中枢记忆T细胞在血液中的CD4区室(compartment)中占优势，在人体中按比率富集在淋巴结和扁桃体。

[0232] 术语“效应记忆T细胞”指人或哺乳动物T细胞的亚群，其与中枢记忆T细胞一样，为CD45R0⁺，但丧失CCR7的组成型表达(CCR7^低)，并且异质性或CD62L的表达低(CD62L^低)。中枢记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中枢记忆T细胞的转录因子包括BLIMP1。效应记忆T细胞在抗原刺激后迅速分泌高水平的炎性细胞因子，包括干扰素- γ 、IL-4和IL-5。效应记忆T细胞在血液的CD8区室中占优势，在人体中在肺、肝和肠中按比率富集。CD8⁺效应记忆T细胞携带大量的穿孔素。

[0233] 术语“封闭系统”指的是对外部环境封闭的系统。适用于细胞培养方法的任何封闭

系统均可用于本发明的方法。封闭系统包括例如但不限于封闭的G容器。一旦将肿瘤碎片加入封闭系统中,系统就不会向外部环境开放,直至TIL准备好施用于患者。

[0234] 本文用于描述破坏肿瘤的方法的术语“碎片化”(fragmenting)、“碎片化”(fragment)和“经碎片化”(fragmented)包括机械破碎方法,例如破碎、切片、分割和粉碎肿瘤组织,以及任何其他破坏肿瘤组织的物理结构的方法。

[0235] 术语“外周血单核细胞”和“PBMC”指具有圆形细胞核的外周血细胞,包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞。优选地,外周血单核细胞是辐照的同种异体外周血单核细胞。PBMC是一种抗原呈递细胞。

[0236] 术语“抗CD3抗体”指抗体或者它的变体(例如单克隆抗体),包括:针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中CD3受体的人、人源化、嵌合或者鼠抗体。抗CD3抗体包括OKT-3,也称为莫罗单抗(Muromonab)。抗CD3抗体还包括UHCT1克隆,也称为T3和CD3ε。其他抗CD3抗体包括例如奥特昔珠单抗(otelixizumab)、特普利珠单抗(teplizumab)和威司利珠单抗(visilizumab)。

[0237] 术语“OKT-3”(在本文中也称为“OKT3”)指单克隆抗体或者其生物类似物或者变体,包括针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中CD3受体的人、人源化、嵌合或者鼠抗体,还包括市售形式,如OKT-3(30ng/mL,纯MACS GMP CD3,Miltenyi Biotech,Inc.,美国加利福尼亚州圣地亚哥)和莫罗单抗,或者其变体、保守性氨基酸取代、糖型(glycoform)或者生物类似物。莫罗单抗的重链和轻链的氨基酸序列在表1中给出(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)。能够产生OKT-3的杂交瘤保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC,American Type Culture Collection),并且其分配的ATCC登录号为CRL 8001。能够产生OKT-3的杂交瘤也保藏在欧洲认证细胞培养物保藏中心(ECACC,European Collection of Authenticated Cell Cultures)中,并且其分配的目录号为86022706。抗CD3抗体还包括UHCT1克隆(购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend),也称为T3和CD3ε。

表1:莫罗单抗的氨基酸序列

识别号	序列(单字母氨基酸符号)		
SEQ ID NO: 1 莫罗单抗重链	QVQLQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY		60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA		120
	KTTPASVYPL APVCGGTTGS SVTLGLCLKG 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 ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW		420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK		450
SEQ ID NO: 2 莫罗单抗轻链	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASASSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH		60
	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS		120
	SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLT		180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC		213

[0238] 术语“IL-2”(在本文中也称为“IL2”)指称为白细胞介素-2的T细胞生长因子,包括所有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式,保守氨基酸取代、糖型、生物类似物及其变体。IL-2描述于例如Nelson,J.I Immunol.2004,172,3983-88和Malek,Annu.Rev.I Immunol.2008,26,453-79,其公开内容其内容通过引用并入本文。适用于本发明的重组人

IL-2的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:3)。例如,术语IL-2包括人类重组形式的IL-2,例如,阿地白细胞介素(PROLEUKIN,可购自多个供应商,每个单独使用的小管2200万IU),以及可购自美国新罕布什尔州朴茨茅斯的CellGenix,Inc.(CELLGRO GMP)或美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-209-b)的重组形式的IL-2和其他供应商的其他商业等价物。阿地白细胞介素(des-alanyl-1,丝氨酸-125人IL-2)是IL-2的非糖基化人重组形式,分子量约为15kDa。适用于本发明的阿地白细胞介素的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:4)。术语IL-2还包括如本文所述的聚乙二醇化形式的IL-2,包括聚乙二醇化的IL2前药NKTR-214,可购自美国加利福尼亚州南旧金山的Nektar Therapeutics公司。适用于本发明的NKTR-214和聚乙二醇化IL-2描述于美国专利申请公开号US2014/0328791A1和国际专利申请公开号W02012/065086A1中,其公开内容其内容通过引用并入本文。适用于本发明的缀合的IL-2的替代形式描述于美国专利4,766,106、5,206,344、5,089,261和4,902,502中,其公开内容其内容通过引用并入本文。适用于本发明的IL-2制剂描述于美国专利号6,706,289中,其公开内容其内容通过引用并入本文。

表2:白细胞介素的氨基酸序列

识别号	序列 (单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO: 3 重组人 IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLL DLQMLNNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO: 4 阿地白细胞介素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISINIV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO: 5 重组人 IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNLSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLTKI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO: 6 重组人 IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTITL LNCTGQVKGR KPAALGEAQF TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLQEI K TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO: 7 重组人 IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLES GDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO: 8 重组人 IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRM QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVS I KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

[0239] 术语“IL-4”(在本文中也称为“IL4”)指称为白细胞介素4的细胞因子,其由Th2 T细胞和嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生。IL-4调节幼稚辅助性T细胞(Th0细胞)向Th2 T细胞的分化。Steinke和Borish,Respir.Res.2001,2,66-70。在被IL-4活化后,Th2 T细胞随后在正反馈环中产生另外的IL-4。IL-4还刺激B细胞增殖和II类MHC表达,并诱导B细胞转换为IgE和IgG1表达。适用于本发明的重组人IL-4可购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-211)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-15重组蛋白,目录号Gibco CTP0043)。适用于本发明的重组人IL-4的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:5)。

[0240] 术语“IL-7”(在本文中也称为“IL7”)指称为白细胞介素7的糖基化组织衍生细胞因子,其可以从基质细胞和上皮细胞以及树突状细胞中获得。Fry和Mackall,Blood 2002,99,3892-904。IL-7可以刺激T细胞的生长。IL-7与IL-7受体结合,IL-7受体是由IL-7受体 α 和常见 γ 链受体(common gamma chain receptor)组成的异二聚体,其在一系列信号中

对胸腺内的T细胞发育和外周存活具有重要作用。适用于本发明的重组人IL-4可购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-254)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-15重组蛋白,目录号Gibco PHC0071)。适用于本发明的重组人IL-7的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:6)。

[0241] 术语“IL-15”(在本文中也称为“IL15”)指称为白细胞介素-15的T细胞生长因子,包括所有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式,保守氨基酸取代、糖型、生物类似物及其变体。IL-15描述于例如Fehniger和Caligiuri,Blood 2001,97,14-32中,其公开内容其内容通过引用并入本文。IL-15与IL-2共享 β 和 γ 信号传导受体亚单位。重组人IL-15是非糖基化多肽单链,含有114个氨基酸(和N-末端甲硫氨酸),分子量为12.8kDa。重组人IL-15可购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-230-b)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-15重组蛋白,目录号34-8159-82)。适用于本发明的重组人IL-15的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:7)。

[0242] 术语“IL-21”(在本文中也称为“IL21”)指称为白细胞介素-21的多效细胞因子蛋白,包括所有形式的IL-21,包括人和哺乳动物形式,保守氨基酸取代、糖型、生物类似物及其变体。IL-21描述于例如Spolski和Leonard,Nat.Rev.Drug.Disc.2014,13,379-95,其公开内容其内容通过引用并入本文。IL-21主要由自然杀伤T细胞和活化的人CD4⁺T细胞产生。重组人IL-21是非糖基化多肽单链,含有132个氨基酸,分子量为15.4kDa。重组人IL-21可购自多个供应商,包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目录号CYT-408-b)和美国Waltham,MA的ThermoFisher Scientific,Inc.(人IL-21重组蛋白,目录号14-8219-80)。适用于本发明的重组人IL-21的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:8)。

[0243] 当指示“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时,待施用的本发明组合物的精确量可由医生确定,考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者(受试者)状况的个体差异。通常可以说,包含本文所述的经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞的药物组合物可以 10^4 至 10^{11} 个细胞/kg体重(例如 10^5 至 10^6 、 10^5 至 10^{10} 、 10^5 至 10^{11} 、 10^6 至 10^{10} 、 10^6 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{10} 、 10^8 至 10^{11} 、 10^8 至 10^{10} 、 10^9 至 10^{11} 或 10^9 至 10^{10} 个细胞/kg体重)的剂量施用,包括这些范围内的所有整数值。经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞组合物也可以这些剂量多次施用。经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞可通过使用免疫治疗中通常已知的输注技术来施用(参见例如Rosenberg et al.,“新的”Eng.J.of Med.319:1676,1988)。通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗,医学领域的技术人员可以容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0244] 术语“血液恶性肿瘤(hematological malignancy)”指造血和淋巴组织(包括但不限于血液、骨髓、淋巴结和淋巴系统的组织)的哺乳动物癌症和肿瘤。血液恶性肿瘤也称为“液体肿瘤”。血液恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、急性髓样白血病(AML)、慢性粒细胞白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMoL)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。术语“B细胞血液恶性肿瘤”指影响B细胞的血液恶性肿瘤。

[0245] 术语“实体瘤”指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或恶性的。术语实体瘤癌症指恶性、肿瘤性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶

性上皮肿瘤和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

[0246] 术语“液体肿瘤”指本质上是流体的异常细胞团。液体肿瘤癌症包括但不限于白血病、骨髓瘤和淋巴瘤,以及其他血液恶性肿瘤。从液体肿瘤获得的TIL在本文中也可称为骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[0247] 如本文所用,术语“微环境”可以指整个实体或血液肿瘤微环境,或指微环境内的单个细胞亚群。如本文所用,肿瘤微环境指“细胞、可溶性因子、信号分子、细胞外基质,以及促进肿瘤转化、支持肿瘤生长和侵袭、保护肿瘤免受宿主免疫、促进治疗抵抗力并为显性转移灶的繁殖提供利基的机制线索”的复杂混合物,如Swartz等,Cancer Res.,2012,72,2473中所述。尽管肿瘤表达应该被T细胞识别到的抗原,但由于微环境的免疫抑制,免疫系统很少清除肿瘤。

[0248] 在一个实施方式中,本发明包括用TIL群治疗癌症的方法,其中,在输注本发明的TIL之前用非清髓性化疗预处理患者。在一些实施方式中,可以提供TIL群;其中,在输注本发明的TIL之前,用非清髓性化疗对患者进行预处理。在一个实施方式中,非清髓性化疗是环磷酰胺60mg/kg/天、持续2天(TIL输注前第27和第26天)和氟达拉滨25mg/m²/天、持续5天(TIL输注前第27至第23天)。在一个实施方式中,在根据本发明的非清髓性化疗和TIL输注(在第0天)后,患者以720,000IU/kg每8小时接受一次IL-2的静脉输注,直至生理耐受。

[0249] 实验发现表明,过继性转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前的淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争成分(“细胞因子沉降”)而在增强治疗疗效中起关键作用。因此,本发明的一些实施方式在引入本发明的rTIL之前对患者使用淋巴耗竭步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

[0250] 如本文所用,术语“共同施用(co-administration)”、“共同施用(co-administering)”、“与...组合施用(administered in combination with)”、“与...组合施用(administering in combination with)”、“同时”和“共同”包括向受试者施用两种以上活性药物成分(在本发明的一个优选实施方式中,例如至少一种钾通道激动剂与多个TIL组合),使得活性药物成分和/或它们的代谢物同时存在于受试者体内。共同施用包括:同时施用不同的组合物、在不同时间施用不同的组合物,或者施用其中存在两种以上活性药物成分的组合物。优选同时施用不同的组合物和施用其中存在两种药剂的组合物。

[0251] 术语“有效量”或者“治疗有效量”指如本文所述的化合物或者化合物组合的量足够实现预期应用,包括但不限于疾病治疗。治疗有效量可根据预期应用(体外或者体内)或者所治疗的受试者和疾病状况(例如受试者的体重、年龄和性别)、疾病状况的严重程度或者施用方式而变化。该术语还适用于会在靶细胞中诱导特定应答(例如血小板粘附和/或细胞迁移的减少)的剂量。具体剂量将取决于所选择的具体化合物、要遵循的施用方案、化合物是否与其他化合物联合施用、施用时间、施用组织以及携带化合物的物理递送系统。

[0252] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等指获得所需的药理学和/或生理学作用。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该作用可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良反应而言,该作用可以是治疗性的。如本文所用,“治疗”包括哺乳动物,特别是人类中疾病的任何治疗,包括:(a)在可能易患该疾病

但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中防止疾病发生；(b) 抑制疾病，即阻止其发展或进展；以及(c) 缓解疾病，即引起疾病消退和/或缓解一种以上疾病症状。“治疗”还意味着包括递送药剂以提供药理学作用，即使在没有疾病或病症的情况下也是如此。例如，“治疗”包括递送可在没有疾病的情况下引发免疫应答或赋予免疫力的组合物，例如在疫苗的情况下。

[0253] 当针对核酸或者蛋白质部分使用时，术语“异源”表示核酸或者蛋白质包含两个以上在自然界中彼此不存在相同关系的子序列。例如核酸通常是重组产生的，具有来自无关基因的两个以上序列，它被排列以产生新的功能性核酸，例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区，或者来自不同来源的编码区。类似地，异源蛋白质表示该蛋白质包含两个以上在自然界中彼此不存在相同关系的子序列(例如融合蛋白)。

[0254] 在两个以上核酸或多肽的情况下，术语“序列同一性”，“百分比同一性”和“序列百分比同一性”(或其同义词，例如“99%同一性”)指，当比较和比对(视需要的话，引入空位)以获得最大对应性时，两个以上序列或子序列相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基，不考虑任何保守氨基酸取代作为序列同一性的一部分。可使用序列比较软件或算法或通过目视检查，来测量同一性百分比。本领域已知各种算法和软件可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对。测定序列同一性百分比的合适程序包括，例如可从美国政府的国家生物技术信息中心BLAST网站获得的BLAST程序套件。可使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列，而BLASTP用于比较氨基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(加利福尼亚州南旧金山的Genentech)或可从DNASTAR获得的MegAlign是可用于比对序列的其他公共可用软件程序。本领域技术人员可通过特定的比对软件确定用于最大比对的适当参数。在某些实施例中，使用比对软件的默认参数。

[0255] 如本文所用，术语“变体”包括但不限于如下的抗体或融合蛋白：其通过在参考抗体的氨基酸序列内或附近的某些位置处的一个以上取代、缺失和/或添加而包含与参考抗体的氨基酸序列不同的氨基酸序列。与参考抗体的氨基酸序列相比，变体在其氨基酸序列中可包含一个以上保守取代。保守取代可涉及例如取代相似带电荷或不带电荷的氨基酸。该变体保留了特异性结合参考抗体的抗原的能力。术语“变体”还包括聚乙二醇化抗体或蛋白质。

[0256] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或者“TIL”指最初作为白细胞获得的细胞群，它们已经离开受试者的血流并迁移至肿瘤。TIL包括但不限于CD8⁺细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1和Th17 CD4⁺T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包括原代TIL和次代TIL。“原代TIL”是如本文所述从患者组织样品中获得的那些(有时称为“新鲜收获的”)，“次代TIL”是如本文所讨论的已经扩增或者增殖的任何TIL细胞群，包括但不限于大量TIL、扩增的TIL(“REP TIL”)以及“reREP TIL”。例如，reREP TIL可以包括第二次扩增TIL或者第二次另外的扩增TIL(例如，图9的步骤D中所描述的那些，包括称为reREP TIL的TIL)。

[0257] TIL通常可以利用细胞表面标志物在生物化学上定义，或者通过其浸润肿瘤和影响治疗的能力在功能上来定义。TIL通常可通过表达以下生物标志物中的一种以上来分类：CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。此外，或者，TIL可通过在重新引入患者后其浸润实体瘤的能力在功能上定义。TIL还可通过效价强度来表征——例如，如果例如干扰素(IFN)的释放大于约50pg/mL、大于约100pg/mL、大于约150pg/mL或大于约200pg/mL，则TIL可被认为是有效的。

[0258] 术语“药学上可接受的载体”或者“药学上可接受的赋形剂”旨在包括任何和所有的溶剂、分散培养基、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂,以及惰性成分。此种药学上可接受的载体或者药学上可接受的赋形剂对活性药物成分的用途是本领域熟知的。除非任何常规的药学上可接受的载体或者药学上可接受的赋形剂与活性药物成分不相容,否则可预期其在本发明的治疗组合物中的应用。其他活性药物成分(例如其他药物)也可以掺入所述组合物和方法中。

[0259] 术语“约”和“大约”表示在统计上有意义的数值范围内。这样的范围可以在给定值或者范围的一个数量级内,优选在50%内,更优选在20%内,更优选在10%内,甚至更优选在5%内。术语“约”或者“大约”所包含的可允许变化取决于所研究的特定系统,并且本领域普通技术人员可以容易地理解。此外,如本文所用,术语“约”和“大约”表示大小、尺寸、配方、参数、形状和其他性质和特性不是、也不必是精确的,但可以视需要是近似的和/或更大的或者更小的,反映公差、转换因子、四舍五入、测量误差等,以及本领域技术人员已知的其他因素。通常,大小、尺寸、配方、参数、形状或者其他性质或者特性是“约”或者“近似”的,无论是否明确说明如此。应注意,具有非常不同的尺寸、形状和大小的实施方式可采用所述安排。

[0260] 当在所附权利要求中以原始和修改的形式使用时,转变术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”定义了关于被排除在权利要求的范围之外的未列举的另外的权利要求要素或者步骤(如果有的话)的权利要求范围。术语“包含”旨在是包含性的或者开放式的,并且不排除任何另外的、未列举的要素、方法、步骤或者材料。术语“由...组成”不包括除权利要求中所述那些之外的任何元素、步骤或者材料,在材料的情况下,术语“由...组成”不包括与指定材料相关的普通杂质。术语“基本上由...组成”将权利要求的范围限制为指定的元素、步骤或者材料以及不会实质上影响所要求保护的发明的基本和新颖特征的那些。在替代实施方式中,本文所述的体现本发明的所有组合物、方法和试剂盒可以更具具体地由任意转变术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”定义。

三、基因编辑过程

A. 概述:TIL扩增+基因编辑

[0261] 本发明的实施方式涉及扩增TIL群的方法,该方法包括基因编辑至少一部分TIL以增强其治疗效果的一个以上步骤。如本文所用,“基因编辑(gene-editing)”、“基因编辑(gene-edit)”和“基因组编辑(genome editing)”指细胞基因组中的DNA被永久性修饰的一种基因修饰,例如,细胞基因组内的DNA被插入、缺失、修饰或替代。在一些实施方式中,基因编辑导致DNA序列的表达被沉默(有时称为基因敲除(gene knockout))或被抑制/降低(有时称为基因敲落(gene knockdown))。在其他实施方式中,基因编辑引起DNA序列的表达增强(例如通过引起过表达)。根据本发明的实施方式,基因编辑技术用于增强治疗性TIL群的有效性。

[0262] 将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可以根据本文所述方法的任何实施方式进行(例如下文描述了称为过程2A的示例性TIL扩增方法),其中所述方法还包括对至少一部分TIL进行基因编辑。根据其他实施方式,将TIL扩增成治疗性TIL群的方法根据PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633(其全部内容通过引用并入本文)中所述方法的任何实施方式进行,其中该方法还包括对至少一部分TIL进行基因

编辑。因此,本发明的一个实施方式提供了根据本文所述的任何实施方式进行扩增的治疗性TIL群,其中至少一部分治疗性TIL群已经被基因编辑,例如,转移至输液袋的至少一部分治疗性TIL群已被永久性基因编辑。

B. TIL扩增期间基因编辑的时机

[0263] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增(例如,OKT-3可从扩增过程的起始日期开始存在于培养基中),产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约3天至14天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(b)到步骤(c)的转变在不打开系统的情况下发生;

(d) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至14天,获得第三TIL群;其中,第三TIL群是治疗性TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 收获从步骤(d)获得的治疗性TIL群;其中,从步骤(d)到步骤(e)的转变在不打开系统的情况下发生;

(f) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(g) 在该方法期间的任何时间,对至少一部分TIL进行基因编辑。

[0264] 如上述实施方式的步骤(g)中所述,基因编辑过程可以在TIL扩增方法期间的任何时间进行,这意味着可以在扩增方法的任一步骤之前、期间或之后对TIL进行基因编辑;例如,在上述方法概述的步骤(a)至步骤(f)中任一步骤期间,或在上述方法概述的步骤(a)至步骤(f)中任一步骤之前或之后。根据某些实施方式,在扩增方法期间收集TIL(例如,对于至少部分TIL,扩增方法被“暂停”),对收集的TIL进行基因编辑过程,在某些情况下,随后将其重新引入扩增方法中(例如重新引入培养基中)以继续扩增过程,从而使最终转移至输液袋的至少一部分治疗性TIL群被永久性基因编辑。在一个实施方式中,可通过以下步骤在扩增之前进行基因编辑过程:活化TIL,对活化的TIL进行基因编辑步骤,以及根据本文所述过程扩增经基因编辑的TIL。

[0265] 应注意,扩增过程的替代实施方式可不同于上述方法;例如,替代实施方式可不采用相同的步骤(a)至步骤(g),或具有不同的步骤数量。无论具体的实施方式如何,基因编辑过程可以在TIL扩增方法期间的任何时间进行。例如,替代实施方式可包括超过两次扩增,可在第三次扩增或第四次扩增等期间对TIL进行基因编辑。

[0266] 根据一个实施方式,对第一TIL群、第二TIL群和第三TIL群中的一种以上进行基因编辑过程。例如,可以对第一TIL群或从第一TIL群收集的部分TIL进行基因编辑,在基因编辑过程之后,随后可将这些TIL放回扩增过程中(例如放回培养基中)。或者,可对第二TIL群或第三TIL群或分别从第二TIL群或第三TIL群收集的部分TIL进行基因编辑,在基因编辑过

程之后,随后可将这些TIL放回扩增过程中(例如放回培养基中)。根据另一个实施方式,在TIL仍在培养基中且在进行扩增的同时进行基因编辑,即,不必为了进行基因编辑而将TIL从扩增中“取出”。

[0267] 根据另一个实施方式,对第一次扩增的TIL或第二次扩增的TIL或两者进行基因编辑过程。例如,在第一次扩增或第二次扩增期间,可对从培养基收集的TIL进行基因编辑,在基因编辑过程之后,随后可将这些TIL放回扩增方法中(例如将这些TIL重新引入培养基中)。

[0268] 根据另一个实施方式,在第一次扩增之后和第二次扩增之前,对至少一部分TIL进行基因编辑过程。例如,在第一次扩增之后,可对从培养基中收集的TIL进行基因编辑,在基因编辑过程之后,随后可将这些TIL放回扩增方法中(例如将这些TIL重新引入培养基中)用于第二次扩增。

[0269] 根据替代实施方式,基因编辑过程在步骤(c)之前(例如在步骤(a)至步骤(b)中任一步骤之前、期间或之后)、在步骤(d)之前(例如在步骤(a)至步骤(c)中任一步骤之前、期间或之后)、在步骤(e)之前(例如在步骤(a)至步骤(d)中任一步骤之前、期间或之后)或在步骤(f)之前(例如在步骤(a)至步骤(e)中任一步骤之前、期间或之后)进行。

[0270] 应注意,根据某些实施方式,关于OKT-3,细胞培养基可从第一次扩增的起始日(第0天)或第1天开始包含OKT-3,使得在第0天和/或第1天TIL被暴露于细胞培养基中的OKT-3之后,对TIL进行基因编辑。根据另一个实施方式,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含OKT-3;在将OKT-3引入细胞培养基之前进行基因编辑。或者,细胞培养基可在第一次扩增和/或第二次扩增期间包含OKT-3,在将OKT-3引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0271] 还应注意,根据某些实施方式,关于4-1BB激动剂,细胞培养基可从第一次扩增的起始日(第0天)或第1天开始包含4-1BB激动剂,使得在第0天和/或第1天TIL被暴露于细胞培养基中的4-1BB激动剂之后,对TIL进行基因编辑。根据另一个实施方式,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含4-1BB激动剂;在将4-1BB激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。或者,细胞培养基可在第一次扩增和/或第二次扩增期间包含4-1BB激动剂,在将4-1BB激动剂引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0272] 还应注意,根据某些实施方式,关于IL-2,细胞培养基可从第一次扩增的起始日(第0天)或第1天开始包含IL-2,使得在第0天和/或第1天TIL被暴露于细胞培养基中的IL-2之后,对TIL进行基因编辑。根据另一个实施方式,在第一次扩增和/或第二次扩增期间,细胞培养基包含IL-2;在将IL-2引入细胞培养基之前进行基因编辑。或者,细胞培养基可在第一次扩增和/或第二次扩增期间包含IL-2,在将IL-2引入细胞培养基之后进行基因编辑。

[0273] 如上所述,细胞培养基可从第一次扩增的第0天或第1天开始包含OKT-3、4-1BB激动剂和IL-2中的一种以上。根据一个实施方式,细胞培养基从第一次扩增的第0天或第1天开始包含OKT-3;和/或细胞培养基从第一次扩增的第0天或第1天开始包含4-1BB激动剂;和/或细胞培养基从第一次扩增的第0天或第1天开始包含IL-2。根据一个实施方式,细胞培养基从第一次扩增的第0天或第1天开始包含OKT-3和4-1BB激动剂。根据另一个实施方式,细胞培养基从第一次扩增的第0天或第1天开始包含OKT-3、4-1BB激动剂和IL-2。当然,如本文所述的各种实施方式中所述,可在扩增过程中的一个以上其他时间点,将OKT-3、4-1BB激

动剂和IL-2中的一种以上添加到细胞培养基中。

[0274] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群。

[0275] 根据一个实施方式,前述方法可用于提供自体收获的TIL群,用于治疗患有癌症的人类受试者。

C. 免疫检查点

[0276] 根据本发明的具体实施方式,通过基因修饰TIL群的一种以上免疫检查点基因来对TIL群进行基因编辑。换言之,TIL中编码一种以上TIL免疫检查点的DNA序列在TIL的基因组中被永久性修饰(例如插入、缺失或替换)。免疫检查点是淋巴细胞表达的分子,可通过抑制或刺激通路调节免疫应答。在癌症的情况下,免疫检查点通路通常被活化以抑制抗肿瘤反应,即,恶性细胞表达某些免疫检查点会抑制抗肿瘤免疫力并有利于癌细胞的生长。参见例如Marin-Acevedo等,Journal of Hematology&Oncology (2018) 11:39。因此,某些抑制性检查点分子用作本发明的免疫疗法的靶标。根据具体实施方式,对TIL进行基因编辑以阻断或刺激某些免疫检查点途径,从而增强人体对肿瘤的免疫活性。

[0277] 如本文所用,免疫检查点基因包含编码免疫检查点分子的DNA序列。根据本发明的具体实施方式,TIL扩增方法期间的基因编辑TIL导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。例如,基因编辑可能导致抑制性受体(例如PD-1或CTLA-4)的表达被沉默或降低以增强免疫反应。

[0278] 最广泛研究的检查点包括程序性细胞死亡受体1(PD-1)和细胞毒性T淋巴细胞相关分子4(CTLA-4),当与抑制性配体相互作用时,它们是免疫细胞上抑制关键效应子功能

(例如活化、增殖、细胞因子释放、细胞毒性等)的抑制性受体。如下文更详细地讨论,除PD-1和CTLA-4之外,许多检查点分子已成为免疫治疗的潜在靶标。

[0279] 可以通过永久性基因编辑本发明的TIL来沉默或抑制的免疫检查点基因的非限制性实例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGF β 、PKA、CBLB、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、BAFF (BR3)、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF1010、CASP8、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、L10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1B2和GUCY1B3。例如,在本发明的TIL中,可被沉默或抑制的免疫检查点基因可选自PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、CISH、TGF β 和PKA。Bloom等, *J. Immunother.*, 2018 (出版中) 描述了BAFF (BR3)。根据另一个示例,在本发明的TIL中,可被沉默或抑制的免疫检查点基因可选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF (BR3) 及它们的组合。

[0280] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制选自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGF β R2、PRA、CBLB、BAFF (BR3) 及它们的组合的分子的表达。

1. PD-1

[0281] 研究最多的诱导检查点阻断的靶标之一是程序性死亡受体(PD1或PD-1,也称为PDCD1),它是T细胞调节剂CD28超家族的成员。它的配体PD-L1和PD-L2在包括黑色素瘤在内

的多种肿瘤细胞上表达。PD-1与PD-L1的相互作用抑制了T细胞效应子功能,在慢性刺激的情况下导致T细胞衰竭,在肿瘤微环境中诱导T细胞凋亡。PD1也可能在免疫监控中的肿瘤特异性逃逸中发挥作用。

[0282] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中PD1的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制PD1的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下面更详细描述,基因编辑过程可涉及使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如PD1)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或减少TIL中PD1的表达。

2. CTLA-4

[0283] T细胞活化后,活化的T细胞上的CTLA-4表达被诱导,并竞争结合活化抗原CD80和CD86的抗原呈递细胞。CTLA-4与CD80或CD86的相互作用引起T细胞抑制,起到维持免疫反应平衡的作用。但是,抑制CTLA-4与CD80或CD86的相互作用可能会延长T细胞活化,从而增加对癌症抗原的免疫应答水平。

[0284] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中CTLA-4的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制CTLA-4的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下文更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如CTLA-4)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中CTLA-4的表达。

3. LAG-3

[0285] 在主要的组织相容性复合体(MHC) II类连接后,T细胞和自然杀伤(NK)细胞表达淋巴细胞活化基因-3(LAG-3,CD223)。尽管机制尚不清楚,但其调节作用会导致对T细胞功能的负调节作用,从而防止组织损伤和自身免疫。TIL的LAG-3和PD-1经常被共表达和上调,导致免疫力衰竭和肿瘤生长。因此,LAG-3阻断改善了抗肿瘤反应。参见例如Marin-Acevedo等,Journal of Hematology&Oncology (2018) 11:39。

[0286] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中LAG-3的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制LAG-3的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下文更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,该核酸酶介导在免疫检查点基因(例如LAG-3)处产生双链或单链断裂。根据具体实施方式,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中LAG-3的表达。

4. TIM-3

[0287] T细胞免疫球蛋白-3(TIM-3)是T细胞的直接负调节剂,在NK细胞和巨噬细胞上表达。TIM-3通过诱导髓样来源的抑制细胞(MDSC)的扩增间接地促进免疫抑制。已发现TIM-3水平在功能异常和耗竭的T细胞中特别升高,表明其在恶性肿瘤中起重要作用。

[0288] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中TIM-3的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制TIM-3的

表达来基因编辑至少一部分TIL。如下文更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如TIM-3)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中TIM-3的表达。

5. CISH

[0289] CISH(细胞因子信号传导抑制物(SOCS)家族的成员)由CD8+T细胞中的TCR刺激诱导并抑制CD8+T细胞对肿瘤的功能亲和力(avidity)。CD8+T细胞中CISH的基因缺失可能会增强该细胞的扩增、功能亲和力和细胞因子多功能性,导致已建立肿瘤的明显且持久的消退。参见例如Palmer等,Journal of Experiment Medicine,212(12):2095(2015)。

[0290] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中CISH的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制CISH的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下文更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如CISH)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中CISH的表达。

6. TGF β

[0291] TGF β 信号通路在调节细胞生长、分化、凋亡、运动性和侵袭、细胞外基质产生、血管生成和免疫应答中具有多种功能。TGF β 信号转导失调在肿瘤中很常见,其在肿瘤初发、发展和转移中起关键作用。在微环境水平上,TGF β 通路有助于在整个癌变过程中为肿瘤的生长和转移产生有利的微环境。参见,例如Neuzillet等,Pharmacology&Therapeutics,147:22-31(2015)。

[0292] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中TGF β 的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或减少TGF β 的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下面更详细描述,基因编辑过程可以包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如TGF β)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中TGF β 的表达。

[0293] 在一些实施方式中,使用本领域已知的方法,可通过使用CRISPR/Cas9系统使TGF β R2沉默或通过使用TGF β R2显性负向细胞外陷阱(negative extracellular trap)使TGF β R2沉默来抑制TGF β R2(TGF β 受体2)。

7. PKA

[0294] 蛋白激酶A(PKA)是公知的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶超家族成员。PKA(也称为cAMP依赖性蛋白激酶)是一种多单位蛋白激酶,PKA在cAMP结合后通过其活化介导G蛋白偶联受体的信号转导。PKA涉及从新陈代谢到离子通道活化、细胞生长和分化、基因表达和细胞凋亡的各种细胞过程的控制。重要的是,PKA与许多肿瘤的发生和发展有关。参见,例如Sapio等,EXCLI Journal;2014;13:843-855。

[0295] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中PKA的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制PKA的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下文更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸

酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如PKA)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中PKA的表达。

8. CBLB

[0296] CBLB(或CBL-B)是E3泛素蛋白连接酶,是T细胞活化的负调节剂。Bachmaier等, *Nature* 2000,403,211-216;Wallner等, *Clin.Dev.Immunol.* 2012,692639。

[0297] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中CBLB的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制CBLB的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下文更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如CBLB)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中PKA的表达。在一些实施方式中,使用TALEN敲除使CBLB沉默。在一些实施方式中,使用TALE-KRAB转录抑制剂敲入使CBLB沉默。关于这些方法的更多细节,参见Boettcher和McManus, *Mol.Cell Review* 2015,58,575-585。

9. TIGIT

[0298] 具有Ig及ITIM(免疫受体酪氨酸抑制基序)结构域的T细胞免疫受体或TIGIT是胞浆域(cytoplasmic domain)内具有Ig样V型结构域和ITIM的跨膜糖蛋白受体。Khalil等, *Advances in Cancer Research* 2015,128:1-68;Yu等, *Nature Immunology* 2009,10(1):48-57。TIGIT由某些T细胞和自然杀伤细胞表达。此外,已显示TIGIT在特别是患有黑色素瘤的个体的抗原特异性CD8⁺T细胞和CD8⁺TIL上过表达。研究表明,TIGIT通路有助于肿瘤免疫逃避,据显示TIGIT抑制可增加响应于多克隆和抗原特异性刺激的T细胞活化和增殖。Khalil等, *Advances in Cancer Research* 2015,128:1-68。此外,在小鼠模型中,已显示TIGIT与PD-1或TIM3的共阻断针对实体瘤具有协同作用。另见Kurtulus等, *The Journal of Clinical Investigation* 2015,125(11):4053-4062。

[0299] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法沉默或降低TIL中TIGIT的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过沉默或抑制TIGIT的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下面更详细描述,基因编辑过程可包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在免疫检查点基因(例如TIGIT)处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来沉默或抑制TIL中TIGIT的表达。

D. 共刺激受体或粘附分子的过表达

[0300] 根据其他实施方式,在TIL扩增方法期间对TIL进行基因编辑导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强。例如,基因编辑可引起刺激性受体的表达增强,这意味着该刺激性受体与未经过基因修饰的刺激性受体的表达相比过表达。通过永久性基因编辑本发明TIL可表现出表达增强的免疫检查点基因的非限制性实例包括某些趋化因子受体和白细胞介素,例如CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

1. CCR

[0301] 为了使过继性T细胞免疫疗法有效,需要通过趋化因子将T细胞适当运输至肿瘤中。肿瘤细胞分泌的趋化因子、周围存在的趋化因子和T细胞表达的趋化因子受体之间的匹

配对于将T细胞成功运输到肿瘤床至关重要。

[0302] 根据具体实施方式,本发明的基因编辑方法可用于增加某些趋化因子受体在TIL中的表达,例如CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3和CX3CR1中的一种以上。在过继性转移后,CCR的过表达可能有助于促进效应子功能和TIL的增殖。

[0303] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法增强TIL中CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3和CX3CR1中的一种以上的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过增强CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3和CX3CR1中的一种以上的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下面更详细描述,基因编辑过程可以包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在趋化因子受体基因处产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来增强TIL中某些趋化因子受体的表达。

[0304] 在一个实施方式中,使用本文所述的 γ -逆转录病毒或慢病毒方法,将CCR4和/或CCR5粘附分子插入TIL群。在一个实施方式中,如Forget等,Frontiers Immunology 2017, 8, 908或Peng等,Clin.Cancer Res.2010,16,5458(其公开内容通过引用并入本文)所述,使用 γ -逆转录病毒或慢病毒方法将CXCR2粘附分子插入TIL群。

[0305] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制PD-1和可选的LAG-3的表达;此外,其中,通过 γ -逆转录病毒或慢病毒方法将CXCR2粘附分子插入第一TIL群、第二TIL群或收获的TIL群。

[0306] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制PD-1以及可选的LAG-3的表达;此外,其中,通过 γ -逆转录病毒或慢病毒方法将CCR4和/或CCR5粘附分子插入第一TIL群、第二TIL群或收获的TIL群。

[0307] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天

至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h)收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i)将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j)使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制PD-1以及可选的LAG-3的表达;此外,其中,通过 γ -逆转录病毒或慢病毒方法将粘附分子插入第一TIL群、第二TIL群或收获的TIL群,所述粘附分子选自CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及它们的组合。

2. 白细胞介素

[0308] 根据其他实施方式,本发明的基因编辑方法可用于增加某些白细胞介素的表达,例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21中的一种以上。已经证明某些白细胞介素可以增强T细胞的效应子功能并介导肿瘤控制。

[0309] 根据具体实施方式,本发明的组合物和方法增强IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21中的一种以上在TIL中的表达。例如,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述的方法的任何实施方式(例如,过程2A或图20和21所示方法)进行,其中,该方法包括通过增强IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15和IL-21中的一种以上的表达来基因编辑至少一部分TIL。如下面更详细描述,基因编辑过程可以包括使用可编程核酸酶,该可编程核酸酶介导在白细胞介素基因从产生双链或单链断裂。例如,可使用CRISPR法、TALE法或锌指法来增强TIL中某些白细胞介素的表达。

[0310] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a)通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b)将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c)通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d)添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e)对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f)使第二TIL群静息约1天;

(g)通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h)收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)

的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砷的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、转录激活因子样效应物(TALE)系统或锌指系统,用于抑制PD-1以及可选的LAG-3的表达;此外,其中,通过 γ -逆转录病毒或慢病毒方法将白细胞介素插入第一TIL群、第二TIL群或收获的TIL群,所述白细胞介素选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21及它们的组合。

E. 基因编辑方法

[0311] 如上所述,本发明的实施方式提供了已通过基因编辑进行基因修饰以增强其治疗效果的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。本发明的实施方式包括通过核苷酸插入(RNA或DNA)到TIL群中进行基因编辑,以促进一种以上蛋白质的表达和抑制一种以上蛋白质的表达以及它们的组合。本发明的实施方式还提供了将TIL扩增成治疗性群的方法,其中,所述方法包括对TIL进行基因编辑。有几种可用于基因修饰TIL群的基因编辑技术,其适用于根据本发明使用。

[0312] 在一些实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括稳定掺入用于产生一种以上蛋白质的基因的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括逆转录病毒转导的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统是本领域已知的,描述于例如Levine等,Proc.Nat'l Acad.Sci.2006,103,17372-77;Zufferey,et al.,Nat.Biotechnol.1997,15,871-75;Dull等,J.Virology 1998,72,8463-71和美国专利号6,627,442,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括 γ -逆转录病毒转导的步骤。 γ -逆转录病毒转导系统是本领域已知的,描述于例如Cepko和Pear,Cur.Prot.Mol.Biol.1996,9.9.1-9.9.16,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统是本领域已知的,包括这样的系统:转座酶以DNA表达载体或可表达RNA或蛋白质的形式提供,使得转座酶不会在转基因细胞中长期表达,例如,转座酶作为mRNA(例如,包含帽和poly-A尾的mRNA)提供。合适的转座子介导的基因转移系统,包括鲑鱼(salmonid)型Tel样转座酶(SB或睡美人转座酶),例如SB10、SB11和SB100x,以及具有增强的酶活性的工程化酶,描述于例如Hackett等,Mol.Therapy 2010,18:674-83和美国专利号6,489,458,其各自公开内容通过引用并入本文。

[0313] 在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括稳定掺入用于产生或抑制(例如沉默)一种以上蛋白质的基因的步骤。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括电穿孔的步骤。电穿孔方法是本领域已知的,描述于例如Tsong,Biophys J.1991,60,297-306和美国专利申请公开号2014/0227237 A1,其各自公开内容通过引用并入本文。可使用本领域已知的其他电穿孔方法,例如美国专利号5,019,034;5,128,257;5,137,817;5,173,158;5,232,856;5,273,525;5,304,120;5,318,514;6,010,613和6,078,490中所述的那些,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,电穿孔方法是无菌电穿孔方法。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定且受控的永久性或暂时性变化的

步骤,包括向TIL施加至少三个场强为100V/cm以上、操作器控制独立编程的单个DC电脉冲的序列的步骤;其中,至少三个DC电脉冲的序列具有一种、两种或三种以下特征:(1)至少三个脉冲中至少两个的脉冲幅度彼此不同;(2)至少三个脉冲中至少两个的脉冲宽度彼此不同;以及(3)至少三个脉冲中两个的第一组的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中两个的第二组的第二脉冲间隔。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定且受控的永久性或暂时性变化的步骤,包括向TIL施加至少三个场强为100V/cm以上、操作器控制独立编程的单个DC电脉冲的序列的步骤;其中,至少三个脉冲中至少两个的脉冲幅度彼此不同。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定且受控的永久性或暂时性变化的步骤,包括向TIL施加至少三个场强为100V/cm以上、操作器控制独立编程的单个DC电脉冲的序列的步骤;其中,至少三个脉冲中至少两个的脉冲宽度彼此不同。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以改变、操纵或引起TIL中确定和受控的永久性或暂时性变化的步骤,包括向TIL施加至少三个场强为100V/cm以上、操作器控制独立编程的单个DC电脉冲的序列的步骤;其中,至少三个脉冲中两个的第一组的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中两个的第二组的第二脉冲间隔。在一个实施方式中,电穿孔方法是脉冲电穿孔方法,其包括用脉冲电场处理TIL以诱导TIL的孔形成的步骤,包括向TIL施加至少三个场强为100V/cm以上的DC电脉冲的序列的步骤;其中,至少三个DC电脉冲的序列具有一种、两种或三种以下特征:(1)至少三个脉冲中至少两个的脉冲幅度彼此不同;(2)至少三个脉冲中至少两个的脉冲宽度彼此不同;以及(3)至少三个脉冲中两个的第一组的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中两个的第二组的第二脉冲间隔,使得诱导的孔维持相对长的时间段,并且使得TIL的活力被保持。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面包被和吞噬)是本领域中已知的,描述于Graham和van der Eb, *Virology* 1973,52:456-467; Wigler等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979,76:1373-1376; 和Chen和Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 1987,7:2745-2752以及美国专利号5,593,875,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括脂质体转染的步骤。脂质体转染方法是本领域已知的,例如采用阳离子脂质N-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)在过滤水中的1:1(w/w)脂质体制剂的方法,其描述于Rose等, *Biotechniques* 1991,10:520-525和Felgner等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987,84:7413-7417;以及美国专利号5,279,833、5,908,635、6,056,938、6,110,490、6,534,484和7,687,070,其各自公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,基因修饰TIL群的方法包括使用美国专利号5,766,902、6,025,337、6,410,517、6,475,994和7,189,705(其各自公开内容通过引用并入本文)中描述的方法进行转染的步骤。

[0314] 根据一个实施方式,基因编辑过程可包括使用介导在一种以上免疫检查点基因处产生双链或单链断裂的可编程核酸酶。此种可编程核酸酶通过在特定基因组位点处引入断裂来实现精确的基因组编辑,即,它们依靠对基因组内特定DNA序列的识别,来将核酸酶结构域靶向此位置,并介导在靶序列处产生双链断裂。DNA的双链断裂,随后内源性修复机器被募集到该断裂位点,以通过非同源末端连接(NHEJ)或同源性定向修复(HDR)来介导基因

组编辑。因此,断裂的修复可导致引入破坏(例如沉默、抑制或增强)靶基因产物的插入/缺失突变。

[0315] 已开发用于实现位点特异性基因组编辑的核酸酶的主要种类包括:锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样核酸酶(TALEN)和CRISPR相关核酸酶(例如CRISPR/Cas9)。根据其DNA识别模式,这些核酸酶系统可大致分为两类:ZFN和TALEN通过蛋白质-DNA相互作用实现特定的DNA结合,而CRISPR系统(例如Cas9)通过直接与目标DNA碱基配对的短RNA指导分子以及蛋白质-DNA相互作用,靶向特定的DNA序列。参见,例如Cox等,Nature Medicine 2015, 21 (2)。

[0316] 可用于本发明的TIL扩增方法的基因编辑方法的非限制性实例包括CRISPR法、TALE法和ZFN方法(它们的实施方式在下文详述)。根据一个实施方式,将TIL扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述方法的任何实施方式(例如过程2A)或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所述进行,其中,该方法还包括通过CRISPR法、TALE法或ZFN法中的一种以上对至少一部分TIL进行基因编辑,以产生可提供增强的治疗效果的治疗性TIL。根据一个实施方式,可通过将基因编辑的TIL与未修饰的TIL进行体外比较,来评估基因编辑的TIL的增强的治疗效果;例如,通过与未修饰的TIL相比,评估体外效应子功能、细胞因子特征等。

[0317] 在本发明的一些实施方式中,电穿孔用于递送基因编辑系统,例如CRISPR系统、TALEN系统和ZFN系统。在本发明的一些实施方式中,电穿孔系统是流式电穿孔系统。适用于本发明的一些实施方式的合适的流式电穿孔系统的实例为市售的MaxCyte STX系统。有几种适用于本发明的备选市售电穿孔仪器,例如购自BTX-Harvard Apparatus的AgilePulse系统或ECM 830、Cellaxess Elektra (Celectricon)、Nucleofector (Lonza/Amara)、GenePulser MXcell (BIO RAD)、iPorator-96 (Primax) 或siPORTer96 (Ambion)。在本发明的一些实施方式中,电穿孔系统与其他TIL扩增方法一起形成封闭的无菌系统。在本发明的一些实施方式中,电穿孔系统是本文所述的脉冲电穿孔系统,并与其他TIL扩增方法一起形成封闭的无菌系统。

1. CRISPR法

[0318] 将TIL扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述方法的任何实施方式(例如过程2A)或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所述进行,其中,该方法还包括通过CRISPR法(例如CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)对至少一部分TIL进行基因编辑。根据具体实施方式,TIL扩增期间使用CRISPR法导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。或者,在TIL扩增期间使用CRISPR法导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强。

[0319] CRISPR表示“成簇规律间隔短回文重复序列”。在本文中,使用CRISPR系统进行基因编辑的方法也称为CRISPR法。CRISPR系统可分为两个主要类别,即1类和2类,它们又分为不同的类型和子类型。CRISPR系统的分类是基于能够切割特定核酸的效应Cas蛋白。在1类CRISPR系统中,效应子模块由多蛋白复合物组成,而2类系统仅使用一种效应子蛋白。1类CRISPR包括I型、III型和IV型,2类CRISPR包括II型、V型和VI型。尽管本发明可使用这些CRISPR系统中的任一种类型,但本发明优选使用以下三种类型的CRISPR系统,其包含RNA和Cas蛋白:I型(以Cas3为例)、II型(以Cas9为例)和III型(以Cas10为例)。II型CRISPR是表征

最充分的系统之一。

[0320] CRISPR技术由细菌和古细菌(单细胞微生物的域)的天然防御机制而改编。这些生物利用CRISPR来源的RNA和各种Cas蛋白(包括Cas9),通过切碎并破坏外来入侵者的DNA来阻止病毒和其他异物的攻击。CRISPR是具有两种不同特性的DNA特异性区域:存在核苷酸重复序列和间隔区(spacer)。核苷酸的重复序列分布在整个CRISPR区,外来DNA的短片段(间隔区)散布在重复序列之间。在II型CRISPR/Cas系统中,间隔区被整合到CRISPR基因组基因座中并被转录加工成短CRISPR RNA(crRNA)。这些crRNA退火为反式激活crRNA(tracrRNA),并通过Cas蛋白引导致病DNA的序列特异性切割和沉默。Cas9蛋白的靶识别需要crRNA内的“种子”序列和crRNA结合区上游的保守的含二核苷酸的前间隔区相邻基序(PAM, protospacer adjacent motif)序列。通过重新设计crRNA,可将CRISPR/Cas系统重新靶向为切割几乎任何DNA序列。因此,根据某些实施方式,Cas9用作RNA引导的DNA内切核酸酶,其在crRNA-tracrRNA识别后切割DNA。可将天然系统中的crRNA和tracrRNA简化为约100个核苷酸的单链指导RNA(sgRNA, single guide RNA)以用于基因工程.sgRNA是合成RNA,其包含Cas结合所需的支架(scaffold)序列和用户定义的约17至20个核苷酸的间隔区,该间隔区定义了要修饰的基因组靶标。因此,用户可通过改变sgRNA中存在的靶序列来改变Cas蛋白的基因组靶标。通过共递送表达Cas9内切核酸酶和RNA成分(例如sgRNA)的质粒,可将CRISPR/Cas系统直接移植到人细胞。Cas蛋白的不同变体可用于减少靶向限制(例如Cas9的直向同源物,如Cpf1)。

[0321] 根据一个实施方式,工程化可编程非天然存在的II型CRISPR-Cas系统包含Cas9蛋白和至少一个指导RNA,该指导RNA靶向TIL中DNA分子的靶序列并与其杂交;其中,DNA分子编码且TIL表达至少一种免疫检查点分子,Cas9蛋白切割DNA分子,从而改变至少一种免疫检查点分子的表达;并且,Cas9蛋白和指导RNA不能天然地同时存在。根据一个实施方式,两种以上免疫检查点分子的表达被改变。根据一个实施方式,指导RNA包含与tracr序列融合的指导序列。例如,指导RNA可以包含crRNA-tracrRNA或sgRNA。根据本发明的方面,术语“指导RNA”、“单链指导RNA”和“合成指导RNA”可互换使用,指包含指导序列的多核苷酸序列,其为在指导RNA内对靶位点具有特异性的约17bp至20bp序列。

[0322] 根据本发明的实施方式,也可使用与Cas9相比具有改善的在靶(on-target)特异性的Cas9的变体。此类变体可称为高保真(high-fidelity) Cas-9。根据一个实施方式,可使用双切口酶(nickase)法,其中靶向相反DNA链的两种切口酶在靶DNA内产生DSB(通常称为双切口或双切口酶CRISPR系统)。例如,此方法可涉及两种Cas9核酸酶结构域之一的突变,Cas9从核酸酶转变为切口酶。高保真Cas9的非限制性实例包括eSpCas9、SpCas9-HF1和HypaCas9。此类变体可减少或消除在非靶DNA位点的不需要的改变。参见,例如Slaymaker IM等,Science 2015年12月1日;Kleinstiver BP等,Nature 2016年1月6日;以及Ran等,Nat Protoc.2013年11月,8(11):2281-2308,其公开内容通过引用并入本文。

[0323] 此外,根据具体实施方式,可使用改善Cas9向细胞的基因递送以及改善在靶特异性的Cas9支架,例如美国专利申请公开号2016/0102324中公开的那些,其内容通过引用并入本文。例如,Cas9支架可包含由(D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A)定义的RuvC基序和/或由(Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S)定义的HNH基序,其中X表示20种天然氨基酸中的任一种,[I/L]表示异亮氨酸或亮氨酸。HNH结构域负责使靶dsDNA的一条链产生切口,而RuvC结

构域参与dsDNA的另一条链的切割。因此,这些结构域中的每一个都在紧邻PAM的前间隔区中使靶DNA的一条链产生切口,导致DNA的平齐(blunt)切割。这些基序可以彼此组合以产生更紧凑和/或特异性更强的Cas9支架。此外,这些基序可用于产生拆分为两个单独的RuvC结构域和HNH结构域的拆分Cas9蛋白(即包含RuvC结构域或HNH结构域的Cas9蛋白或Cas9变体的还原形式或截短形式),其可以一起或分别处理靶DNA。

[0324] 根据具体实施方式,CRISPR法包括通过引入Cas9核酸酶和指导RNA(例如crRNA-tracrRNA或sgRNA)来沉默或降低TIL中一种以上免疫检查点基因的表达,该指导RNA含有对免疫检查点基因的靶DNA序列具有特异性的约17至20个核苷酸的序列。指导RNA可以作为RNA或通过启动子下用指导RNA编码序列转化质粒来递送。CRISPR/Cas酶基于sgRNA定义的靶序列在特定位置引入双链断裂(DSB)。可通过非同源末端连接(NHEJ)修复细胞的DSB,该机制通常会导致DNA中的插入或缺失(插入缺失(indel))。插入缺失经常导致移码,造成功能等位基因的丧失;例如,通过在靶基因的开放阅读框(ORF)内引起提前的终止密码子。根据某些实施方式,结果得到靶标免疫检查点基因内的功能丧失突变。

[0325] 或者,可通过同源性定向修复(HDR)而不是NHEJ来修复由CRISPR/Cas酶引起的DSB。尽管NHEJ介导的DSB修复通常会破坏基因的开放阅读框,但同源直接修复(HDR)可用于产生特定核苷酸变化(从单个核苷酸变化到大的插入)。根据一个实施方式,通过将包含所需序列的DNA修复模板与sgRNA和Cas9或Cas9切口酶一起递送至TIL中,利用HDR来基因编辑免疫检查点基因。优选地,修复模板包含所需编辑以及紧挨着靶基因上游和下游的其他同源序列(通常称为左同源臂和右同源臂)。

[0326] 根据具体实施方式,Cas9的酶促失活形式(deadCas9或dCas9)可以靶向转录起始位点以通过阻断起始来抑制转录。因此,可在不使用DSB的情况下抑制所靶向的免疫检查点基因。dCas9分子保留了基于sgRNA靶向序列与靶DNA结合的能力。根据本发明的一个实施方式,CRISPR法包括通过抑制或阻止靶基因的转录来沉默或降低一种以上免疫检查点基因的表达。例如,CRISPR法可包括使诸如Kruppel相关盒(KRAB,Kruppel-associated box)结构域的转录阻遏结构域与Cas9的酶促失活形式融合,从而形成例如靶向免疫检查点基因转录起始位点的dCas9-KRAB,导致抑制或阻止基因转录。优选地,阻遏结构域靶向转录起始位点下游的窗口,例如下游约500bp。通过靶RNA的转录减少,此种方法(可称为CRISPR干扰(CRISPRi))可产生稳健的基因敲落。

[0327] 根据具体实施方式,Cas9的酶促失活形式(deadCas9或dCas9)可以靶向转录起始位点以活化转录。此种方法可以称为CRISPR活化(CRISPRa)。根据一个实施方式,CRISPR法包括通过活化靶基因的转录来增加一种以上免疫检查点基因的表达。根据此类实施方式,可在不使用DSB的情况下活化所靶向的免疫检查点基因。CRISPR法可包括使转录活化结构域靶向转录起始位点;例如,通过将转录活化因子(例如VP64)与dCas9融合,从而形成例如靶向免疫检查点基因转录起始位点的dCas9-VP64,从而活化该基因的转录。优选地,活化结构域靶向转录起始位点上游的窗口,例如上游约50bp至400bp。

[0328] 本发明的其他实施方式可利用已被开发用于在哺乳动物细胞中有效活化靶基因的活化策略。非限制性实例包括:表位标记的dCas9和抗体活化因子效应蛋白(例如SunTag系统)的共表达、与串联的多个不同活化结构域融合的dCas9(例如,dCas9-VP64),或dCas9-VP64与修饰的支架gRNA和其他RNA结合辅助活化因子(例如SAM活化因子)的共表达。

[0329] 根据其他实施方式,如美国专利号9,982,278(其内容通过引用并入本文)所公开,CRISPR介导的基因组编辑(称为CRISPR辅助的理性蛋白质工程化,CARPE)方法可根据本发明的实施方式来使用。CARPE涉及“供体”和“目的”文库的生成,这些文库将来自单链DNA(ssDNA)或双链DNA(dsDNA)编辑盒的定向突变直接掺入基因组中。供体文库的构建涉及将理性设计的编辑寡核苷酸与指导RNA(gRNA)(其与靶DNA序列杂交)共转化到细胞中。将编辑寡核苷酸设计为使PAM的缺失或突变与相邻基因中一个以上所需密码子的突变结合。这使整个供体文库可在单个转化中生成。使用来自编辑寡核苷酸的合成特征(即同时整合到基因3'末端的第二种PAM缺失或突变),通过重组染色体的扩增(例如通过PCR反应)来检索供体文库。这将密码子靶标突变共价偶联到PAM缺失。然后将供体文库与目的gRNA载体共转化到细胞中,以创建表达理性设计的蛋白文库的细胞群。

[0330] 根据其他实施方式,如美国专利号9,982,278(其内容通过引用并入本文)所公开,使用CRISPR介导的系统进行可追踪的精确基因组编辑(称为可追踪CRISPR富集重组技术的基因组工程,GEN-TraCER)的方法可用于本发明的实施方式。GEN-TraCER法和载体在单个载体上结合了编辑盒和编码gRNA的基因。该盒包含所需突变和PAM突变。将还可编码Cas9的载体引入细胞或细胞群中。这会活化CRISPR系统在细胞或细胞群中的表达,导致gRNA将Cas9募集到目标区域(在该区域发生dsDNA断裂),从而整合PAM突变。

[0331] 可通过CRISPR法被永久性基因编辑的TIL沉默或抑制的基因的非限制性实例包括:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

[0332] 可通过CRISPR法通过永久性基因编辑的TIL来增强的基因的非限制性实例包括:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

[0333] 美国专利号8,697,359、8,993,233、8,795,965、8,771,945、8,889,356、8,865,406、8,999,641、8,945,839、8,932,814、8,871,445、8,906,616和8,895,308(其内容通过引用并入本文)中描述了通过CRISPR法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例,其可根据本发明的实施方式使用。进行CRISPR法的资源(例如表达CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1的质粒)可购自GenScript等公司。

[0334] 在一个实施方式中,如本文所述,可使用如美国专利号US 9,790,490(其公开内容通过引用并入本文)中所述的CRISPR/Cpf1系统对TIL群进行基因修饰。CRISPR/Cpf1系统在功能上不同于CRISPR-Cas9系统,因为Cpf1相关CRISPR阵列无需另外的tracrRNA即可被加工成成熟crRNA。CRISPR/Cpf1系统中使用的crRNA具有间隔区或指导序列以及直接重复序列。使用此种方法形成的Cpf1p-crRNA复合物本身足以切割靶DNA。

[0335] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas9或CRISPR/Cpf1系统,用于调节至少一种蛋白质的表达。

[0336] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群；

其中，电穿孔步骤包括递送成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) /Cas9或CRISPR/Cpf1系统，用于抑制PD-1和LAG-3的表达。

2. TALE法

[0337] 将TIL扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述方法的任何实施方式 (例如过程2A) 或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所述进行，其中，该方法还包括通过TALE法对至少一部分TIL进行基因编辑。根据具体实施方式，TIL扩增期间使用TALE法导致至少一部分治疗性TIL群中一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。或者，TIL扩增期间使用TALE法导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强。

[0338] TALE表示“转录激活因子样效应物”蛋白，其包括TALEN (“转录激活因子样效应物核酸酶”)。在本文中，使用TALE系统进行基因编辑的方法也可称为TALE法。TALE是植物病原细菌黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 中天然存在的蛋白质，并包含DNA结合结构域 (由一系列33至35个氨基酸重复结构域组成)，每个结构域识别单个碱基对。TALE特异性由两个称为重复可变双残基 (RVD) 的高变氨基酸确定。模块TALE重复序列连接在一起以识别连续的DNA序列。DNA结合域中的特定RVD识别目标基因座中的碱基，从而提供组装可预测的DNA结合域的结构特征。将TALE的DNA结合结构域与IIS FokI型核酸内切酶的催化结构域融合，形成可靶向的TALE核酸酶。为诱导位点特异性突变，两个单独的TALEN臂 (由14至20个碱基对的间隔区隔开) 使FokI单体紧密接近以进行二聚化并产生目标双链断裂。

[0339] 利用各种组装方法的多项大型系统研究表明，可组合TALE重复序列以识别用户定义的几乎任何序列。能快速组装定制TALE阵列的策略包括Golden Gate分子克隆、高通量固相组装和不依赖连接的克隆技术。定制设计的TALE阵列也可购自Cellestis Bioresearch (法国巴黎)、Transposagen Biopharmaceuticals (美国肯塔基州列克星敦) 和Life Technologies (美国纽约州格兰德岛)。此外，还可使用基于Web的工具 (例如TAL Effector-Nucleotide Target 2.0)，其可针对所需靶标设计定制TAL效应子重复序列，还可以提供预测的TAL效应子结合位点。参见Doyle等，*Nucleic Acids Research* 2012, 40:W117-W122。适用于本发明的TALE和TALEN方法的实例描述于美国专利申请公开号US 2011/0201118 A1、US 2013/0117869 A1、US 2013/0315884 A1、US 2015/0203871 A1和US 2016/0120906 A1，其公开内容通过引用并入本文。

[0340] 根据本发明的一个实施方式，TALE法包括通过抑制或阻止靶基因的转录来沉默或减少一种以上免疫检查点基因的表达。例如，TALE法可以包括利用KRAB-TALE，其中该方法包括将转录的Kruppel相关盒 (KRAB) 结构域融合到靶向基因转录起始位点的DNA结合结构域，从而抑制或防止基因转录。

[0341] 根据另一个实施方式，TALE法包括通过在靶基因引入突变来沉默或减少一种以上免疫检查点基因的表达。例如，TALE法可以包括将核酸酶效应子结构域 (例如FokI) 融合到TALE DNA结合结构域，产生TALEN。FokI是活跃的二聚体；因此，该方法包括构建成对的TALEN，以将FOK1核酸酶结构域定位到相邻的基因组靶位点 (在该位点引入DNA双链断裂)。FokI的正确定位和二聚化后，可完成双链断裂。引入双链断裂后，可通过两种不同的机制完成DNA的修复：高保真的同源重组对 (HRR) (也称为同源性定向修复或HDR) 或易出错 (error-

prone)的非同源末端连接(NHEJ)。通过NHEJ修复双链断裂优选导致DNA靶位点缺失、插入或取代,即NHEJ通常导致在断裂位点引入小的插入和缺失,通常引起敲除基因功能的移码。根据具体实施方式,TALEN对靶向基因的最5'外显子,促进早期移码突变或过早的终止密码子。优选地,由TALEN引入的基因突变是永久性的。因此,根据一个实施方式,该方法包括通过利用二聚化的TALEN诱导位点特异性双链断裂来沉默或降低免疫检查点基因的表达,所述双链断裂通过易出错的NHEJ修复,从而导致靶标免疫检查点基因中的一个以上突变。

[0342] 根据其他实施方式,TALEN被用于通过HRR引入基因改变,例如DNA片段的非随机点突变、靶向缺失或添加。DNA双链断裂的引入使得能够在合适的供体DNA的存在下通过同源重组进行基因编辑。根据一个实施方式,该方法包括共递送二聚化的TALEN和携带基因座特异性同源臂的供体质粒,以诱导位点特异性双链断裂并将一个以上转基因整合到DNA中。

[0343] 根据另一个实施方式,如美国专利公开号2011/0201118所公开的,可根据本发明的实施方式使用TALEN,TALEN是源自FokI和AvrXa7的杂合蛋白。该TALEN保留了对AvrXa7的靶核苷酸的识别特异性和对FokI的双链DNA切割活性。可使用相同方法来制备具有不同识别特异性的其他TALEN。例如,可通过工程化具有不同RVD组的核心TALE支架来产生致密TALEN,以改变DNA结合特异性并靶向特定的单个dsDNA靶序列。参见美国专利公开号2013/0117869。可将选择的催化结构域连接到支架上以进行DNA加工,可对其进行改造以确保当融合到核心TALE支架上时,催化结构域能够处理单个dsDNA靶序列附近的DNA。肽接头也可被工程化以将催化结构域融合到支架上,以产生由单一多肽链制成的紧凑TALEN,其不需要二聚化即可靶向特定的单一dsDNA序列。还可通过将可能是TAL单体的催化结构域融合到其N-末端来修饰核心TALE支架,从而使该催化结构域可与融合到另一个TAL单体的另一个催化结构域相互作用,从而产生一个可能在目标序列附近加工DNA的催化实体。参见美国专利公开号2015/0203871。此种结构仅允许靶向一条DNA链,而经典TALEN结构则不能作此选择。

[0344] 根据本发明的一个实施方式,可使用常规RVD产生能够显著降低基因表达的TALEN。在一个实施方式中,四个RVD(即NI,HD,NN和NG)分别用于靶向腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶。这些常规RVD可用于例如创建靶向PD-1基因的TALEN。使用常规RVD的TALEN的实例包括在Gautron等,Molecular Therapy:Nucleic Acids 2017年12月,9:312-321(其内容通过引用并入本文)公开的T3v1和T1 TALEN。T3v1和T1 TALEN靶向PD-L1结合位点所在的PDCD1基因座的第二个外显子,能够显著降低PD-1产生。在一个实施方式中,T1 TALEN通过使用靶标SEQ ID NO:127来进行,而T3v1 TALEN通过使用靶标SEQ ID NO:128来进行。

[0345] 根据另一个实施方式,例如如Gautron所公开的,使用非常规RVD修饰TALEN以改善其对靶基因的活性和特异性。对于高变氨基酸位置,天然存在的RVD仅覆盖潜在多样性库中的一小部分。非常规RVD提供了天然RVD的替代方法,具有新型内在靶向特异性功能,可用于排除TALEN对异位(off-site)靶点(相对于靶点序列含有少量错配的基因组内序列)的靶向。如Juillerat等,Scientific Reports 5,文章编号8150(2015)(其内容通过引用并入本文)所公开,可通过生成和筛选TALEN集合来鉴定非常规RVD,所述TALEN在阵列定义位置的两个高变氨基酸位置包含氨基酸的替代组合。接下来,可选择非常规RVD以区分错配位置上存在的核苷酸,这可防止异位序列处的TALEN活性,同时仍允许对靶标位置进行适当处理。然后,可使用所选的非常规RVD替换TALEN中的常规RVD。已用非常规RVD代替常规RVD的TALEN的示例包括Gautron生产的T3v2和T3v3 PD-1 TALEN。与使用常规RVD的TALEN相比,这

些TALEN具有更高的特异性。

[0346] 根据其他实施方式,TALEN可用于引入基因改变以沉默或减少两种基因的表达。例如,可产生两种不同的TALEN以靶向两种不同基因,然后一起使用。由两种TALEN在其各自的基因座和潜在的脱靶(off-target)位点产生的分子事件可通过高通量DNA测序来表征。这样使得能够分析脱靶位点,并识别使用两种TALEN可能得到的位点。基于此信息,可选择适当的常规和非常规RVD来工程化TALEN,即使它们一起使用时也具有增加的特异性和活性。例如,Gautron公开了组合使用T3v4 PD-1和TRAC TALEN以产生双重敲除的CAR T细胞,该CAR T细胞保持了有效的体外抗肿瘤功能。

[0347] 在一个实施方式中,可使用Gautron的方法或本文所述其他方法对TIL进行基因编辑,然后可通过本文所述的任何程序对经基因编辑的TIL进行扩增。在一个实施方式中,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括以下步骤:

(a) 使用CD3和CD28活化磁珠或抗体,对获自患者切除肿瘤的第一TIL群进行活化1至5天;

(b) 使用转录激活因子样效应物核酸酶的电穿孔,对至少一部分第一TIL群进行基因编辑,获得第二TIL群;

(c) 可选地孵育第二TIL群;

(d) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第二TIL群进行第一次扩增,产生第三TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约3至14天,获得第三TIL群;

(e) 通过向第三TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第四TIL群;其中,第二次扩增进行约7至14天,获得第四TIL群;其中,第四TIL群是治疗性TIL群;

(f) 收获从步骤(e)获得的治疗性TIL群;

(g) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(h) 其中,步骤(a)至(g)中的一个以上步骤在封闭的无菌系统中进行。

[0348] 在一个实施方式中,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括以下步骤:

(a) 使用CD3和CD28活化磁珠或抗体,对获自患者切除肿瘤的第一TIL群进行活化1至5天;

(b) 使用转录激活因子样效应物核酸酶的电穿孔,在Cytoporation培养基中对至少一部分第一TIL群进行基因编辑,获得第二TIL群;

(c) 可选地孵育第二TIL群;

(d) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第二TIL群进行第一次扩增,产生第三TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约6至9天,获得第三TIL群;

(e) 通过向第三TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第四TIL群;其中,第二次扩增进行约9至11天,获得第四TIL群;其中,第四TIL群是治疗性TIL群;

(f) 收获从步骤 (e) 获得的治疗性TIL群；

(g) 将从步骤 (e) 收获的TIL群转移至输液袋；其中，从步骤 (e) 到步骤 (f) 的转变在不打开系统的情况下发生；以及

(h) 其中，步骤 (a) 至 (g) 中的一个以上步骤在封闭的无菌系统中进行。

[0349] 在一个实施方式中，将肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 扩增成治疗性TIL群的方法包括以下步骤：

(a) 使用CD3和CD28活化磁珠或抗体，对获自患者切除肿瘤的第一TIL群进行活化1至5天；

(b) 使用转录激活因子样效应物核酸酶的电穿孔，在Cytoporation培养基中对至少一部分第一TIL群进行基因编辑，获得第二TIL群；

(c) 可选地孵育第二TIL群；其中，孵育在约30℃至40℃、约5%的CO₂下进行；

(d) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第二TIL群进行第一次扩增，产生第三TIL群；其中，第一次扩增在提供第一透气表面积 of 的封闭容器中进行；其中，第一次扩增进行约6至9天，获得第三TIL群；

(e) 通过向第三TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞 (APC) 进行第二次扩增，产生第四TIL群；其中，第二次扩增进行约9至11天，获得第四TIL群；其中，第四TIL群是治疗性TIL群；

(f) 收获从步骤 (e) 获得的治疗性TIL群；

(g) 将从步骤 (e) 收获的TIL群转移至输液袋；其中，从步骤 (e) 到步骤 (f) 的转变在不打开系统的情况下发生；以及

(h) 其中，步骤 (a) 至 (g) 中的一个以上步骤在封闭的无菌系统中进行。

[0350] 根据另一个实施方式，可以特别设计TALEN，其允许靶细胞内更高比率的DSB事件（其能靶向特定选择的基因）。参见美国专利公开号2013/0315884。此种稀有切割核酸内切酶的使用增加了转染细胞中靶基因双失活的机会，从而可以生产工程化细胞（例如T细胞）。此外，可将另外的催化结构域与TALEN一起引入以增加诱变作用并增强靶基因的失活。美国专利公开号2013/0315884中描述的TALEN已成功用于工程化T细胞，使其适合免疫疗法。TALEN也可用于使T细胞中的各种免疫检查点基因失活，包括使单个T细胞中至少两种基因失活。参见美国专利公开号2016/0120906。此外，如美国专利公开号2018/0021379（其内容通过引用并入本文）中所公开，TALEN可用于使编码免疫抑制剂和T细胞受体的靶标的基因失活。此外，如美国专利公开号2019/0010514（其内容通过引用并入本文）中所公开，TALEN可用于抑制β2-微球蛋白 (B2M) 和/或II类主要组织相容性复合物反式激活因子 (CIITA) 的表达。

[0351] 可通过TALE法通过永久性基因编辑TIL来沉默或抑制的基因的非限制性实例包括：PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、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和GUCY1B3。

[0352] 下表提供了靶向PD-1基因的TALE核酸酶的非限制性实例。在这些实例中，靶向的

基因组序列包含两个由15bp间隔区(以小写字母显示)分隔的17个碱基对(bp)的长序列(称为半靶标(half target),以大写字母显示)。通过表中所列的半TALE核酸酶的重复序列识别每个半靶标。因此,根据具体实施方式,本发明的TALE核酸酶识别并切割选自SEQ ID NO:127和SEQ ID NO:128的靶序列。如上所述,TALEN序列和基因编辑方法也描述于Gautron。

编号	PD-1 靶序列	重复序列	半 TALE 核酸酶
1	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (SEQ ID NO: 127)	重复 PD-1-左 (SEQ ID NO: 129)	PD-1-左 TALEN (SEQ ID NO: 133)
		重复 PD-1-右 (SEQ ID NO: 130)	PD-1-右 TALEN (SEQ ID NO: 134)
2	TACCTCTGTGGGGCCAT ctccctggccccaa GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO: 128)	重复 PD-1-左 (SEQ ID NO: 131)	PD-1-左 TALEN (SEQ ID NO: 135)
		重复 PD-1-右 (SEQ ID NO: 132)	PD-1-右 TALEN (SEQ ID NO: 136)

[0353] 在一个实施方式中,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括以下步骤:

- (a) 使用CD3和CD28活化磁珠或抗体,对获自患者切除肿瘤的第一TIL群进行活化1至5天;
- (b) 使用靶向PDCD1的转录激活因子样效应物核酸酶的电穿孔,在Cytoporation培养基中对至少一部分第一TIL群进行基因编辑,获得第二TIL群;
- (c) 可选地孵育第二TIL群;其中,孵育在约30℃至40℃、约5%的CO₂下进行;
- (d) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第二TIL群进行第一次扩增,产生第三TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积 of 的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约6至9天,获得第三TIL群;
- (e) 通过向第三TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第四TIL群;其中,第二次扩增进行约9至11天,获得第四TIL群;其中,第四TIL群是治疗性TIL群;
- (f) 收获从步骤(e)获得的治疗性TIL群;
- (g) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;以及
- (h) 其中,步骤(a)至(g)中的一个以上步骤在封闭的无菌系统中进行。

[0354] 在一个实施方式中,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括以下步骤:

- (a) 使用CD3和CD28活化磁珠或抗体,对获得自患者切除肿瘤的第一TIL群进行活化1至5天;
- (b) 使用靶向SEQ ID NO:128的转录激活因子样效应物核酸酶的电穿孔,在Cytoporation培养基中对至少一部分第一TIL群进行基因编辑,获得第二TIL群;
- (c) 可选地孵育第二TIL群;其中,孵育在约30℃至40℃、约5%的CO₂下进行;

(d) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第二TIL群进行第一次扩增,产生第三TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约6至9天,获得第三TIL群;

(e) 通过向第三TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第四TIL群;其中,第二次扩增进行约9至11天,获得第四TIL群;其中,第四TIL群是治疗性TIL群;

(f) 收获从步骤(e)获得的治疗性TIL群;

(g) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(h) 其中,步骤(a)至(g)中的一个以上步骤在封闭的无菌系统中进行。

[0355] 在一个实施方式中,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括以下步骤:

(a) 使用CD3和CD28活化磁珠或抗体,对获自患者切除肿瘤的第一TIL群进行活化1至5天;

(b) 使用根据SEQ ID NO:135和SEQ ID NO:136的转录激活因子样效应物核酸酶mRNA的电穿孔,在Cytoporation培养基中对至少一部分第一TIL群进行基因编辑,获得第二TIL群;

(c) 可选地孵育第二TIL群;其中,孵育在约30℃至40℃、约5%的CO₂下进行;

(d) 通过在包含IL-2和可选的OKT-3的细胞培养基中培养第二TIL群进行第一次扩增,产生第三TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约6至9天,获得第三TIL群;

(e) 通过向第三TIL群的细胞培养基补充另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第四TIL群;其中,第二次扩增进行约9至11天,获得第四TIL群;其中,第四TIL群是治疗性TIL群;

(f) 收获从步骤(e)获得的治疗性TIL群;

(g) 将从步骤(e)收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(e)到步骤(f)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(h) 其中,步骤(a)至(g)中的一个以上步骤在封闭的无菌系统中进行。

[0356] 可通过TALE法通过永久性基因编辑TIL来增强的基因的其他非限制性实例包括:CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

[0357] 美国专利号8,586,526(其内容通过引用并入本文)中描述了通过TALE法来改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例,其可根据本发明的实施方式使用。这些公开的实例包括使用具有两个以上TALE重复单元的非天然存在的DNA结合多肽,该重复单元包含重复RVD、由TALE蛋白残基制成的N-帽多肽和由TALE蛋白的全长C-末端区域的片段制成的C帽多肽。

[0358] Valton等,Methods 2014,69:151-170(其内容通过引用并入本文)中描述了可用于有效地进行TALEN介导的基因整合和失活的TALEN设计和设计策略、活性评估、筛选策略和方法的实例,其可根据本发明的实施方式使用。

[0359] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送TALE核酸酶系统,用于调节至少一种蛋白质的表达。

[0360] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送TALE核酸酶系统,用于抑制PD-1和LAG-3的表达。

3. 锌指法

[0361] 将TIL扩增成治疗性TIL群的方法可根据本文所述方法的任何实施方式(例如过程2A)或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所述进行,其中,该方法还包括通过锌指法或锌指核酸酶法对至少一部分TIL进行基因编辑。根据具体实施方式,TIL扩增期间使用锌指法导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达被沉默或减少。或者,TIL扩增期间使用锌指法导致至少一部分治疗性TIL群的一种以上免疫检查点基因的表达增强。

[0362] 单个锌指以保守的 $\beta\beta\alpha$ 构型包含约30个氨基酸。 α -螺旋表面上的几个氨基酸通常接触DNA大沟(major groove)内的3bp,选择性水平各不相同。锌指具有两个蛋白质结构域。第一结构域是DNA结合结构域,其包含真核转录因子并包含锌指。第二个结构域是核酸酶结构域,其包含FokI限制性内切酶并负责DNA的催化裂解。

[0363] 单个ZFN的DNA结合结构域通常包含3至6个单个锌指重复序列,单个ZFN可识别9至18个碱基对。如果锌指结构域对它们的预期靶位点具有特异性,那么理论上,甚至一对3指ZFN(识别总共18个碱基对)可以靶向哺乳动物基因组中的单个基因座。产生新的锌指阵列的一种方法是结合特异性已知的较小锌指“模块”。最常见的模块组装过程包括组合三个单独的锌指(每个锌指可识别3个碱基对的DNA序列)以生成3指阵列(可识别9个碱基对的目标位点)。或者,可使用基于选择的方法(例如寡聚体库工程(OPEN, oligomerized pool engineering))从随机文库中选择新的锌指阵列,其考虑了相邻的指之间的背景相关交互作用。工程化的锌指可商购;Sangamo Biosciences(美国加利福尼亚州里士满)与Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)合作开发了用于锌指构建的合适平台(CompoZr[®])。

[0364] 可通过锌指法通过永久性基因编辑TIL来沉默或抑制的基因的非限制性实例包括:PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、CISH、TGF β 、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和GUCY1B3。

[0365] 可通过锌指法通过永久性基因编辑TIL来增强的基因的非限制性实例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2细胞内结构域(ICD)和/或NOTCH配体mDLL1。

[0366] 可根据本发明的实施方式使用的通过锌指法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利号6,534,261、6,607,882、6,746,838、6,794,136、6,824,978、6,866,997、6,933,113、6,979,539、7,013,219、7,030,215、7,220,719、7,241,573、7,241,574、7,585,849、7,595,376、6,903,185和6,479,626,其内容通过引用并入本文。

[0367] 可根据本发明的实施方式使用的通过锌指法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的其他实例描述于Beane等,Mol. Therapy 2015,23:1380-1390,其公开内容通过

引用并入本文。

[0368] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送锌指核酸酶系统,用于调节至少一种蛋白质的表达。

[0369] 根据一个实施方式,将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群的方法包括:

(a) 通过将从患者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片,由患者切除的肿瘤获得第一TIL群;

(b) 将肿瘤碎片加入封闭系统中;

(c) 通过在包含IL-2且可选地包含4-1BB激动剂抗体的细胞培养基中培养第一TIL群约2天至5天,来进行第一次扩增;

(d) 添加OKT-3,产生第二TIL群;其中,第一次扩增在提供第一透气表面积的封闭容器中进行;其中,第一次扩增进行约1天至3天,获得第二TIL群;其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少50倍;其中,从步骤(c)到步骤(d)的转变在不打开系统的情况下发生;

(e) 对第二TIL群进行无菌电穿孔步骤;其中,无菌电穿孔步骤介导至少一种基因编辑器的转移;

(f) 使第二TIL群静息约1天;

(g) 通过向第二TIL群的细胞培养基中补充另外的IL-2、可选的OKT-3抗体、可选的OX40抗体和抗原呈递细胞(APC)进行第二次扩增,产生第三TIL群;其中,第二次扩增进行约7天至11天,获得第三TIL群;其中,第二次扩增在提供第二透气表面积的封闭容器中进行;其中,从步骤(f)到步骤(g)的转变在不打开系统的情况下发生;

(h) 收获从步骤(g)获得的治疗性TIL群,提供收获的TIL群;其中,从步骤(g)到步骤(h)的转变在不打开系统的情况下发生;其中,收获的TIL群是治疗性TIL群;

(i) 将收获的TIL群转移至输液袋;其中,从步骤(h)到步骤(i)的转变在不打开系统的情况下发生;以及

(j) 使用基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基冷冻保存收获的TIL群;

其中,电穿孔步骤包括递送锌指核酸酶系统,用于抑制PD-1和LAG-3的表达。

四、TIL生产过程

[0370] 图1描述了一个包含这些特征中的一些特征的示例性的TIL过程(称为过程2A),图2描述了本发明的此实施方式相对于过程1C的一些优点,图14也是。图3显示了用于比较的过程1C。图4(较高的细胞计数)和图5(较低的细胞计数)显示了基于过程2A的TIL治疗的两个替代时间线。图6和图9示出了过程2A的一个实施方式。图13和14进一步提供了与示例性1C过程相比的示例性2A过程。

[0371] 如本文所讨论的,本发明可以包括与冷冻保存的TIL的再刺激有关的步骤,以在移植入患者之前增加其代谢活性并因此增加相对健康,以及测试所述代谢健康的方法。如本文一般概述的,TIL通常取自患者样品并在移植入患者之前进行操作以扩增其数量。在一些实施方式中,TIL可以可选地进行如下所述的基因操作。

[0372] 在一些实施方式中,可以冷冻保存TIL。一旦解冻,在输注给患者之前,也可对它们进行再刺激以增加它们的新陈代谢。

[0373] 在一些实施方式中,如下文详述以及实施例和附图中所讨论的,第一次扩增(包括称为preREP的过程以及图9中步骤A所示的过程)被缩短为3天至14天,第二次扩增(包括称为REP的过程以及图9中步骤B所示的过程)被缩短为7天至14天。在一些实施方式中,如实施例中所述以及如图4、图5和图27中所示,第一次扩增(例如如图9中步骤B中所述的扩增)被缩短为11天,第二次扩增(例如如图9中步骤D中所述的扩增)被缩短为11天。在一些实施方式中,如下文详述以及实施例和附图中所讨论的,第一次扩增和第二次扩增(例如如图9中步骤B和步骤D所述的扩增)的组合被缩短为22天。

[0374] 下文的“步骤”标记A、B、C等参考图9和本文所述的某些实施方式。下述的和图9中的步骤排序是示例性的,本申请和本文公开的方法预期步骤的任何组合或顺序,以及附加步骤、步骤的重复和/或步骤的省略。

A、步骤A:获得患者肿瘤样品

[0375] 通常,TIL最初从患者肿瘤样品获得(“原代TIL”),然后如本文所述地扩增为更大的群用于进一步操作,可选地,如本文所概述的冷冻保存、再刺激,并可选地评估表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

[0376] 可使用本领域已知的方法获得患者肿瘤样品,通常通过手术切除、穿刺活检或者用于获得含有肿瘤和TIL细胞混合物的样品的其他手段。通常,肿瘤样品可以来自任何实体瘤,包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或者转移性肿瘤。肿瘤样品也可以是液体肿瘤,例如,从血液恶性肿瘤获得的肿瘤。实体瘤可以是任何癌症类型,包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌和皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑色素瘤)。在一些实施方式中,有用的TIL获自恶性黑色素瘤肿瘤,因为据报道这些恶性黑色素瘤肿瘤具有特别高水平的TIL。

[0377] 术语“实体瘤”指通常不包含囊肿或者液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或者恶性的。术语“实体瘤癌”指恶性、肿瘤性或者癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤 (carcinoma) 和淋巴瘤, 例如肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。在一些实施方式中, 癌症选自宫颈癌、头颈癌 (包括例如头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC))、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室, 包括实质 (癌细胞) 和支持的基质细胞 (癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

[0378] 术语“血液恶性肿瘤”指造血和淋巴组织 (包括但不限于血液、骨髓、淋巴结和淋巴系统的组织) 的哺乳动物癌症和肿瘤。血液恶性肿瘤也称为“液体肿瘤”。血液恶性肿瘤包括但不限于急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞淋巴瘤 (CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、急性髓样白血病 (AML)、慢性粒细胞白血病 (CML)、急性单核细胞白血病 (AMoL)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。术语“B细胞血液恶性肿瘤”指影响B细胞的血液恶性肿瘤。

[0379] 一旦获得肿瘤样品, 通常使用锐器解剖法 (sharp dissection) 将肿瘤样品切成 1mm^3 至约 8mm^3 的小块; 其中, 约 2mm^3 至 3mm^3 是特别有用的。使用酶促肿瘤消化液从这些碎片培养 TIL。此种肿瘤消化液可通过在酶培养基 (例如 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 缓冲液、2mm 谷氨酸盐、10mcg/mL 庆大霉素、30U/mL DNase 和 1.0mg/mL 胶原酶) 中孵育然后机械解离 (例如使用组织解离剂) 来产生。肿瘤消化液可通过将肿瘤置于酶培养基中并将肿瘤机械解离约 1 分钟来产生, 然后在 37°C 、5% CO_2 中孵育 30 分钟, 然后在上述条件下进行机械解离和孵育的重复循环, 直至仅存在小的组织碎片。在该过程结束时, 如果细胞悬液含有大量红细胞或死细胞, 则可使用 FICOLL 分支亲水性多糖进行密度梯度分离以除去这些细胞。可使用本领域已知的替代方法, 例如美国专利申请公开号 2012/0244133A1 中描述的那些, 其公开内容通过引用并入本文。任何前述方法都可用于本文所述扩增 TIL 的方法或治疗癌症的方法的任何实施方式中。

[0380] 通常, 收获的细胞悬液称为“原代细胞群”或者“新鲜收获的”细胞群。

[0381] 在一些实施方式中, 碎片化包括物理碎片化, 包括例如切碎和消化。在一些实施方式中, 碎片化是物理碎片化。在一些实施方式中, 碎片化是切碎。在一些实施方式中, 碎片化是通过消化。在一些实施方式中, 可通过酶促肿瘤消化液和从患者获得的肿瘤碎片来对 TIL 进行初始培养。

[0382] 在一些实施方式中, 当肿瘤是实体瘤时, 例如在步骤 A 中获得肿瘤样品后, 肿瘤经历物理破碎 (如图 9 所提供)。在一些实施方式中, 碎片化发生在冷冻保存之前。在一些实施方式中, 碎片化发生在冷冻保存之后。在一些实施方式中, 碎片化发生在获得肿瘤之后并且没有任何冷冻保存的情况下。在一些实施方式中, 肿瘤是碎片化的, 并且将 10、20、30、40 或者更多个碎片或者片放置在各个容器中用于第一次扩增。在一些实施方式中, 肿瘤是碎片化的, 并且将 30 或 40 个碎片或者片放置在各个容器中用于第一次扩增。在一些实施方式中, 肿瘤是碎片化的, 并且将 40 个碎片或者片放置在各个容器中用于第一次扩增。在一些实施方式中, 多个碎片包括约 4 个至约 50 个碎片; 其中, 每个碎片的体积为约 27mm^3 。在一些实施方式中, 多个碎片包括约 30 个至约 60 个碎片, 碎片总体积为约 1300mm^3 至约 1500mm^3 。在一些实施方式中, 多个碎片包括约 50 个碎片, 碎片总体积为约 1350mm^3 。在一些实施方式中, 多个碎片包括约 50 个碎片, 碎片总质量为约 1 克至约 1.5 克。在一些实施方式中, 多个碎片包括

约4个碎片。

[0383] 在一些实施方式中,TIL获自肿瘤碎片。在一些实施方式中,通过锐器解剖法获得肿瘤碎片。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约1mm³至10mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约1mm³至8mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约1mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约2mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约3mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约4mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约5mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约6mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约7mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约8mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约9mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约10mm³。

[0384] 在一些实施方式中,TIL获自肿瘤消化物。在一些实施方式中,肿瘤消化物通过在酶培养基(例如但不限于RPMI 1640、2mm GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNase和1.0mg/mL胶原酶)中孵育,然后机械解离(GentleMACS,MiltenyiBiotec,Auburn,加利福尼亚州)来产生。将肿瘤置于酶培养基中后,可以机械解离肿瘤约1分钟。然后将溶液在37℃、5%CO₂中孵育30分钟,然后再次机械破碎约1分钟。在37℃、5%CO₂中再次孵育30分钟后,可以第三次机械破碎肿瘤约1分钟。在一些实施方式中,在第三次机械破碎后,如果存在大块组织,则对样品施加1或者2次另外的机械解离,在或者不在37℃、5%CO₂中进行另外的30分钟孵育。在一些实施方式中,在最终孵育结束时,如果细胞悬液含有大量红细胞或者死细胞,则可使用Ficoll进行密度梯度分离以除去这些细胞。

[0385] 在一些实施方式中,在第一次扩增步骤之前获得的细胞悬液称为“原代细胞群”或者“新鲜收获的”细胞群。

[0386] 在一些实施方式中,可选地,可以在收获样品后将细胞冷冻,并在进入步骤B所述扩增之前冷冻保存,这将在下文进一步详细描述并在图9中进行举例说明。

B、步骤B:第一次扩增

1、年轻TIL

[0387] 在一些实施方式中,本发明方法提供获得年轻TIL,年轻TIL能够在施用给受试者/患者后增加复制周期,因此相对于较老TIL(即,在施用给受试者/患者之前进一步经历了更多轮复制的TIL)可以提供其他治疗益处。文献中已经描述了年轻TIL的特征,例如Donia等,Scandinavian Journal of Immunology,75:157-167(2012);Dudley等,Clin Cancer Res,16:6122-6131(2010);Huang等,J Immunother,28(3):258-267(2005);Besser等,Clin Cancer Res,19(17):OF1-OF9(2013);Besser等,J Immunother,32:415-423(2009);Bunds等,J Immunother,32:415-423(2009);Robbins等,J Immunol,2004;173:7125-7130;Shen等,J Immunother,30:123-129(2007);Zhou等,J Immunother,28:53-62(2005)和Tran等,J Immunother,31:742-751(2008),其全部内容通过引用整体并入本文。

[0388] T和B淋巴细胞的多种抗原受体通过有限但大量的基因片段的体细胞重组来产生。这些基因片段:V(可变区)、D(多变区)、J(结合区)和C(恒定区)确定免疫球蛋白和T细胞受体(TCR,T-cell receptor)的结合特异性和下游应用。本发明提供了产生TIL的方法,其显示并增加T细胞谱系的多样性。在一些实施方式中,通过本方法获得的TIL显示出T细胞谱系多样性的增加。在一些实施方式中,与新鲜收获的TIL和/或使用除本文提供的方法之外的其他方法(例如包括除了图9中所示那些之外的方法)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL显示出T细胞谱系多样性的增加。在一些实施方式中,与新鲜收获的TIL和/或使用如

图13所示的称为过程1C的方法制备的TIL相比,通过本方法获得的TIL显示出T细胞谱系多样性的增加。在一些实施方式中,第一次扩增中获得的TIL显示出T细胞谱系多样性的增加。在一些实施方式中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白重链多样性。在一些实施方式中,免疫球蛋白多样性是免疫球蛋白轻链多样性。在一些实施方式中,多样性是T细胞受体多样性。在一些实施方式中,多样性是选自 α 、 β 、 γ 和 δ 受体之一的T细胞受体的多样性。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR) α 和/或 β 的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR) α 的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR) β 的表达增加。在一些实施方式中,TCRab(即TCR α/β)的表达增加。

[0389] 例如,如图9的步骤A中所述,切开或者消化肿瘤碎片后,在有利于TIL生长(相对于肿瘤和其他细胞)的条件下,在含有IL-2的血清中培养所得细胞。在一些实施方式中,在2mL孔中的包含灭活的人AB血清和6000IU/mL的IL-2的培养基中孵育肿瘤消化物。培养此原代细胞群一段时间,通常为3天至14天,产生大量TIL群,通常为约 1×10^8 个大量TIL细胞。在一些实施方式中,培养此原代细胞群7天至14天,产生大量TIL群,通常约 1×10^8 个大量TIL细胞。在一些实施方式中,培养此原代细胞群10至14天,产生大量TIL群,通常约 1×10^8 个大量TIL细胞。在一些实施方式中,培养此原代细胞群约11天,产生大量TIL群,通常约 1×10^8 个大量TIL细胞。

[0390] 在一个优选实施方式中,TIL的扩增可以如下进行:使用如下文和此处所述的初始大量TIL扩增步骤(例如,如图9的步骤B中所述的那些,其可以包括称为pre-REP的过程),然后进行如下文步骤D和此处所述的第二次扩增(步骤D,包括称为快速扩增方案(REP)步骤的过程),随后可选地进行冷冻保存,然后进行如下文和此处所述的第二次步骤D(包括称为再刺激REP步骤的过程)。可选地,可对从该过程获得的TIL进行如本文所述的表型特征和代谢参数的表征。

[0391] 在用24孔板开始TIL培养的实施方式中,例如,使用Costar 24孔细胞培养板、平底(康宁公司,康宁,纽约),可以在每个孔接种2mL含有IL-2(6000IU/mL;Chiron Corp.,埃默里维尔,加利福尼亚州)的完全培养基(CM)中的 1×10^6 个肿瘤消化细胞或者一个肿瘤碎片。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约 1mm^3 至 10mm^3 。

[0392] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基被称为“CM”,其中CM是培养基的缩写。在一些实施方式中,步骤B的CM由含有GlutaMAX的RPMI 1640组成,补充有10%人AB血清、25mm HEPES和10mg/mL庆大霉素。在用容量为40mL、透气性硅底为 10cm^2 的透气性烧瓶(例如,G-Rex 10;Wilson Wolf Manufacturing,明尼苏达州新布莱顿)开始培养的实施方式中(图1),各个烧瓶装含有在10至40mL含有IL-2的CM中的 10×10^6 至 40×10^6 个活肿瘤消化细胞或者5至30个肿瘤碎片。在 37°C 、5% CO_2 的潮湿培养箱中孵育G-Rex 10和24孔板,培养开始5天后,移除一半培养基,换上新鲜的CM和IL-2,在第5天后,每2至3天更换一半的培养基。

[0393] 在制备肿瘤碎片后,在有利于TIL生长(相对于肿瘤和其他细胞)的条件下,在含有IL-2的血清中培养所得细胞(即碎片)。在一些实施方式中,肿瘤消化液在含有灭活的人AB血清(或在一些情况下,如本文所述,在aAPC细胞群存在下)和6000IU/mL IL-2的培养基的2mL孔中孵育。将该原代细胞群培养一段时间,通常为10至14天,产生大量TIL群,通常约 1×10^8 个大量TIL细胞。在一些实施方式中,第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体。

在一些实施方式中,IL是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施方式中,1mg小管的IL-2储备溶液具有 20×10^6 IU/mg至 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小管的IL-2储备溶液具有 20×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小管的IL-2储备溶液具有 25×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小管的IL-2储备溶液具有 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 4×10^6 IU/mg至 8×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 5×10^6 IU/mg至 7×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 6×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,如实施例4中所述制备IL-2储备溶液。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约10,000 IU/mL的IL-2,约9,000 IU/mL的IL-2,约8,000 IU/mL的IL-2,约7,000 IU/mL IL-2,约6000 IU/mL IL-2或约5,000 IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约9,000 IU/mL的IL-2至约5,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约8,000 IU/mL的IL-2至约6,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约7,000 IU/mL的IL-2至约6,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约6,000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一个优选实施方式中,细胞培养基包含约3000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000 IU/mL、约1500 IU/mL、约2000 IU/mL、约2500 IU/mL、约3000 IU/mL、约3500 IU/mL、约4000 IU/mL、约4500 IU/mL、约5000 IU/mL、约5500 IU/mL、约6000 IU/mL、约6500 IU/mL、约7000 IU/mL、约7500 IU/mL或者约8000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000 IU/mL、2000至3000 IU/mL、3000至4000 IU/mL、4000至5000 IU/mL、5000至6000 IU/mL、6000至7000 IU/mL、7000至8000 IU/mL或者约8000 IU/mL的IL-2。

[0394] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约500 IU/mL的IL-15、约400 IU/mL的IL-15、约300 IU/mL的IL-15、约200 IU/mL的IL-15、180 IU/mL的IL-15、约160 IU/mL的IL-15、约140 IU/mL的IL-15、约120 IU/mL的IL-15或者约100 IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约500 IU/mL的IL-15至约100 IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约400 IU/mL的IL-15至约100 IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约300 IU/mL的IL-15至约100 IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约200 IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,细胞培养基包含约180 IU/mL的IL-15。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-15。在一个优选实施方式中,细胞培养基包含约180 IU/mL的IL-15。

[0395] 在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约20 IU/mL的IL-21、约15 IU/mL的IL-21、约12 IU/mL的IL-21、约10 IU/mL的IL-21、约5 IU/mL的IL-21、约4 IU/mL的IL-21、约3 IU/mL的IL-21、约2 IU/mL的IL-21、约1 IU/mL的IL-21或者约0.5 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约20 IU/mL的IL-21至约0.5 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约15 IU/mL的IL-21至约0.5 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约12 IU/mL的IL-21至约0.5 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约10 IU/mL的IL-21至约0.5 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约5 IU/mL的IL-21至约1 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第一次扩增培养基包含约2 IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约1 IU/mL的IL-21。在一些实施方

式中,细胞培养基包含约0.5IU/mL的IL-21。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-21。在一个优选实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。

[0396] 在一个实施方式中,细胞培养基包含OKT-3抗体。OKT-3抗体可以从REP的第0天(即REP的开始日)和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)开始存在于细胞培养基中。在一些实施方式中,细胞培养基包含约30ng/mL的OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1 μ g/mL的OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng/mL、20ng/mL至30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL、40ng/mL至50ng/mL以及50ng/mL至100ng/mL的OKT-3抗体。在一些实施方式中,细胞培养基不包含OKT-3抗体。

[0397] 在一些实施方式中,第一次扩增的培养基被称为“CM”(培养基的缩写)。在一些实施方式中,将其称为CM1(培养基1)。在一些实施方式中,CM由具有GlutaMAX的RPMI 1640组成,补充有10%人AB血清、25mm Hepes和10mg/mL庆大霉素。在具有40mL容量和10cm²透气性硅底的透气性烧瓶(例如G-Rex 10;Wilson Wolf Manufacturing,新布莱顿,明尼苏达州)中开始培养的实施方式中(图1),各个烧瓶在含有IL-2的10-40mL CM中装载10 $\times$ 10⁶至40 $\times$ 10⁶个活肿瘤消化细胞或5至30个肿瘤碎片。将G-Rex 10和24孔板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的潮湿培养箱中培养,培养开始5天后,取出一半培养基,换上新鲜的CM和IL-2,在第5天后,每2-3天更换一半的培养基。在一些实施方式中,CM是实施例5中描述的CM1,参见实施例5。在一些实施方式中,第一次扩增发生在初始细胞培养基或第一细胞培养基中。在一些实施方式中,初始细胞培养基或第一细胞培养基包含IL-2。

[0398] 在一些实施方式中,如实施例和附图中所讨论的,第一次扩增(包括例如图9的步骤B中所述的那些过程,其可以包括有时称为pre-REP的那些过程)过程被缩短为3天至14天。在一些实施方式中,如实施例中所讨论以及如图4和图5中所示,以及包括例如图9的步骤B中所述的扩增,第一次扩增(包括例如图9的步骤B中所述的那些过程,其可以包括有时称为pre-REP的那些过程)被缩短为7天至14天。在一些实施方式中,如实施例中所讨论以及如图4和图5中所示,步骤B的第一次扩增被缩短至10天至14天。在一些实施方式中,如实施例中所讨论以及如图4和图5中所示,以及包括例如图9的步骤B中所述的扩增,第一次扩增被缩短为11天。

[0399] 在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或者14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行1天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行2天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行3天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行4天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行5天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行6天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行7天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行8天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行9天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行10天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行11天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行12天至14

天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行13天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行1天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行2天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行3天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行4天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行5天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行6天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以持续7天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行8天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行9天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行10天至11天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行11天。

[0400] 在一些实施方式中,在第一次扩增期间,采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,在第一次扩增期间,包括例如在根据图9的步骤B期间以及如此处所述,可以包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及它们的任何组合。在一些实施方式中,在第一次扩增期间,采用IL-2、IL-15和IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,在根据图9的步骤B期间以及如此处所述,可以包括IL-2、IL-15和IL-21以及它们的任何组合。

[0401] 在一些实施方式中,如实施例和附图中所讨论的,第一次扩增(包括被称为pre-REP的过程;例如,根据图9的步骤B)的过程被缩短为3天至14天。在一些实施方式中,如实施例中所讨论以及如图4和图5所示的,步骤B的第一次扩增被缩短为7天至14天。在一些实施方式中,如实施例中所讨论以及如图4、图5和图9所示的,步骤B的第一次扩增缩短至10至14天。在一些实施方式中,如实施例中所讨论以及如图4、图5和图9所示的,第一次扩增被缩短为11天。

[0402] 在一些实施方式中,第一次扩增,例如根据图9的步骤B,在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如此处所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是G-REX-10或者G-REX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

[0403] 在一些实施方式中,使用下文所述的任何4-1BB激动剂抗体,使用在扩增开始时添加至细胞培养基的另外的4-1BB激动剂抗体进行第一次扩增。

C、步骤C:第一次扩增向第二次扩增的转变

[0404] 在一些情况下,可使用下文讨论的方案,立即冷冻保存从第一次扩增获得的大量TIL群,包括例如从例如图9所示的步骤B收获的TIL群。可选地,可对第一次扩增收获的TIL群(称为第二TIL群)进行第二次扩增(其可以包括有时被称为REP的扩增),然后如下文所述冷冻保存。类似地,在基因修饰的TIL将被用于治疗的情况下,第一TIL群(有时被称为大量TIL群)或者第二TIL群(在一些实施方式中可以包括被称为REP TIL群的群)可以在扩增之前或者第一次扩增之后且在第二次扩增之前进行基因修饰以用于合适的治疗。

[0405] 在一些实施方式中,储存从第一次扩增(例如,如图9所示的步骤B)获得的TIL直至进行表型选择。在一些实施方式中,从第一次扩增(例如,如图9所示的步骤B)获得的TIL不储存而是直接进行第二次扩增。在一些实施方式中,在第一次扩增之后且在第二次扩增之前,不冷冻保存从第一次扩增获得的TIL。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的约3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或者14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的约3天至

14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的约4天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的约4天至10天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的约7天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的约14天。

[0406] 在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或者14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的1天至14天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行2天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的3天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的4天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的5天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的6天到14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的7天到14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的8天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的9天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的10天到14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的11天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的12天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的13天至14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的14天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的1天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的2天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的3天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的4天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的5天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的6天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的7天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的8天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的9天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的10天至11天。在一些实施方式中,第一次扩增向第二次扩增的转变发生在发生碎片化后的11天。

[0407] 在一些实施方式中,在第一次扩增之后和第二次扩增之前不储存TIL,并且TIL直接进行第二次扩增(例如,在一些实施方式中,从步骤B向步骤D转变的期间不进行储存)(如图9所示)。在一些实施方式中,如本文所述,转变在封闭系统中发生。在一些实施方式中,来自第一次扩增的TIL(即第二TIL群)不经历转变期而直接进入第二次扩增。

[0408] 在一些实施方式中,在封闭系统生物反应器中进行第一次扩增向第二次扩增的转变(例如根据图9的步骤C)。在一些实施方式中,如本文所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是G-REX-10或者G-REX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

D、步骤D:第二次扩增

[0409] 在一些实施方式中,例如在步骤A和步骤B之后,在收获和初始大量处理之后,TIL细胞群的数量增加,该转变称为步骤C,如图9所示。此种进一步的扩增在本文中称为第二次扩增,其可以包括本领域中通常称为快速扩增过程(Rep;以及图9的步骤D所示的过程)的扩增过程。通常在透气性容器中使用包含多种组分的培养基来完成第二次扩增,所述组分包括饲养细胞、细胞因子源(cytokine source)和抗CD3抗体。

[0410] 在一些实施方式中,TIL的第二次扩增或第二次TIL扩增(其可包括有时称为Rep的扩增;以及图9的步骤D中所示的过程)可使用本领域技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器进行。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或者14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约7天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约8天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约9天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约10天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约11天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约12天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约13天至约14天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可以进行约14天。

[0411] 在一个实施方式中,第二次扩增可使用本公开的方法在透气性容器中进行(包括例如称为Rep的扩增;以及如图9的步骤D中所示的过程)。例如,可以在白细胞介素2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)的存在下,使用非特异性T细胞受体刺激快速扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激可包括,例如,抗CD3抗体,例如约30ng/mL的OKT-3,一种小鼠单克隆抗CD3抗体(购自新泽西州拉里坦的Ortho-McNeil或加利福尼亚州奥本的Miltenyi Biotech)或者UHCT-1(购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend)。可选地在T细胞生长因子(如300IU/mL IL-2或IL-15)存在下,可通过在第二次扩增期间,在体外用包括一种以上癌症抗原(包括其抗原性部分,例如表位)诱导TIL的进一步刺激来快速扩增TIL,该抗原可可选地由载体表达,例如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3 μ M MART-L26-35(27L)或gp100:209-217(210M)。其他合适的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌抗原、MAGE-A3、SSX-2区和VEGFR2,或其抗原性部分。也可通过用表达HLA-A2的抗原呈递细胞脉冲的相同癌症抗原再刺激,来快速扩增TIL。或者,可以用例如经辐照的自体淋巴细胞或用经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激TIL。在一些实施方式中,再刺激作为第二次扩增的一部分发生。在一些实施方式中,在经辐照的自体淋巴细胞或者经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的存在下,发生第二次扩增。

[0412] 在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000IU/mL、约1500IU/mL、约2000IU/mL、约2500IU/mL、约3000IU/mL、约3500IU/mL、约4000IU/mL、约4500IU/mL、约5000IU/mL、约5500IU/mL、约6000IU/mL、约6500IU/mL、约7000IU/mL、约7500IU/mL,或约8000IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000IU/mL至2000IU/mL、2000IU/mL至3000IU/mL、3000IU/mL至4000IU/mL、4000IU/mL至5000IU/mL、5000IU/mL至6000IU/mL、6000IU/mL至7000IU/mL、7000IU/mL至8000IU/mL,或8000IU/mL的IL-2。

[0413] 在一个实施方式中,细胞培养基包含OKT-3抗体。OKT-3抗体可以从Rep的第0天(即Rep的开始日)和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)开始存在于细胞培养基中。在一些实施方式中,细胞培养基包含约30ng/mL的OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞

培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1 μ g/mL的OKT-3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1ng/mL至1ng/mL、1ng/mL至5ng/mL、5ng/mL至10ng/mL、10ng/mL至20ng/mL、20ng/mL至30ng/mL、30ng/mL至40ng/mL、40ng/mL至50ng/mL、50ng/mL至100ng/mL的OKT-3抗体。在一些实施方式中,细胞培养基不包含OKT-3抗体。

[0414] 在一些实施方式中,在第二次扩增期间采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,第二次扩增期间(包括例如根据图9的步骤D过程,以及如此处所述)可以包括IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21以及它们的任何组合。在一些实施方式中,在第二次扩增期间采用IL-2、IL-15和IL-21的组合作为组合。在一些实施方式中,在根据图9的步骤D过程中,以及如此处所述,可以包括IL-2、IL-15和IL-21及它们的任何组合。

[0415] 在一些实施方式中,第二次扩增可在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的补充细胞培养基中进行。在一些实施方式中,第二次扩增发生在补充细胞培养基中。在一些实施方式中,补充细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC;也称为抗原呈递饲养细胞)。在一些实施方式中,第二次扩增在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(即抗原呈递细胞)的细胞培养基中发生。

[0416] 在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约500IU/mL的IL-15、约400IU/mL的IL-15、约300IU/mL的IL-15、约200IU/mL的IL-15、约180IU/mL的IL-15、约160IU/mL的IL-15、约140IU/mL的IL-15、约120IU/mL的IL-15或者约100IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约500IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约400IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约300IU/mL的IL-15至约100IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约200IU/mL的IL-15。在一些实施方式中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-15。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-15。在一个优选实施方式中,细胞培养基包含约180IU/mL的IL-15。

[0417] 在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约20IU/mL的IL-21、约15IU/mL的IL-21、约12IU/mL的IL-21、约10IU/mL的IL-21、约5IU/mL的IL-21、约4IU/mL的IL-21、约3IU/mL的IL-21、约2IU/mL的IL-21、约1IU/mL的IL-21或者约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约20IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约15IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约12IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约10IU/mL的IL-21至约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约5IU/mL的IL-21至约1IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,第二次扩增培养基包含约2IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。在一些实施方式中,细胞培养基包含约0.5IU/mL的IL-21。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-21。在一个优选实施方式中,细胞培养基包含约1IU/mL的IL-21。

[0418] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞(APC)是PBMC。在一个实施方式中,在快速

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

[0419] 在一个实施方式中,REP和/或第二次扩增在烧瓶中进行;其中,大量TIL与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL的OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL的IL-2混合于150mL培养基中。进行培养基更换(通常通过吸入新鲜培养基替换2/3培养基),直至细胞转移至替代生长室。如下文更充分讨论的,替代生长室包括G-REX烧瓶和透气性容器。

[0420] 在一些实施方式中,如实施例和附图中所讨论的,第二次扩增(其可以包括称为REP过程)缩短至7天至14天。在一些实施方式中,第二次扩增缩短至11天。

[0421] 在一个实施方式中,REP和/或第二次扩增可使用如前所述的T-175烧瓶和透气袋(Tran等,J.I mmunother.,2008,31,742-51;Dudley等,J.I mmunother.,2003,26,332-42)或透气性培养皿(G-REX烧瓶)进行。在一些实施方式中,第二次扩增(包括称为快速扩增的扩增)在T-175烧瓶中进行,并且可将悬浮于150mL培养基中的约 1×10^6 个TIL添加至每个T-175烧瓶中。TIL可以在CM和AFM-V培养基的1:1混合物中培养,补充有3000IU/mL的IL-2和30ng/mL的抗CD3。T-175烧瓶可以在37℃、5%CO₂中孵育。在第5天,可使用含有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半培养基。在一些实施方式中,在第7天,可将来自两个T-175烧瓶的细胞合并并在3L袋中,将300mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM V添加至300mL TIL悬液中。每天或每2天计数各个袋中的细胞数,并添加新鲜培养基以使细胞计数保持为 0.5×10^6 至 2.0×10^6 个细胞/mL。

[0422] 在一个实施方式中,第二次扩增(其可以包括称为REP的扩增,以及图9的步骤D中提到的那些)可以在容量为500mL、透气性硅底为100cm²的透气性烧瓶(G-Rex 100,购自美国明尼苏达州新布莱顿的Wilson Wolf Manufacturing Corporation)中进行, 5×10^6 或 10×10^6 TIL可与PBMC一起培养在400mL的50/50培养基中,补充有5%人AB血清、3000IU/mL IL-2和30ng/mL抗CD3(OKT3)。G-REX 100烧瓶可以在37℃、5%CO₂中孵育。在第5天,可以取出250mL上清液并置于离心瓶中并以1500rpm (491×g)离心10分钟。可以用150mL含有5%人AB血清、3000IU/mL的IL-2的新鲜培养基重新悬浮TIL沉淀,并加回到原来的G-REX 100烧瓶中。当TIL在G-REX 100烧瓶中连续扩增时,在第7天,可将每个G-REX 100中的TIL悬浮于各个烧瓶中存在的300mL培养基中,并且可将细胞悬液分成可用于接种3个G-REX 100烧瓶的3个100mL等分试样。然后可以向各个烧瓶中添加150mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V。G-Rex 100烧瓶可以在37℃、5%CO₂中孵育,4天后,可以向每个G-REX 100烧瓶中添加150mL含有3000IU/mL IL-2的AIM-V。可以在培养的第14天收获细胞。

[0423] 在一个实施方式中,第二次扩增(包括称为REP的扩增)在烧瓶中进行;其中,大量TIL与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL IL-2混合于150mL培养基中。在一些实施方式中,进行培养基更换,直至细胞转移至替代生长室。在一些实施方式中,通过吸入新鲜培养基来更换2/3的培养基。在一些实施方式中,如下文更充分讨论的,替代生长室包括G-REX烧瓶和透气性容器。

[0424] 在一个实施方式中,进行第二次扩增(包括称为REP的扩增),并且还包括选择肿瘤

反应性优异的TIL的步骤。可使用本领域已知的任何选择方法。例如,美国专利申请公开号2016/0010058A1所述的方法(其公开内容通过引用并入本文)可用于选择肿瘤反应性优异的TIL。

[0425] 可选地,可使用本领域已知的标准检测法,在第二次扩增(包括称为REP扩增的扩增)之后进行细胞活力检测。例如,可对大量TIL样品进行台盼蓝拒染试验实验(trypan blue exclusion assay),其选择性地标记死细胞并允许活力评估。在一些实施方式中,可使用Cellometer K2自动细胞计数器(Nexcelom Bioscience,劳伦斯,马萨诸塞州)对TIL样品进行计数和检测活力。在一些实施方式中,根据例如实施例15中描述的Cellometer K2 Image Cytometer自动细胞计数方案测定活力。

[0426] 在一些实施方式中,TIL的第二次扩增(包括称为REP的扩增)可使用如前所述的T-175烧瓶和透气袋(Tran KQ、Zhou J、Durflinger KH等,2008,J.Immunother.,31:742-751和Dudley ME、Wunderlich JR、Shelton TE等,2003,J.Immunother.,26:332-342)或透气性G-Rex烧瓶进行。在一些实施方式中,第二次扩增使用烧瓶进行。在一些实施方式中,第二次扩增使用透气性G-Rex烧瓶进行。在一些实施方式中,第二次扩增在T-175烧瓶中进行,将约 1×10^6 TIL悬浮于约150mL培养基中,将它加至每个T-175烧瓶中。将TIL与经辐照的(50Gy)同种异体PBMC(作为“饲养”细胞)以1:100比率一起培养,将细胞在CM和AIM-V培养基的1:1混合物(50/50培养基)中培养,补充有3000IU/mL的IL-2和30ng/mL的抗CD3。将T-175烧瓶在37°C、5%CO₂中孵育。在一些实施方式中,在第5天,使用含有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半培养基。在一些实施方式中,在第7天,将来自2个T-175烧瓶的细胞合并于3L袋中,将300mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V添加至300mL TIL悬液中。可以每天或每2天计数各个袋中的细胞数,并且可以添加新鲜培养基以使细胞计数保持为约 0.5×10^6 至约 2.0×10^6 个细胞/mL。

[0427] 在一些实施方式中,第二次扩增(包括称为REP的扩增)在具有100cm²透气性硅底(G-REX 100,Wilson Wolf)的500mL容量的烧瓶中进行(图1),约 5×10^6 或 10×10^6 TIL与经辐照同种异体PBMC以1:100的比率在400mL的50/50培养基中培养,该50/50培养基补充有3000IU/mL的IL-2和30ng/mL的抗CD3。将G-Rex 100烧瓶在37°C、5%CO₂中孵育。在一些实施方式中,在第5天,取出250mL上清液并置于离心瓶中并以1500rpm(491g)离心10分钟。然后可以用150mL含有3000IU/mL的IL-2的新鲜50/50培养基重新悬浮TIL沉淀,并加回到原来的G-Rex 100烧瓶中。在TIL在G-REX 100烧瓶中连续扩增的实施方式中,在第7天,将每个G-Rex 100中的TIL悬浮于各个烧瓶中存在的300mL培养基中,将细胞悬液分成用于接种3个G-Rex 100烧瓶的3个100mL等分试样。然后向各个烧瓶中添加150mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V。G-REX 100烧瓶在37°C、5%CO₂中孵育,4天后,向每个G-REX 100烧瓶中添加150mL含有3000IU/mL IL-2的AIM-V。在培养的第14天收获细胞。

[0428] T和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因片段的体细胞重组产生的。这些基因片段:V(可变区)、D(多变区)、J(结合区)和C(恒定区)确定免疫球蛋白和T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供了产生TIL的方法,其显示并增加T细胞谱系的多样性。在一些实施方式中,通过本方法获得的TIL显示出T细胞谱系多样性的增加。在一些实施方式中,在第二次扩增中获得的TIL显示出T细胞谱系多样性的增加。在一些实施方式中,多样性的增加是免疫球蛋白多样性和/或T细胞受体多样性的增加。在一些实施方

式中,多样性是免疫球蛋白多样性,是免疫球蛋白重链多样性。在一些实施方式中,多样性是免疫球蛋白多样性,是免疫球蛋白轻链多样性。在一些实施方式中,多样性是T细胞受体多样性。在一些实施方式中,多样性是选自 α 、 β 、 γ 和 δ 受体之一的T细胞受体的多样性。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR) α 和/或 β 的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR) α 的表达增加。在一些实施方式中,T细胞受体(TCR) β 的表达增加。在一些实施方式中,TCR $\alpha\beta$ (即TCR α/β)的表达增加。

[0429] 在一些实施方式中,第二次扩增培养基(例如有时称为CM2或第二细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细讨论的。

[0430] 在一些实施方式中,第二次扩增(例如根据图9的步骤D)在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是G-REX-10或者G-REX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

1、饲养细胞和抗原呈递细胞

[0431] 在一个实施方式中,在REP TIL扩增期间和/或在第二次扩增期间,本文所述的第二次扩增步骤(例如,包括例如图9的步骤D中所述的那些以及称为REP的那些扩增)需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是从健康献血者的标准全血单位获得的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法(如Ficoll-Paque梯度分离)获得PBMC。

[0432] 通常,同种异体PBMC通过辐照或热处理被灭活并用于REP步骤,如实施例(特别是实施例14)所述,它提供了评估经辐照的同种异体PBMC的复制机能不全(replication incompetence)的示例性方案。

[0433] 在一些实施方式中,如果第14天的活细胞总数小于在REP的第0天和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增步骤。例如参见实施例14。

[0434] 在一些实施方式中,如果在OKT3和IL-2存在下,与REP的第0天和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数相比,第7天和第14天培养的活细胞的总数没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增步骤。在一些实施方式中,PBMC在30ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的存在下培养。例如参见实施例13。

[0435] 在一些实施方式中,如果在OKT3和IL-2存在下,与REP的第0天和/或第二次扩增的第0天(即第二次扩增的开始日)投入培养的初始活细胞数相比,第7天和第14天培养的活细胞的总数没有增加,则认为PBMC复制机能不全并接受PBMC用于本文所述的TIL扩增步骤。在一些实施方式中,PBMC在5-60ng/mL OKT3抗体和1000-6000IU/mL IL-2的存在下培养。在一些实施方式中,PBMC在10-50ng/mL的OKT3抗体和2000-5000IU/mL的IL-2的存在下培养。在一些实施方式中,PBMC在20-40ng/mL OKT3抗体和2000-4000IU/mL IL-2的存在下培养。在一些实施方式中,PBMC在25-35ng/mL OKT3抗体和2500-3500IU/mL IL-2的存在下培养。

[0436] 在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1:25、约1:50、约1:100、约1:125、约1:150、约1:175、约1:200、约1:225、约1:250、约1:275、约1:300、约1:325、约1:350、约1:375、约1:400,或者约1:500。在一个实施方

式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为1:50至1:300。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为1:100至1:200。

[0437] 在一个实施方式中,本文所述的第二次扩增步骤需要约 2.5×10^9 个饲养细胞比约 100×10^6 个TIL的比率。在另一个实施方式中,本文所述的第二次扩增步骤需要约 2.5×10^9 个饲养细胞比约 50×10^6 个TIL的比率。在又一个实施方式中,本文所述的第二次扩增步骤需要约 2.5×10^9 个饲养细胞比约 25×10^6 个TIL。

[0438] 在一个实施方式中,本文所述的第二次扩增步骤在第二次扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是从健康献血者的标准全血单位获得的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。在一个实施方式中,使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

[0439] 通常,同种异体PBMC通过辐照或者热处理被灭活,并用于本文所述的TIL扩增步骤,包括图4、图5和图9中所述的示例性步骤。

[0440] 在一个实施方式中,在第二次扩增中使用人工抗原呈递细胞替代PBMC或者与PBMC组合。

2、细胞因子

[0441] 如本领域已知,本文所述的扩增方法通常使用含有高剂量细胞因子(特别是IL-2)的培养基。

[0442] 或者,另外可使用细胞因子的组合进行TIL的快速扩增和/或第二次扩增;其中,IL-2、IL-15和IL-21中的两种以上的组合如国际公开号W02015/189356和国际公开号W02015/189357中概述的那样,其全部内容通过引用明确并入本文。因此,可能的组合包括IL-2和IL-15;IL-2和IL-21;IL-15和IL-21;以及IL-2、IL-15和IL-21,发现后者在许多实施方式中特别有用。使用细胞因子的组合特别有利于淋巴细胞(特别是其中所述的T细胞)的产生。

3、抗CD3抗体

[0443] 在一些实施方式中,本文所述的扩增方法(包括称为REP的那些,参见例如图9)中使用的培养基还包含抗CD3抗体。与IL-2组合的抗CD3抗体诱导TIL群的T细胞活化和细胞分裂。用全长抗体以及Fab和F(ab')₂片段可以看到此种效果,前者通常是优选的;例如参见Tsoukas等,J. Immunol., 1985, 135, 1719,其全部内容通过引用并入本文。

[0444] 如本领域技术人员将理解的,有许多可用于本发明的合适的抗人CD3抗体,包括来自各种哺乳动物的抗人CD3多克隆和单克隆抗体,包括但不限于鼠、人类、灵长类动物、大鼠和犬抗体。在具体实施方式中,使用OKT3抗CD3抗体(可购自新泽西州拉里坦的Ortho-McNeil或加利福尼亚州奥本的Miltenyi Biotech)。

[0445] 在一些实施方式中,可以在电穿孔步骤之前2天、3天、4天或5天将抗CD3抗体(例如OKT3)添加到TIL培养物中。在一些实施方式中,可以在电穿孔步骤之前立即添加抗CD3抗体(例如OKT3)。在一些实施方式中,可以在电穿孔步骤之后立即添加抗CD3抗体(例如OKT3)。在一些实施方式中,可以在电穿孔步骤之后2天、3天、4天或5天添加抗CD3抗体(例如OKT3)。

4. 4-1BB和OX40激动剂

[0446] 根据一个实施方式,在第一次扩增、第二次扩增或两者期间,细胞培养基还包含4-1BB(CD137)激动剂和/或OX40激动剂。可以在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培

培养基之后进行基因编辑。或者,可以在将4-1BB激动剂和/或OX40激动剂引入细胞培养基之前进行基因编辑。

[0447] 4-1BB激动剂可以是本领域已知的任何4-1BB结合分子。4-1BB结合分子可以是能够结合人或哺乳动物4-1BB的单克隆抗体或融合蛋白。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可能同时具有重链和轻链。如本文所用,术语“结合分子”还包括抗体(包括全长抗体)、单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体以及抗体片段(例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达文库产生的片段、上述任一项的表位结合片段以及工程化形式的与4-1BB结合的抗体(例如scFv分子))。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是抗原结合蛋白,其是完全人抗体。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是抗原结合蛋白,其是人源化抗体。在一些实施方式中,用于本文公开方法和组合物的4-1BB激动剂包括:抗4-1BB抗体、人抗4-1BB抗体、小鼠抗4-1BB抗体、哺乳动物抗4-1BB抗体、单克隆抗4-1BB抗体、多克隆抗4-1BB抗体、嵌合抗4-1BB抗体、抗4-1BB Adnectin、抗4-1BB结构域抗体、单链抗4-1BB片段、重链抗4-1BB片段、轻链抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白以及它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。已知激动性抗4-1BB抗体诱导强烈的免疫应答。Lee等,PLoS One 2013,8,e69677。在一个优选实施方式中,4-1BB激动剂是激动性抗4-1BB人源化单克隆抗体或激动性抗4-1BB完全人单克隆抗体(即源自单个细胞系的抗体)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是EU-101(Eutilex Co.Ltd.)、乌托鲁单抗(utomilumab)或乌瑞鲁单抗(urelumab)或它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。在一个优选实施方式中,4-1BB激动剂是乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗或它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。

[0448] 在一个优选实施方式中,4-1BB激动剂或4-1BB结合分子也可以是融合蛋白。在一个优选实施方式中,与激动性单克隆抗体(通常具有两个配体结合域)相比,多聚体4-1BB激动剂,例如三聚体或六聚体4-1BB激动剂(具有三个或六个配体结合结构域),可以诱导更好的受体(4-1BBL)聚集和内部细胞信号复合物的形成。例如,Gieffers等,Mol.Cancer Therapeutics 2013,12,2735-47描述了三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更高聚体融合蛋白,其包含三个TNFRSF结合结构域和IgG1-Fc并可选地进一步连接两个以上这些融合蛋白。

[0449] 已知激动性4-1BB抗体和融合蛋白诱导强烈的免疫应答。在一个优选实施方式中,4-1BB激动剂是以足以减少毒性的方式特异性结合4-1BB抗原的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方式中,4-1BB激动剂是消除Fc区功能性的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。

[0450] 在一些实施方式中,4-1BB激动剂的特征在于以高亲和力和激动剂活性结合人4-1BB(SEQ ID NO:9)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是与人4-1BB(SEQ ID NO:9)结合的结合分子。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是与鼠4-1BB(SEQ ID NO:10)结合的结合分子。表

3-1总结了与4-1BB激动剂或结合分子结合的4-1BB抗原的氨基酸序列。

表3:4-1BB抗原的氨基酸序列

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO:9 人 4-1BB, 肿瘤坏死 因子受体超家族, 成员 9 (智人)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFLLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRPEEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:10 鼠 4-1BB, 肿瘤坏死因子受体超家 族, 成员 9 (小鼠)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKTTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGYEL 256

[0451] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括4-1BB激动剂,所述4-1BB激动剂以约100pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约90pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约80pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约70pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约60pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约50pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约40pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB或以约30pM以下的 K_D 结合人4-1BB或鼠4-1BB。

[0452] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括4-1BB激动剂,所述4-1BB激动剂以约 7.5×10^5 1/M · s以上的 k_{assoc} 结合人或鼠类4-1BB、 8×10^5 1/M · s以上的 k_{assoc} 结合人或鼠类4-1BB、 8.5×10^5 1/M · s以上的 k_{assoc} 结合人或鼠类4-1BB、 9×10^5 1/M · s以上的 k_{assoc} 结合人或鼠类4-1BB、 9.5×10^5 1/M · s以上的 k_{assoc} 结合人或鼠类4-1BB、或 1×10^6 1/M · s以上的 k_{assoc} 结合人或鼠类4-1BB、。

[0453] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括4-1BB激动剂,所述4-1BB激动剂以约 2×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.1×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.2×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.3×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.4×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.5×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.6×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.7×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.8×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB、以约 2.9×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB或以约 3×10^{-5} 1/s以下的 k_{dissoc} 结合人或鼠类4-1BB。

[0454] 在一些实施方式中,所述的组合物、过程和方法包括4-1BB激动剂,所述4-1BB激动剂以约10nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约9nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约8nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约7nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约6nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约5nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约4nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约3nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB、以约2nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB或以约1nM以下的 IC_{50} 结合人4-1BB或鼠4-1BB。

[0455] 在一个优选实施方式中,4-1BB激动剂是乌托鲁单抗(也称为PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌托鲁单抗可购自Pfizer, Inc.。乌托鲁单抗是一种免疫球蛋白G2- λ , 抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员9, 4-1BB, T细胞抗原ILA, CD137)], 智人(完全人)单克隆抗体。乌托鲁单抗的氨基酸序列在表4中列出。乌托鲁单抗在Asn59和Asn292处含糖基化位点; 在第22-96 (V_H - V_L)、143-199 (C_H1 - C_L)、

256-316 (C_{H2}) 和362-420 (C_{H3}) 位包含重链链内二硫键;在第22'-87' (V_H-V_L) 和136'-195' (C_{H1}-C_L) 位包含轻链链内二硫键;在IgG2A/B同工型第218-130、219-219、222-222和225-225位、在IgG2A同工型第218-218、219-219、222-222和225-225位以及在IgG2B同工型第219-130 (2)、222-222和225-225位包含链间重链-重链二硫键;以及在IgG2A同工型第130-213' (2) 位、在IgG2A/B同工型第218-213' 和130-213' 位以及在IgG2B同工型第218-213' (2) 位包含链间重链-轻链二硫键。乌托鲁单抗及其变体和片段的制备和性质描述于美国专利号8,821,867;8,337,850和9,468,678以及国际专利申请公开号W0 2012/032433 A1,其各自公开内容通过引用并入本文。乌托鲁单抗的临床前特征描述于Fisher等,Cancer Immunolog.&Immunother.2012,61,1721-33。目前,乌托鲁单抗在各种血液学和实体瘤适应症中的临床试验包括美国国立卫生研究院 (U.S.National Institutes of Health) clinicaltrials.gov识别号NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066和NCT02554812。

[0456] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含SEQ ID NO:11给出的重链和SEQ ID NO:12给出的轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列的重链和轻链或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段 (scFv)、变体或缀合物。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少99%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少98%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少97%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少96%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示序列具有至少95%同一性的重链和轻链。

[0457] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含乌托鲁单抗的重链和轻链的CDR或可变区 (V_R)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂重链可变区 (V_H) 包含SEQ ID NO:13所示的序列,4-1BB激动剂轻链可变区 (V_L) 包含SEQ ID NO:14所示的序列,及它们的保守氨基酸取代。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少99%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少98%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少97%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少96%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含scFv抗体,该scFv抗体包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少99%同一性的V_H区和V_L区。

[0458] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17所示序列及其保守氨基酸取代的重链CDR1结构域、重链CDR2结构域和重链CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示序列及其保守氨基酸取代的轻链CDR1结构域、轻链CDR2结构域和轻链CDR3结构域。

[0459] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是药品监管机构参考乌托鲁单抗批准的4-1BB激动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,生物类似物单克隆抗体包含4-1BB抗体,

该抗体4-1BB抗体包含与参考药物产品或参考生物制品的氨基酸序列具有至少97% (例如97%、98%、99%或100%) 序列同一性并且与参考药物产品或参考生物制品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌托鲁单抗。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是已授权或已提交授权的4-1BB激动剂抗体,其中,4-1BB激动剂抗体以不同于参考药物产品或参考生物制品制剂的制剂形式提供,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌托鲁单抗。4-1BB激动剂抗体可能会被药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施方式中,生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物制品中所包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌托鲁单抗。在一些实施方式中,生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物制品中所包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌托鲁单抗。

表4:与乌托鲁单抗有关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:11 乌托鲁单抗的重链	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN	60
	SPSFQGGVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK	120
	GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS	180
	LSSVTVTPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP	240
	KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS	300
	LTQVHQQDNLN GKEYCKKVS NGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL	360
	TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PMLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC	420
	SVMHEALHNN YTKSLSLSP G	441
SEQ ID NO:12 乌托鲁单抗的轻链	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER	60
	FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLQ PKAAPSVTLF	120
	PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAV KADSSPVKAG VETTPPSKQS NNKYAASSYL	180
	SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	214
SEQ ID NO:13 乌托鲁单抗的重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN	60
	YSPSFQGGVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLTVTVSS	118
SEQ ID NO:14 乌托鲁单抗的轻链可变区	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER	60
	FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	108
SEQ ID NO:15 乌托鲁单抗的重链 CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:16 乌托鲁单抗的重链 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:17 乌托鲁单抗的重链 CDR3	RGYGIFY	8
SEQ ID NO:18 乌托鲁单抗的轻链 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:19 乌托鲁单抗的轻链 CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:20 乌托鲁单抗的轻链 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

[0460] 在一个优选实施方式中,4-1BB激动剂是单克隆抗体乌瑞鲁单抗(也称为BMS-663513和20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌瑞鲁单抗可购自Bristol-Myers Squibb, Inc.和Creative Biolabs, Inc.。乌瑞鲁单抗是一种免疫球蛋白G4-κ,抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)],智人(全人)单克隆抗体。表5列出了乌瑞鲁单抗的氨基酸序列。乌瑞鲁单抗在第298位(和第298'位)包含N-糖基化位点;在第22-95(V_H-V_L)、148-204(C_{H1}-C_L)、262-322(C_{H2})和368-426(C_{H3})位(以及在第22"-95"、148"-204"、262"-322"和368"-426"位)包含重链链内二硫键;在第23'-88'

(V_H-V_L)和136'-196'(C_H1-C_L)位(以及在第23''-88''和136''-196''位)包含轻链链内二硫桥;在第227-227'和230-230''位包含链间重链-重链二硫键;以及在第135-216'和135'-216''位包含链间重链-轻链二硫键。乌瑞鲁单抗及其变体和片段的制备和性质描述于美国专利号7,288,638和8,962,804,其公开内容通过引用并入本文。Segal等,Clin.Cancer Res.2016(可访问<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>)描述了乌瑞鲁单抗的临床前和临床特征。乌瑞鲁单抗在各种血液学和实体瘤适应症中的当前临床试验包括美国国立卫生研究院clinicaltrials.gov识别号NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992和NCT01471210。

[0461] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含由SEQ ID NO:21给出的重链和由SEQ ID NO:22给出的轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包括重链和轻链,所述重链和轻链分别具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少99%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少98%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少97%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少96%同一性的重链和轻链。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示序列具有至少95%同一性的重链和轻链。

[0462] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含乌瑞鲁单抗的重链和轻链的CDR或可变区(V_R)。在一个实施方式中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:23所示的序列,4-1BB激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:24所示的序列,及它们的保守氨基酸取代。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少98%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少97%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少96%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少95%同一性的V_H区和V_L区。在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含scFv抗体,该scFv抗体包含分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%同一性的V_H区和V_L区。

[0463] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂包含分别具有SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27所示序列及其保守氨基酸取代的重链CDR1结构域、重链CDR2结构域和重链CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示序列及其保守氨基酸取代的轻链CDR1结构域、轻链CDR2结构域和轻链CDR3结构域。

[0464] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是由药品监管机构参考乌瑞鲁单抗批准的4-1BB激动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,生物类似物单克隆抗体包含4-1BB抗体,该抗体4-1BB抗体包含与参考药物产品或参考生物制品的氨基酸序列具有至少97%(例如97%、98%、99%或100%)序列同一性并且与参考药物产品或参考生物制品相比包含一种以上翻译后修饰的氨基酸序列,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌瑞鲁单抗。在一

些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是已授权或已提交授权的4-1BB激动剂抗体,其中,4-1BB激动剂抗体以不同于参考药物产品或参考生物制品制剂的制剂形式提供,其中,参考药物产品或参考生物制品为乌瑞鲁单抗。4-1BB激动剂抗体可能会被药品监管机构(例如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施方式中,生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物制品中所包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌瑞鲁单抗。在一些实施方式中,生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物制品中所包含的赋形剂相同或不同,其中,参考药物产品或参考生物制品是乌瑞鲁单抗。

表5:与乌瑞鲁单抗有关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:21 乌瑞鲁单抗的重链	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSG GYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN	60
	PSLESRVTTIS VDTSKNQFSL KLSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS	120
	SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYPPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS	180
	SGLYSLSSVV TVPSSSLGK TYTCNVDPK SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS	240
	VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQ DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST	300
	YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIETKISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT	360
	KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE	420
	GNVFSCSMH EALHNHYTQK SLSLSLKG	448
SEQ ID NO:22 乌瑞鲁单抗的轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ RSNWPPALTF CGGKVEIKR TVAAPSVEFIF	120
	PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST	180
	LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	216
SEQ ID NO:23 乌瑞鲁单抗的重链可变区	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP	60
	EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	120
SEQ ID NO:24 乌瑞鲁单抗的轻链可变区	MEAPAQLLFL LLLWLPDFTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP	60
	GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ	110
SEQ ID NO:25 乌瑞鲁单抗的重链 CDR1	GYWS	5
SEQ ID NO:26 乌瑞鲁单抗的重链 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:27 乌瑞鲁单抗的重链 CDR3	DYGPNGYDWY FDL	13
SEQ ID NO:28 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:29 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:30 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

[0465] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂选自:1D8、3E1or、4B4 (BioLegend 309809)、H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532)、BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX)、145501 (Leinco Technologies B591)、由保藏于ATCC号HB-11248和公开于美国专利号6,974,863的细胞系产生的抗体、5F4 (BioLegend 31 1503)、C65-485 (BD Pharmingen 559446)、公开于美国专利申请公开号US2005/0095244的抗体、美国专利号7,288,638 (例如20H4.9-IgG1 (BMS-663031)) 中公开的抗体、美国专利6,887,673 (例如4E9或BMS-554271) 中公开的抗体、美国专利号7,214,493中公开的抗体、美国专利号6,303,121中公开的抗体、美国专利号6,569,997中公开的抗体、美国专利号6,905,685中公开的抗体 (例如4E9或BMS-554271)、美国专利号6,362,325 (例如1D8或BMS-469492;3H3或BMS-469497;或3E1) 中公开的抗体、美国专利号

6,974,863中公开的抗体(例如53A2)、美国专利号6,210,669中公开的抗体(例如1D8、3B8或3E1)、美国专利号5,928,893中描述的抗体、美国专利号6,303,121中公开的抗体、美国专利号6,569,997中公开的抗体、国际专利中公开的抗体专利申请公开号W0 2012/177788、W0 2015/119923和W0 2010/042433中公开的抗体,及它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物,其中,每个前述专利或专利申请出版物的公开内容均通过引用并入本文。

[0466] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是国际专利申请公开号W0 2008/025516 A1,W0 2009/007120 A1,W0 2010/003766 A1,W0 2010/010051 A1和W0 2010/078966 A1;美国专利申请公开号US 2011/0027218 A1、US 2015/0126709 A1、US 2011/0111494 A1、US 2015/0110734 A1和US 2015/0126710 A1;以及美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460中描述的4-1BB激动融合蛋白,其公开内容通过引用并入本文。

[0467] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是如图22的结构I-A(C端Fc抗体片段融合蛋白)或结构I-B(N端Fc抗体片段融合蛋白)中所述的4-1BB激动融合蛋白或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。

[0468] 在图22的结构I-A和I-B中,圆柱指单个多肽结合结构域(参见图140)。例如,结构I-A和结构I-B包含三个线性连接的TNFRSF结合结构域,该结合结构域源自4-1BBL或与4-1BB结合的抗体,它们折叠形成三价蛋白,然后通过IgG1-Fc(包括C_H3和C_H2结构域)与第二个三价蛋白连接,然后通过二硫键(小的细长椭圆)将两个三价蛋白连接在一起,从而稳定结构,提供能够六个受体的细胞内信号传导结构域和信号传导蛋白结合在一起形成信号传导复合体的激动剂。例如,表示为圆柱的TNFRSF结合结构域可以是scFv结构域,scFv结构域包含例如通过接头连接的V_H链和V_L链,该接头可包含亲水性残基和Gly和Ser序列以具有柔韧性,以及包含Glu和Lys序列以具有溶解性。可使用任何scFv结构域设计,例如描述于de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44; Ahmad等, Clin. & Dev. Immunol. 2012, 980250; Monnier等, Antibodies, 2013, 2, 193-208; 或并入本文其他地方的参考文献中的那些。此种形式的融合蛋白结构描述于美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460,其公开内容通过引用并入本文。

[0469] 结构I-A的其他多肽结构域的氨基酸序列在表6中给出。Fc结构域优选包含完整的恒定结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)和完整的铰链结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链结构域的一部分(例如SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。连接C端Fc抗体的优选的接头可选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41给出的实施方式,包括适用于融合其他多肽的接头。

表6:具有C端Fc-抗体片段融合蛋白设计(结构I-A)的TNFRSF融合蛋白(包括4-1BB融合蛋白)的氨基酸序列

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:31 Fc domain	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 180 LDSGDGSFFLY SKLTVDKSRW QGQNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 接头	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 接头	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22

SEQ ID NO:34 接头	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCAPE	27
SEQ ID NO:35 接头	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCAPE	27
SEQ ID NO:36 接头	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCAPE	29
SEQ ID NO:37 接头	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCAPE	29
SEQ ID NO:38 接头	GGPGSSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO:39 接头	GGPGSSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO:40 接头	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO:41 接头	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

[0470] 结构I-B的其他多肽结构域的氨基酸序列在表7中给出。如果Fc抗体片段融合至TNFRSF融合蛋白的N-末端(如结构I-B),则Fc模块的序列优选为SEQ ID NO:42所示的序列,接头序列优选选自SEQ ID NO:43至SEQ ID NO:45所示的那些实施方式。

表7:具有N末端Fc-抗体片段融合蛋白设计(结构I-B)的TNFRSF融合蛋白(包括4-1BB融合蛋白)的氨基酸序列

识别号	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:42 Fc 结构域	METDTLLLV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQFENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID NO:43 接头	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID NO:44 接头	SSSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID NO:45 接头	SSSSSSSGSGS GSGSGS	16

[0471] 在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域选自:乌托鲁单抗的可变重链和可变轻链、乌瑞鲁单抗的可变重链和可变轻链、乌托鲁单抗的可变重链和可变轻链、选自表8中所述可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链,前述可变重链和可变轻链的任意组合,及它们的片段、衍生物、缀合物、变体和生物类似物。

[0472] 在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上包含4-1BBL序列的4-1BB结合结构域。在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域包含SEQ ID NO:46的序列。在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域包含可溶性4-1BBL序列。在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域包含SEQ ID NO:47的序列。

[0473] 在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域是scFv结构域,该scFv结构域包含分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%同一性的V_H区和V_L区,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域是scFv结构域,该scFv结构域包含分别与ID NO:23和SEQ ID NO:24所示序列具有至少95%同一性的V_H区和V_L区,其中,V_H结构域和

V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或结构I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包含一种以上4-1BB结合结构域,该4-1BB结合结构域是scFv结构域,该scFv结构域包含分别与表8所示序列具有至少95%同一性的V_H区和V_L区,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。

表8:用作融合蛋白中4-1BB结合结构域或用作scFv 4-1BB激动剂抗体的其他多肽结构域

识别号	序列 (单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO:47 4-1BBL 可溶性结构域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168
SEQ ID NO:48 4B4-1-1 版本 1 的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 4B4-1-1 版本 1 的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQKKS HESPRLLIKY ASQSIGSIPS 60 RFGSGSGSD FTLINSNSVEP EDVGYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 4B4-1-1 版本 2 的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 4B4-1-1 版本 2 的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQKKS HESPRLLIKY ASQSIGSIPS 60 RFGSGSGSD FTLINSNSVEP EDVGYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 H39E3-2 的可变重链	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNIA PSLTNRTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 H39E3-2 的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLI SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[0474] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽,其包含:(i) 第一可溶性4-1BB结合域、(ii) 第一肽接头、(iii) 第二可溶性4-1BB结合结构域、(iv) 第二肽接头和(v) 第三可溶性4-1BB结合结构域,还包含位于N端和/或C端的其他结构域,其中,该其他结构域是Fab或Fc片段结构域。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽,其包含:(i) 第一可溶性4-1BB结合域、(ii) 第一肽接头、(iii) 第二可溶性4-1BB结合结构域、(iv) 第二肽接头和(v) 第三可溶性4-1BB结合结构域,还包含位于N端和/或C端的其他结构域,其中,该其他结构域是Fab或Fc片段结构域,其中,每个可溶性4-1BB结构域均缺少茎(stalk)区(有助于三聚化并提供与细胞膜的一定距离,但不是4-1BB结合结构域的一部分),第一肽接头和第二肽接头独立地具有3至8个氨基酸的长度。

[0475] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽,其包含:(i) 第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子结构域、(ii) 第一肽接头、(iii) 第二可溶性TNF超家族细胞因子结构域、(iv) 第二肽接头和(v) 第三可溶性TNF超家族细胞因子结构域,其中,每个可溶性TNF超家族细胞因子结构域都缺乏茎区,第一肽接头和第二肽接头独立地具有3至8个氨基酸的长度,其中每个TNF超家族细胞因子结构域均是4-1BB结合结构域。

[0476] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是4-1BB激动性scFv抗体,其包含与任何前述V_L结构域连接的任何前述V_H结构域。

[0477] 在一个实施方式中,4-1BB激动剂是BPS Bioscience 4-1BB激动剂抗体(目录号79097-2),可购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BPS Bioscience。在一个实施方式中,4-1BB激动剂是Creative Biolabs 4-1BB激动剂抗体(目录号MOM-18179),可购自美国纽约州

Shirley的Creative Biolabs。

[0478] OX40激动剂可以是本领域已知的任何OX40结合分子。OX40结合分子可以是能够结合人或哺乳动物OX40的单克隆抗体或融合蛋白。OX40激动剂或OX40结合分子可包含免疫球蛋白分子的任何同种型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。OX40激动剂或OX40结合分子可能同时具有重链和轻链。如本文所用,术语“结合分子”还包括抗体(包括全长抗体)、单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体以及抗体片段(例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达文库产生的片段、上述任一项的表位结合片段以及工程化形式的与OX40结合的抗体(例如scFv分子))。在一个实施方式中,OX40激动剂是抗原结合蛋白,其是完全人抗体。在一个实施方式中,OX40激动剂是抗原结合蛋白,其是人源化抗体。在一些实施方式中,用于本文公开方法和组合物的OX40激动剂包括:抗OX40抗体、人抗OX40抗体、小鼠抗OX40抗体、哺乳动物抗OX40抗体、单克隆抗OX40抗体、多克隆抗OX40抗体、嵌合抗OX40抗体、抗OX40 Adnectin、抗OX40结构域抗体、单链抗OX40片段、重链抗OX40片段、轻链抗OX40片段、抗OX40融合蛋白以及它们的片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。在一个优选实施方式中,OX40激动剂是激动性抗OX40人源化单克隆抗体或激动性抗OX40完全人单克隆抗体(即源自单个细胞系的抗体)。

[0479] 在一个优选实施方式中,OX40激动剂或OX40结合分子也可以是融合蛋白。例如,Sadun等,J.Immunother.,2009,182,1481-89中描述了包含与OX40L融合的Fc结构域的OX40融合蛋白。在一个优选实施方式中,与激动性单克隆抗体(通常具有两个配体结合结构域)相比,多聚体4-1BB激动剂(例如,三聚体或六聚体4-1BB激动剂(具有三个或六个配体结合结构域))可以更好地诱导受体(4-1BBL)聚集和细胞内信号传导复合物形成。例如,如Gieffers等,Mol.Cancer Therapeutics,2013,12,2735-47所述,三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更高聚体的融合蛋白包含三个TNFRSF结合结构域和IgG1-Fc并且可选地还连接两个以上的这些融合蛋白。

[0480] 已知,激动性OX40抗体和融合蛋白诱导强烈的免疫应答。Curti等,Cancer Res.,2013,73,7189-98。在一个优选实施方式中,OX40激动剂是单克隆抗体或融合蛋白,它以足以降低毒性的方式与OX40抗原特异性结合。在一些实施方式中,OX40激动剂是激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白,它消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞细胞毒性)。在一些实施方式中,OX40激动剂是激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白,它消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方式中,OX40激动剂是激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白,它消除补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些实施方式中,OX40激动剂是激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白,它消除Fc区功能性。

[0481] 在一些实施方式中,OX40激动剂的特征在于以高亲和力和高激动活性与人OX40(SEQ ID NO:54)结合。在一个实施方式中,OX40激动剂是与人OX40(SEQ ID NO:54)结合的结合分子。在一个实施方式中,OX40激动剂是与鼠OX40(SEQ ID NO:55)结合的结合分子。表9总结了与OX40激动剂或结合分子结合的OX40抗原的氨基酸序列。

表9:OX40抗原的氨基酸序列

识别号	序列 (单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:54 人 OX40 (智人)	MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSEKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPEVEP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55 鼠 OX40 (小鼠)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPGSHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

[0482] 在一些实施方式中,该组合物、过程和方法包括OX40激动剂,该OX40激动剂:与人或鼠OX40结合的 K_D 为约100pM以下;与人或鼠OX40结合的 K_D 为约90pM以下;与人或鼠OX40结合的 K_D 为约80pM以下;与人或鼠OX40结合的 K_D 为约70pM以下;与人或鼠OX40结合的 K_D 为约60pM以下;与人或鼠OX40结合的 K_D 为约50pM以下;与人或鼠OX40结合的 K_D 为约40pM以下;或与人或鼠OX40结合的 K_D 为约30pM以下。

[0483] 在一些实施方式中,该组合物、过程和方法包括OX40激动剂,该OX40激动剂:与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 7.5×10^5 1/M·s以上;与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 7.5×10^5 1/M·s以上;与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 8×10^5 1/M·s以上;与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 8.5×10^5 1/M·s以上;与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 9×10^5 1/M·s以上;与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 9.5×10^5 1/M·s以上;或与人或鼠OX40结合的 k_{assoc} 为约 1×10^6 1/M·s以上。

[0484] 在一些实施方式中,该组合物、过程和方法包括OX40激动剂,该OX40激动剂:与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.1×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.2×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.3×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.4×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.5×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.6×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.7×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.8×10^{-5} 1/s以下;与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 2.9×10^{-5} 1/s以下;或与人或鼠OX40结合的 k_{dissoc} 为约 3×10^{-5} 1/s以下。

[0485] 在一些实施方式中,该组合物、过程和方法包括OX40激动剂,该OX40激动剂:与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约10nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约9nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约8nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约7nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约6nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约5nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约4nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约3nM以下;与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约2nM以下;或与人或鼠OX40结合的 IC_{50} 为约1nM以下。

[0486] 在一些实施方式中,OX40激动剂是他利昔珠单抗(tavolixizumab),也称为MEDI0562或MEDI-0562。他利昔珠单抗可从AstraZeneca, Inc.的MedImmune子公司商购。他利昔珠单抗是免疫球蛋白G1- κ 、抗[智人TNFRSF4(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员4、OX40、CD134)]、人源化和嵌合单克隆抗体。他利昔珠单抗的氨基酸序列列于表10中。他利昔珠单抗包含:在第301位和第301”位处的N-糖基化位点,具有岩藻糖基化的复杂型双触角CHO聚糖(fucosylated complex bi-antennary CHO-type glycan);在第22位至第95位

(V_H-V_L)、第148位至第204位 (C_{H1}-C_L)、第265位至第325位 (C_{H2}) 和第371位至第429位 (C_{H3}) (和第22”位至第95”位、第148”位至第204”位、第265”位至第325”位和第371”位至第429”位) 处的重链链内二硫键;在第23’位至第88’位 (V_H-V_L) 和第134’位至第194’位 (C_{H1}-C_L) (和第23”’位至第88”’位和第134”’位至第194”’位) 处的轻链链内二硫键;在第230位至第230”位和第233位至第233”位处的重链-重链链间二硫键;在第224位至第214’位和第224”位至第214”’位的重链-轻链链间二硫键。目前,他利昔珠单抗的各种血液学和实体瘤指征的临床试验包括:美国国立卫生研究院临床试验管理识别号NCT02318394和NCT02705482。

[0487] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含SEQ ID NO:56给出的重链和SEQ ID NO:57给出的轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列的重链和轻链,或它们的抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列至少99%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列至少98%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列至少97%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列至少96%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57所示序列至少95%相同的重链和轻链。

[0488] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含他利昔珠单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:58所示序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:59所示序列,及它们的保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少99%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少98%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少97%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少96%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少95%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含scFv抗体,该scFv抗体包含V_H和V_L区,该V_H和V_L区分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少99%相同。

[0489] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含:重链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述重链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62所示的序列;和轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65所示的序列。

[0490] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构批准的参考他利昔珠单抗的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,该生物类似物单克隆抗体包含OX40抗体,与参考药物产品或参考生物产品相比,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如,97%、98%、99%或100%序列同一性)的氨基酸序列,并且该氨基酸序列包含一种以上翻译后修饰,其中参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺

和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是已授权或提交待授权的OX40激动剂抗体,其中,OX40激动剂抗体以不同于参考药物产品或参考生物产品制剂的制剂提供,其中参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。OX40激动剂抗体可以由药物管理机构(例如,美国FDA和/或欧盟的EMA)授权。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。在一些实施方式中,生物仿制剂作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是他利昔珠单抗。

表10:他利昔珠单抗相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列 (单字母氨基酸符号)		
SEQ ID NO: 56 他利昔珠单抗的重链	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN		60
	PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WQGGLVTVS		120
	SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS		180
	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHPK SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG		240
	GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY		300
	NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE		360
SEQ ID NO: 57 他利昔珠单抗的轻链	EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR		420
	WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K		451
	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS		60
	RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP		120
	SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT		180
	LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK		214
SEQ ID NO: 58 他利昔珠单抗的重链可变区	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN		60
	PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WQGGLVTV		118
SEQ ID NO: 59 他利昔珠单抗的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS		60
	RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR		108
SEQ ID NO: 60 他利昔珠单抗的重链 CDR1	GSFSSGYWN		9
SEQ ID NO: 61 他利昔珠单抗的重链 CDR2	YIGYISYNGI TYH		13
SEQ ID NO: 62 他利昔珠单抗的重链 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY		14
SEQ ID NO: 63 他利昔珠单抗的轻链 CDR1	QDISNYLN		8
SEQ ID NO: 64 他利昔珠单抗的轻链 CDR2	LLIYYTSKLH S		11
SEQ ID NO: 65 他利昔珠单抗的轻链 CDR3	QQGSALPW		8

[0491] 在一些实施方式中,OX40激动剂是11D4,它是可从Pfizer, Inc. 商购的全人抗体。11D4的制备和性质描述于美国专利号7,960,515、8,236,930以及9,028,824,其公开内容通过引用并入本文。11D4的氨基酸序列列于表11中。

[0492] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含SEQ ID NO:66给出的重链和SEQ ID NO:67给出的轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所

示序列的重链和轻链,或它们的抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示序列至少99%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示序列至少98%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示序列至少97%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示序列至少96%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,OX40激动剂包含分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67所示序列至少95%相同的重链和轻链。

[0493] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含11D4的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:68所示序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:69所示序列,及它们的保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列至少99%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列至少98%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列至少97%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列至少96%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列至少95%相同。

[0494] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含:重链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述重链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72所示的序列;和轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75所示的序列。

[0495] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构批准的参考11D4的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,该生物类似物单克隆抗体包含OX40抗体,与参考药物产品或参考生物产品相比,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如,97%、98%、99%或100%序列同一性)的氨基酸序列,并且该氨基酸序列包含一种以上翻译后修饰,其中参考药物产品或参考生物产品是11D4。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是经授权或提交待授权的OX40激动剂抗体,其中,OX40激动剂抗体以与参考药物产品或参考生物产品的制剂不同的制剂提供,其中参考药物产品或参考生物产品是11D4。OX40激动剂抗体可以由药物管理机构(例如,美国FDA和/或欧盟的EMA)授权。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是11D4。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是11D4。

表11:11D4相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO: 66 11D4 的重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFQYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPCAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNATKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
SEQ ID NO: 67 11D4 的轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
SEQ ID NO: 68 11D4 的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFQYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 69 11D4 的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO: 70 11D4 的重链 CDR1	SYSMN 5
SEQ ID NO: 71 11D4 的重链 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO: 72 11D4 的重链 CDR3	ESGWYLFQY 9
SEQ ID NO: 73 11D4 的轻链 CDR1	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO: 74 11D4 的轻链 CDR2	AASSLQS 7
SEQ ID NO: 75 11D4 的轻链 CDR3	QQYNSYPPT 9

[0496] 在一些实施方式中,0X40激动剂是18D8,它是可从Pfizer,Inc.商购的全人抗体。18D8的制备和性质描述于美国专利号7,960,515、8,236,930以及9,028,824,其公开内容通过引用并入本文。18D8的氨基酸序列列于表12中。

[0497] 在一个实施方式中,0X40激动剂包含SEQ ID NO:76给出的重链和SEQ ID NO:77给出的轻链。在一个实施方式中,0X40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示序列的重链和轻链,或它们的抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在一个实施方式中,0X40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示序列至少99%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,0X40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示序列至少98%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,0X40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示序列至少97%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,0X40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示序列至少96%相同的重链和轻链。在一个实施方式中,0X40激动剂包含分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77所示序列至少95%相同的重链和轻链。

[0498] 在一个实施方式中,0X40激动剂包含18D8的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,0X40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:78所示序列,并且0X40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:79所示序列,及它们的保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,0X40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列至少99%相同。在一个实施方式中,0X40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列至少98%相同。在一个实施方式中,0X40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列至少97%相同。在一个实施方式中,0X40激动剂包

含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列至少96%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列至少95%相同。

[0499] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含:重链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述重链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82所示的序列;和轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85所示的序列。

[0500] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构批准的参考18D8的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,该生物类似物单克隆抗体包含OX40抗体,与参考药物产品或参考生物产品相比,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如,97%、98%、99%或100%序列同一性)的氨基酸序列,并且该氨基酸序列包含一种以上翻译后修饰,其中参考药物产品或参考生物产品是18D8。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是经授权或提交待授权的OX40激动剂抗体,其中,OX40激动剂抗体以与参考药物产品或参考生物产品的制剂不同的制剂提供,其中参考药物产品或参考生物产品是18D8。OX40激动剂抗体可以由药物管理机构(例如,美国FDA和/或欧盟的EMA)授权。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是18D8。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是18D8。

表12:18D8相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO: 76 18D8 的重链	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFFYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSIVLT VVHQDWLNGK EYCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSRREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 77 18D8 的轻链	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRTATGIPA 60 RFGSGSGSTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNFFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO: 78 18D8 的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFFYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO: 79 18D8 的轻链可变区	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRTATGIPA 60 RFGSGSGSTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO: 80 18D8 的重链 CDR1	DYAMH 5
SEQ ID NO: 81 18D8 的重链 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO: 82 18D8 的重链 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO: 83 18D8 的轻链 CDR1	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO: 84 18D8 的轻链 CDR2	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 85 18D8 的轻链 CDR3	QQRSNWPT 8

[0501] 在一些实施方式中,OX40激动剂是Hu119-122,其是从GlaxoSmithKline plc获得的人源化抗体。Hu119-122的制备和性质描述于美国专利号9,006,399和9,163,085以及国际专利公开号W02012/027328中,其公开内容通过引用并入本文。Hu119-122的氨基酸序列列于表13中。

[0502] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含Hu119-122的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:86所示序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:87所示序列,及它们的保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列至少99%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列至少98%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列至少97%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列至少96%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列至少95%相同。

[0503] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含:重链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述重链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90所示的序列;和轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93所示的序列。

[0504] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构批准的参考Hu119-122的OX40激

动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,该生物类似物单克隆抗体包含OX40抗体,与参考药物产品或参考生物产品相比,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如,97%、98%、99%或100%序列同一性)的氨基酸序列,并且该氨基酸序列包含一种以上翻译后修饰,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu119-122。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是经授权或提交待授权的OX40激动剂抗体,其中,OX40激动剂抗体以与参考药物产品或参考生物产品的制剂不同的制剂提供,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu119-122。OX40激动剂抗体可以由药物管理机构(例如,美国FDA和/或欧盟的EMA)授权。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu119-122。在一些实施方式中,生物仿制剂作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu119-122。

表13:Hu119-122相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列（单字母氨基酸符号）		
SEQ ID NO: 86 Hu119-122 的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY	60	
	PD TMERRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW QGTMVTVSS	120	
SEQ ID NO: 87	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QKPGQAPRL LIYLASNLES	60	
Hu119-122 的轻链可变区	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	111	
SEQ ID NO: 88 Hu119-122 的重链 CDR1	SHDMS	5	
SEQ ID NO: 89 Hu119-122 的重链 CDR2	AINSDGGSTY YPD TMER	17	
SEQ ID NO: 90 Hu119-122 的重链 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11	
SEQ ID NO: 91 Hu119-122 的轻链 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15	
SEQ ID NO: 92 Hu119-122 的轻链 CDR2	LASNLES	7	
SEQ ID NO: 93 Hu119-122 的轻链 CDR3	QHSRELPLT	9	

[0505] 在一些实施方式中,OX40激动剂是Hu106-222,其是可从GlaxoSmithKline plc获得的人源化抗体。Hu106-222的制备和性质描述于美国专利号9,006,399和9,163,085以及国际专利公开号W02012/027328中,其公开内容通过引用并入本文。Hu106-222的氨基酸序列列于表14中。

[0506] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含Hu106-222的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在一个实施方式中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包含SEQ ID NO:94所示序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包含SEQ ID NO:95所示序列,及它们的保守性氨基酸取代。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列至少99%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:94和SEQ

ID NO:95所示序列至少98%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列至少97%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列至少96%相同。在一个实施方式中,OX40激动剂包含V_H和V_L区,它们分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列至少95%相同。

[0507] 在一个实施方式中,OX40激动剂包含:重链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述重链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98所示的序列;和轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域及它们的保守性氨基酸取代,所述轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域分别具有SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:101所示的序列。

[0508] 在一个实施方式中,OX40激动剂是药物监管机构批准的参考Hu106-222的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在一个实施方式中,该生物类似物单克隆抗体包含OX40抗体,与参考药物产品或参考生物产品相比,该OX40抗体包含与参考药物产品或参考生物产品的氨基酸序列具有至少97%序列同一性(例如,97%、98%、99%或100%序列同一性)的氨基酸序列,并且该氨基酸序列包含一种以上翻译后修饰,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。在一些实施方式中,一种以上翻译后修饰选自糖基化、氧化、脱酰胺和截短中的一种以上。在一些实施方式中,生物类似物是经授权或提交待授权的OX40激动剂抗体,其中,OX40激动剂抗体以与参考药物产品或参考生物产品的制剂不同的制剂提供,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。OX40激动剂抗体可以由药物管理机构(例如,美国FDA和/或欧盟的EMA)授权。在一些实施方式中,该生物类似物作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。在一些实施方式中,生物仿制剂作为组合物提供,该组合物还包含一种以上赋形剂,其中,该一种以上赋形剂与参考药物产品或参考生物产品中包含的赋形剂相同或不同,其中参考药物产品或参考生物产品是Hu106-222。

表14:Hu106-222相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列

识别号	序列（单字母氨基酸符号）
SEQ ID NO: 94 Hu106-222 的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTITVTV SS 60 120 122
SEQ ID NO: 95 Hu106-222 的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASYLYTGVP RFGSGSGSTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 60 107
SEQ ID NO: 96 Hu106-222 的重链 CDR1	DYSMH 5
SEQ ID NO: 97 Hu106-222 的重链 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO: 98 Hu106-222 的重链 CDR3	PYYDYVSYA MDY 13
SEQ ID NO: 99 Hu106-222 的轻链 CDR1	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO: 100 Hu106-222 的轻链 CDR2	SASYLYT 7
SEQ ID NO: 101 Hu106-222 的轻链 CDR3	QQHYSTPRT 9

[0509] 在一些实施方式中,OX40激动剂抗体是MEDI6469(也称为9B12)。MEDI6469是一种鼠单克隆抗体。Weinberg等,J.Immunother.,2006,29,575-585。在一些实施方式中,如Weinberg等,J.Immunother.,2006,29,575-585(其公开内容通过引用整体并入本文)所述,OX40激动剂是由9B12杂交瘤(保藏于美国马萨诸塞州马尔文的Biovest Inc.)产生的抗体。在一些实施方式中,抗体包含MEDI6469的CDR序列。在一些实施方式中,抗体包含MEDI6469的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。

[0510] 在一个实施方式中,OX40激动剂是L106 BD(Pharmlngen产品号340420)。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体L106(BD Pharmlngen产品号340420)的CDR。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体L106(BD Pharmlngen产品号340420)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一个实施方式中,OX40激动剂是ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073)。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073)的CDR。在一些实施方式中,OX40激动剂包含抗体ACT35(Santa Cruz Biotechnology,目录号20073)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在一个实施方式中,OX40激动剂是鼠单克隆抗体抗mCD134/mOX40(克隆OX86),可从InVivoMAb,BioXcell Inc,西黎巴嫩,新罕布什尔州商购。

[0511] 在一个实施方式中,OX40激动剂选自以下专利文献中所述的OX40激动剂:国际专利申请公开号W095/12673、W095/21925、W02006/121810、W02012/027328、W02013/028231、W02013/038191和W02014/148895;欧洲专利申请EP0672141;美国专利申请公开号US2010/136030、US2014/377284、US2015/190506和US2015/132288(包括克隆20E5和12H3);以及美国专利号7,504,101、7,550,140、7,622,444、7,696,175、7,960,515、7,961,515、8,133,983、9,006,399和9,163,085,其各自的公开内容通过引用整体并入本文。

[0512] 在一个实施方式中,OX40激动剂是如结构I-A(C-末端Fc-抗体片段融合蛋白)或结构I-B(N-末端Fc-抗体片段融合蛋白)所示的OX40激动性融合蛋白,或它们的片段、衍生物、

缀合物、变体或生物类似物。结构I-A和I-B的性质如上文和美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460中所述,其公开内容通过引用并入本文。表6中给出了结构I-A的多肽结构域的氨基酸序列。Fc结构域优选包含完整的恒定结构域(SEQ ID NO:31的第17位至第230位氨基酸)、完整的铰链结构域(SEQ ID NO:31的第1位至第16位氨基酸)或部分铰链结构域(例如,SEQ ID NO:31的第4位至第16位氨基酸)。连接C-末端Fc抗体的优选接头可选自SEQ ID NO:32至SEQ ID NO:41给出的实施方式,包括适于融合其他多肽的接头。同样,结构I-B的多肽结构域的氨基酸序列在表7中给出。如果Fc抗体片段融合至TNRFSF融合蛋白的N-末端(如结构I-B所示),则Fc模块的序列优选如SEQ ID NO:42所示,并且接头序列优选选自SEQ ID NO:43至SEQ ID NO:45所示的那些实施方式。

[0513] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域选自:他利昔单抗的可变重链和可变轻链、11D4的可变重链和可变轻链、18D8的可变重链和可变轻链、Hu119-122的可变重链和可变轻链、Hu106-222的可变重链和可变轻链、选自表15中所述可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、上述可变重链和可变轻链的任何组合,及它们的片段、衍生物、缀合物、变体和生物类似物。

[0514] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域包含OX40L序列。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域包含根据SEQ ID NO:102的序列。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含可溶性OX40L序列。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域包含根据SEQ ID NO:103的序列。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域包含根据SEQ ID NO:104的序列。

[0515] 在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H和V_L区的scFv结构域,该V_H区和V_L区各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59所示序列至少95%相同,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H区和V_L区的scFv结构域,V_H区和V_L区各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69所示序列至少95%相同,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H区和V_L区的scFv结构域,V_H区和V_L区各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79所示序列至少95%相同,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H区和V_L区的scFv结构域,V_H区和V_L区各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87所示序列至少95%相同,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H区和V_L区的scFv结构域,V_H区和V_L区各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95所示序列至少95%相同,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。在一个实施方式中,根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包含一个以上OX40结合结构域,该OX40结合结构域是包含V_H区和V_L区的scFv结构域,V_H区和V_L区各自与表15中给出的V_H序列和

V_L序列至少95%相同,其中,V_H结构域和V_L结构域通过接头连接。

表15:用作融合蛋白中的OX40结合结构域(例如结构I-A和I-B)或用作scFv OX40激动剂抗体的其他多肽结构域

识别号	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVINCDGF YLISLKGYSF QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRVSNLSMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 OX40L 可溶性结构域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNN NSVINCDGFYL ISLKGYSFSE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 OX40L 可溶性结构域 (备选)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNN SVII NCDGFYLLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLVNVT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 008 的可变重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRSED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106 008 的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL HSNNGYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVG YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 011 的可变重链	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMMWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNLSLRSED VYYCARDRYF RQNAFYDYW WGGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 011 的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL HSNNGYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVG YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 021 的可变重链	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRSED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 021 的可变轻链	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL HSNNGYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVG YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 023 的可变重链	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRSED AVYYCARYDN VMGLYWFYDW WGGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 023 的可变轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKQP GQAPRLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISNLEP EDFAVYYCQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 重链可变区	EVQLQSSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSLTSED SAVYYCANY GSSLMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 轻链可变区	DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLWYQKQP DGTVKLLIY TSRLHSGVPS 60 RFGSGSGGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 重链可变区	EVQLQSSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMHWVKQS HGKSLIEWIG IYPNNGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPDLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQKQP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGSGGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 人源 化抗体的重链可变区	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLEKED TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 人源 化抗体的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGGTMTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 人源 化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQKQP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:120 人源 化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQKQP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:121 人源 化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEF SHDMSWVRKT PEKRLLEVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYAWFAYW GQGTMTVTVSA 120
SEQ ID NO:122 人源 化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEF SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRSED TAVYYCARHY DDYAWFAYW GQGTMTVTVSS 120
SEQ ID NO:123 人源 化抗体的轻链可变区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHY QKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:124 人源 化抗体的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS TSGYSYMHY QKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 重链可变区	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 轻链可变区	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[0516] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包含:(i)第一可溶性OX40结合域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性OX40结合域、(iv)第二肽接头以及(v)第三可溶性OX40结合结构域,其在N-末端和/或C-末端还包含另外的结构域;其中,所述另外的结构域是Fab或Fc片段结构域。在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合

多肽,其包含:(i)第一可溶性OX40结合域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性OX40结合域、(iv)第二肽接头以及(v)第三可溶性OX40结合结构域,其在N-末端和/或C-末端还包含另外的结构域;其中,实施另外的结构域是Fab或Fc片段结构域;其中,每个可溶性OX40结合结构域缺少茎区域(有助于三聚化并提供距离细胞膜的一定距离,但不是OX40结合结构域的一部分),并且第一肽接头和第二肽接头独立地具有3至8个氨基酸的长度。

[0517] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动剂单链融合多肽,其包含:(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子结构域、(ii)第一肽接头、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子结构域、(iv)第二肽接头以及(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子结构域;其中,每个可溶性TNF超家族细胞因子结构域均缺乏茎区域,第一肽接头和第二肽接头独立地具有长度3至8个氨基酸,并且TNF超家族细胞因子结构域是OX40结合结构域。

[0518] 在一些实施方式中,OX40激动剂是MEDI6383。MEDI6383是OX40激动融合蛋白,可以如美国专利号6,312,700(其公开内容通过引用并入本文)中所述制备。

[0519] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动scFv抗体,其包含与任何前述V_L结构域连接的任何前述V_H结构域。

[0520] 在一个实施方式中,OX40激动剂是Creative Biolabs OX40激动剂单克隆抗体MOM-18455,可购自美国纽约州Shirley的Creative Biolabs,Inc.。

[0521] 在一个实施方式中,OX40激动剂是OX40激动抗体克隆Ber-ACT35,可购自美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend,Inc.。

E、步骤E:收获TIL

[0522] 在第二次扩增步骤后,可以收获细胞。在一些实施方式中,例如,在如图9中所提供的一个、两个、三个、四个或者更多个扩增步骤之后收获TIL。在一些实施方式中,例如,在如图9中所提供的两个扩增步骤之后收获TIL。

[0523] 可以以任何适当和无菌的方式收获TIL,包括例如通过离心。收获TIL的方法是本领域熟知的,并且任何这样的已知方法可与本发明方法一起使用。在一些实施方式中,使用自动化系统收获TIL。

[0524] 细胞收集器和/或细胞处理系统可购自多种来源,包括例如Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer和Inotech Biosystems International,Inc.。任何基于细胞的收集器均可用于本方法。在一些实施方式中,细胞收集器和/或细胞处理系统是基于膜的细胞收集器。在一些实施方式中,细胞收集是通过细胞处理系统,例如LOVO系统(由Fresenius Kabi制造)。术语“LOVO细胞处理系统”还指任何供应商制造的可在无菌和/或封闭系统环境中将包含细胞的溶液泵送通过膜或者过滤器(例如旋转膜或者旋转过滤器)的任何仪器或者设备,其允许连续流动和细胞处理,以除去上清液或不含沉淀的细胞培养基。在一些实施方式中,细胞收集器和/或细胞处理系统可以在封闭的无菌系统中进行细胞分离、洗涤、流体交换、浓缩和/或其他细胞处理步骤。

[0525] 在一些实施方式中,收获(例如根据图9的步骤E)是在封闭系统生物反应器中进行。在一些实施方式中,如本文所述,采用封闭系统进行TIL扩增。在一些实施方式中,采用单个生物反应器。在一些实施方式中,例如,采用的单个生物反应器是G-REX-10或者G-REX-100。在一些实施方式中,封闭系统生物反应器是单个生物反应器。

F、步骤F:最终制剂和转移至输液袋

[0526] 在如图9中以示例性顺序提供的步骤A至E之后以及如上文和此处详述的概述完成后,将细胞转移至容器以用于对患者施用。在一些实施方式中,一旦使用上述扩增方法获得治疗足够数量的TIL,将它们转移至容器以用于对患者施用。

[0527] 在一个实施方式中,将使用本公开的APC扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬液。使用本公开的PBMC扩增的TIL可通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一个实施方式中,T细胞以单次动脉内或静脉内输注,输注优选持续约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。

1、药物组合物、剂量和施用方案

[0528] 在一个实施方式中,将使用本公开方法扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬液。使用本公开的PBMC扩增的TIL可通过本领域已知的任何合适途径施用。在一些实施方式中,T细胞以单次动脉内或静脉内输注施用,输注优选持续约30至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内施用。

[0529] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施方式中,特别是当癌是黑色素瘤时,施用约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 个TIL,平均约 7.8×10^{10} 个TIL。在一个实施方式中,施用约 1.2×10^{10} 至约 4.3×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,施用约 3×10^{10} 至约 12×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,施用约 4×10^{10} 至约 10×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,施用约 5×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,施用约 6×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,施用约 7×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。在一些实施方式中,特别是当癌是黑色素瘤时,治疗有效剂量为约 7.8×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 1.2×10^{10} 至约 4.3×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 3×10^{10} 至约 12×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 4×10^{10} 至约 10×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 5×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 6×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 7×10^{10} 至约 8×10^{10} 个TIL。

[0530] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的数量为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} ,以及 9×10^{13} 。在一个实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL数量的范围为 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} ,以及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 。

[0531] 在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度小于药物组合物的例如100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、

14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%，或0.0001%w/w、w/v或者v/v。

[0532] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度大于药物组合物的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%，或者0.0001%w/w、w/v或v/v。

[0533] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度范围为药物组合物的约0.0001%至约50%、约0.001%至约40%、约0.01%至约30%、约0.02%至约29%、约0.03%至约28%、约0.04%至约27%、约0.05%至约26%、约0.06%至约25%、约0.07%至约24%、约0.08%至约23%、约0.09%至约22%、约0.1%至约21%、约0.2%至约20%、约0.3%至约19%、约0.4%至约18%、约0.5%至约17%、约0.6%至约16%、约0.7%至约15%、约0.8%至约14%、约0.9%至约12%，或约1%至约10%w/w、w/v或者v/v。

[0534] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度范围为药物组合物的约0.001%至约10%、约0.01%至约5%、约0.02%至约4.5%、约0.03%至约4%、约0.04%至约3.5%、约0.05%至约3%、约0.06%至约2.5%、约0.07%至约2%、约0.08%至约1.5%、约0.09%至约1%、约0.1%至约0.9%w/w、w/v或者v/v。

[0535] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g，或者0.0001g。

[0536] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物中提供的TIL的量大于0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、

0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g，或者10g。

[0537] 本发明的药物组合中提供的TIL在宽剂量范围内有效。精确的剂量取决于施用途径、施用化合物的形式、待治疗对象的性别和年龄、待治疗对象的体重，以及主治医师的偏好和经验。如果合适，也可使用临床确定的TIL剂量。使用本文方法施用的药物组合物的量，例如TIL的剂量，将取决于所治疗的人或哺乳动物、病症或病症的严重程度、施用率、活性药物成分的配置和处方医生的自由裁量权。

[0538] 在一些实施方式中，TIL可以单剂量施用。此种施用可通过注射，例如静脉内注射。在一些实施方式中，TIL可以多剂量施用。剂量可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或超过六次。剂量可以是每月一次、每两周一次、每周一次或每2天一次。只要有必要，TIL的施用可以继续。

[0539] 在一些实施方式中，TIL的有效剂量为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} ，以及 9×10^{13} 。在一些实施方式中，TIL的有效剂量的范围为 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} ，以及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 。

[0540] 在一些实施方式中，TIL的有效剂量的范围为约0.01mg/kg至约4.3mg/kg、约0.15mg/kg至约3.6mg/kg、约0.3mg/kg至约3.2mg/kg、约0.35mg/kg至约2.85mg/kg、约0.15mg/kg至约2.85mg/kg、约0.3mg/kg至约2.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1.7mg/kg、约0.15mg/kg至约1.3mg/kg、约0.3mg/kg至约1.15mg/kg、约0.45mg/kg至约1mg/kg、约0.55mg/kg至约0.85mg/kg、约0.65mg/kg至约0.8mg/kg、约0.7mg/kg至约0.75mg/kg、约0.7mg/kg至约2.15mg/kg、约0.85mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约1.85mg/kg、约1.15mg/kg至约1.7mg/kg、约1.3mg/kg至约1.6mg/kg、约1.35mg/kg至约1.5mg/kg、约2.15mg/kg至约3.6mg/kg、约2.3mg/kg至约3.4mg/kg、约2.4mg/kg至约3.3mg/kg、约2.6mg/kg至约3.15mg/kg、约2.7mg/kg至约3mg/kg、约2.8mg/kg至约3mg/kg，或者约2.85mg/kg至约2.95mg/kg。

[0541] 在一些实施方式中，TIL的有效剂量的范围为约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg至约110mg、约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg，或者约198至约207mg。

[0542] 有效量的TIL可通过具有类似用途的药剂的任何可接受的施用方式以单剂量或多

剂量施用,包括鼻内和透皮途径,通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、局部,通过移植或者通过吸入。

H、可选的TIL的冷冻保存

[0543] 如上所述和在图9中提供的步骤A至E中所举例说明的,冷冻保存可发生在整个TIL扩增过程中的许多节点。在一些实施方式中,可以冷冻保存第二次扩增后的扩增的TIL群(例如,如根据图9的步骤D提供的)。通常可通过将TIL群置于冷冻溶液(例如85%补体灭活的AB血清和15%二甲基亚砷(DMSO))中来实现冷冻保存。将溶液中的细胞置于冻存管中并在-80℃下储存24小时,可选地转移至气态氮冷冻机中进行冷冻保存。参见Sadeghi等, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986。在一些实施方式中, TIL在5% DMSO中冷冻保存。在一些实施方式中, TIL在细胞培养基加5% DMSO中冷冻保存。在一些实施方式中, 根据实施例8和9中提供的方法冷冻保存TIL。

[0544] 适当时,将细胞从冰箱中取出并在37℃水浴中解冻至约4/5的溶液被解冻。通常将细胞重悬于完全培养基中并可选地洗涤一次以上。在一些实施方式中,可以如本领域已知地对解冻的TIL进行计数并评估活力。

I、TIL生产的封闭系统

[0545] 本发明提供了TIL培养期间封闭系统的使用。此种封闭系统允许预防和/或减少微生物污染,允许使用更少的烧瓶,并允许降低成本。在一些实施方式中,封闭系统使用两个容器。

[0546] 此种封闭系统在本领域中是公知的,并且可以在例如<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>和<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>上找到。

[0547] 如FDA网站上所提供的,采用无菌方法的封闭系统是已知的,并且已得到充分描述。参见, <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, 如上文所述,在下文相关部分中提供。

[0548] 无菌连接设备(STCD, sterile connecting device)在两根兼容管之间产生无菌连接处。该步骤允许无菌连接各种容器和管径。本指南描述了使用这些设备的推荐操作和步骤。本指南未发布无菌连接设备制造商为了获得上市批准或许可必须提交给FDA的数据或信息。同样重要的是要注意,根据美国联邦食品、药品和化妆品法(Federal Food, Drug and Cosmetic Act.), 将经批准或许可的无菌连接设备用于标签中未授权的目的,可能会导致该设备被视为混淆品和贴假商标。

[0549] 在一些实施方式中,从获得肿瘤碎片的时间开始直至TIL准备好施用于患者或者冷冻保存,封闭系统使用一个容器。在一些实施方式中,当使用两个容器时,第一容器是封闭G容器,并且将TIL群离心并转移至输液袋而不打开第一封闭G容器。在一些实施方式中,当使用两个容器时,输液袋是含有HypoThermosol的输液袋。封闭系统或者封闭TIL细胞培养系统的特征在于,一旦添加了肿瘤样品和/或肿瘤碎片,系统就紧密密封与外界隔离,形成了一个不受细菌、真菌和/或任何其他微生物污染入侵的封闭环境。

[0550] 在一些实施方式中,微生物污染的减少为约5%至约100%。在一些实施方式中,微生物污染的减少为约5%至约95%。在一些实施方式中,微生物污染的减少为约5%至约

90%。在一些实施方式中,微生物污染的减少为约10%至约90%。在一些实施方式中,微生物污染的减少为约15%至约85%。在一些实施方式中,微生物污染的减少为约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%或者约100%。

[0551] 封闭的系统允许在无微生物污染和/或微生物污染显著减少的情况下的TIL生长。

[0552] 此外,各个TIL细胞培养环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压随着细胞的培养而变化。因此,即使循环了适用于细胞培养的培养基,封闭的环境仍然需要持续保持TIL增殖的最佳环境。为此,期望通过传感器来监测封闭环境的培养液中的物理因素(pH、二氧化碳分压和氧气分压),其信号用于控制安装在培养环境入口处的气体交换器,根据培养液的变化实时调节封闭环境的气体分压,从而优化细胞培养环境。在一些实施方式中,本发明提供了封闭细胞培养系统,该系统包括在封闭环境入口处的配备有监测装置的气体交换器,该监测装置测量封闭环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压,并根据来自监控设备的信号自动调整气体浓度来优化细胞培养环境。

[0553] 在一些实施方式中,连续或者间歇地控制封闭环境内的压力。即,例如可通过压力维持装置来改变封闭环境中的压力,从而确保该空间处于适用于TIL生长的正压状态,或者处于促进流体渗出的负压状态,从而促进细胞增殖。此外,通过间歇地施加负压,可通过封闭环境的体积的暂时收缩来均匀且有效地替换封闭环境中的循环液体。

[0554] 在一些实施方式中,可以更换或者添加用于TIL增殖的最佳培养组分,并且可以添加例如IL-2和/或OKT3的因子及它们的组合。

C、细胞培养

[0555] 在一个实施方式中,扩增TIL的方法,包括上文讨论以及在图9中举例说明的那些,可以包括使用约5,000mL至约25,000mL的细胞培养基、约5,000mL至约10,000mL的细胞培养基或者约5,800mL至约8700mL的细胞培养基。在一些实施方式中,培养基是无血清培养基。在一些实施方式中,第一次扩增中的培养基是无血清的。在一些实施方式中,第二次扩增中的培养基是无血清的。在一些实施方式中,第一次扩增和第二次扩增中的培养基均是无血清的。在一个实施方式中,使用不超过一种类型的细胞培养基扩增TIL的数量。可使用任何合适的细胞培养基,例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50 μ M硫酸链霉素和10 μ M硫酸庆大霉素)细胞培养基(Invitrogen, Carlsbad CA)。在这方面,本发明的方法有利地减少了扩增TIL数量所需的培养基的量和培养基的种类数量。在一个实施方式中,扩增TIL的数量可以包括以不超过每三天一次或每四天一次的频率喂养细胞。在透气性容器中扩增细胞的数量通过降低扩增细胞所需的喂养频率,简化了扩增细胞数量所需的程序。

[0556] 在一个实施方式中,第一和/或第二透气性容器中的细胞培养基未经过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量所需的步骤。在一个实施方式中,第一和/或第二透气性容器中的细胞培养基不含 β -巯基乙醇(BME)。

[0557] 在一个实施方式中,该方法的持续时间包括:从哺乳动物获得肿瘤组织样品;在其中装有细胞培养基的第一透气性容器中培养肿瘤组织样品;从肿瘤组织样品中获得TIL;在装有细胞培养基的第二透气性容器中扩增TIL的数量持续约7天至14天,例如约11天。在一些实施方式中,pre-REP为约7天至14天,例如约11天。在一些实施方式中,REP为约7天至14天,例如约11天。

[0558] 在一个实施方式中,在透气性容器中扩增TIL。使用本领域已知的方法、组成和装置,包括在美国专利申请公开号US2005/0106717A1中描述的那些(其公开内容通过引用并入本文),使用透气性容器,用PBMC来扩增TIL。在一个实施方式中,TIL在透气袋中扩增。在一个实施方式中,使用细胞扩增系统扩增TIL,所述细胞扩增系统在透气袋中扩增TIL,例如Xuri细胞扩增系统W25(Xuri Cell Expansion System W25)(GE Healthcare)。在一个实施方式中,使用细胞扩增系统扩增TIL,所述细胞扩增系统在透气袋中扩增TIL,例如WAVE生物反应器系统,也称为Xuri细胞扩增系统W5(GE Healthcare)。在一个实施方式中,细胞扩增系统包括透气性细胞袋,其体积选自约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L。

[0559] 在一个实施方式中,可以在G-Rex烧瓶(可购自Wilson Wolf Manufacturing)中扩增TIL。此类实施方式可以将细胞群从约 5×10^5 个细胞/cm²扩增为 $10 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6$ 个细胞/cm²。在一个实施方式中,无需喂养细胞。在一个实施方式中,只要培养基在G-Rex烧瓶中位于约10cm的高度,就不进行喂养。在一个实施方式中,不进行喂养但是添加一种以上细胞因子。在一个实施方式中,细胞因子可以作为丸剂添加而无需将细胞因子与培养基混合。此种容器、装置和方法是本领域中已知的并且已经用于扩增TIL,包括在美国专利申请公开号US2014/0377739A1、国际公开号W02014/210036A1、美国专利申请公开号US2013/0115617A1、国际公开号W02013/188427A1、美国专利申请公开号US2011/0136228A1、美国专利号US8,809,050B2、国际公开号W02011/072088A2、美国专利申请公开号US2016/0208216A1、美国专利申请公开号US2012/0244133A1、国际公开号W02012/129201A1、美国专利申请公开号US2013/0102075A1,美国专利号US8,956,860B2、国际公开号W02013/173835A1和美国专利申请公开号US2015/0175966A1中描述的那些,其公开内容通过引用并入本文。这些方法也描述于Jin等,J. Immunotherapy 2012,35,283-292。

D、可选的TIL冷冻保存

[0560] 可选地,可以冷冻保存大量TIL群或扩增的TIL群。在一些实施方式中,冷冻保存发生在治疗性TIL群上。在一些实施方式中,对第二次扩增后获得的TIL进行冷冻保存。在一些实施方式中,在图9的示例性步骤F中,对TIL进行冷冻保存。在一些实施方式中,对TIL进行冷冻保存在输液袋中。在一些实施方式中,在放入输液袋之前对TIL进行冷冻保存。在一些实施方式中,对TIL进行冷冻保存并且不放置在输液袋中。在一些实施方式中,使用冷冻保存培养基进行冷冻保存。在一些实施方式中,冷冻保存培养基包含二甲基亚砜(DMSO)。这通常是通过将TIL群置于冷冻溶液中来完成,例如85%补体灭活的AB血清和15%二甲基亚砜(DMSO)。将溶液中的细胞放入冻存管中,在-80℃下储存24小时,并可选地转移至气态氮气冷冻机以冷冻保存。参见Sadeghi等,Acta Oncologica 2013,52,978-986。

[0561] 适当时,将细胞从冰箱中取出,在37℃水浴中解冻,直至约4/5的溶液被解冻。通常将细胞重悬于完全培养基中,并可选地洗涤一次以上。在一些实施方式中,如本领域中已知的,可对解冻的TIL进行计数并评估活力。

[0562] 在一个优选实施方式中,使用CS10冷冻保存培养基(CryoStor 10,BioLife Solutions)对TIL群进行冷冻保存。在一个优选实施方式中,使用包含二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保存培养基对TIL群进行冷冻保存。在一个优选实施方式中,使用1:1(体积:体积)比率

的CS10和细胞培养基对TIL群进行冷冻保存。在一个优选实施方式中,使用约1:1 (体积:体积) 比率的CS10和细胞培养基 (还包含另外的IL-2) 对TIL群进行冷冻保存。

[0563] 根据具体实施方式,冷冻保存组合物 (本文也称为“基于二甲基亚砜的冷冻保存培养基”) 包含:根据本发明制备的TIL群 (例如,其量为 1×10^6 至 9×10^{13})、适用于在低温环境 (例如 -70°C 至 -196°C) 保存细胞的包含DMSO的冷冻保护剂 (例如CryoStor[®] CS10) 和电解质溶液 (例如等渗溶液,例如PlasmaLyte[®] A)。在一个优选实施方式中,冷冻保护剂和电解质溶液以约1.2:1至约1:1.2或约1.1:1至约1:1.1或优选约1:1的比率存在。根据一个实施方式,电解质溶液包含钠、钾、镁、乙酸盐、氯化物和葡萄糖酸盐中的一种以上或它们的组合;例如,电解质溶液可包含氯化钠、葡萄糖酸钠、三水合乙酸钠、氯化钾和氯化镁。根据一个实施方式,电解质溶液的pH为约7至约8,优选为约7.2至约7.6,或约7.4。优选地,冷冻保存组合物还包含一种以上稳定剂 (例如人血清白蛋白) 和/或一种以上淋巴细胞生长因子 (例如IL-2)。例如,冷冻保护剂和电解质溶液各自可以以约20mL至约100mL或约30mL至约70mL或约40mL至约60mL或约50mL的量存在于冷冻保存组合物中;人血清白蛋白可以约0.01g至约2.0g或约0.1g至约1.0g或约0.5g的量存在;IL-2可以约0.001mg至约0.005mg或约0.0015mg至约0.0025mg或约0.0018mg的量存在。冷冻保存培养基可以可选地包含一种以上其他添加剂或赋形剂,例如pH调节剂、防腐剂等。

[0564] 根据一个实施方式,包含TIL群的冷冻保存组合物由以下组成:

药品的公称成分 (% v/v) (以100mL为基准)

成分	公称量/100 mL 填充	功能
肿瘤浸润淋巴细胞	83×10^7 至 3.0×10^{10}	活性成分
CryoStor [®] CS10 ^a	50 mL	冷冻保存培养基
PlasmaLyte A	50 mL	等渗剂
人血清白蛋白 (HSA)	0.5 g	稳定剂
白细胞介素-2	0.0018 mg (30,000 IU)	淋巴细胞生长因子
总计	100 mL	

^a CryoStor CS10含有10%二甲基亚砜 (DMSO)

[0565] 如以上在步骤A至E中所讨论的,冷冻保存可能发生在整个TIL扩增过程中的许多节点。在一些实施方式中,可以冷冻保存根据步骤B的第一次扩增后的大量TIL群或者根据步骤D的一个以上第二次扩增后的扩增的TIL群。冷冻保存通常可通过将TIL群放入冷冻溶液中完成,例如85%补体灭活的AB血清和15%二甲基亚砜 (DMSO)。将溶液中的细胞放入冻存管中,在 -80°C 下储存24小时,并可选地转移至气态氮气冷冻机以冷冻保存。参见Sadeghi等,Acta Oncologica 2013,52,978-986。

[0566] 适当时,将细胞从冰箱中取出,在 37°C 水浴中解冻,直至约4/5的溶液被解冻。通常将细胞重悬于完全培养基中,并可选地洗涤一次以上。在一些实施方式中,如本领域中已知的,可对解冻的TIL进行计数并评估活力。

[0567] 在一些情况下,可使用下文讨论的方案立即对步骤B的TIL群进行冷冻保存。或者,可对大量TIL群进行步骤C和D,然后在步骤D之后进行冷冻保存。类似地,在将基因修饰的TIL用于治疗的情况下,可对步骤B或者步骤D的TIL群进行基因修饰以用于适当的治疗。

V、治疗癌症和其他疾病的方法

[0568] 本文所述的组合物和方法可用于治疗疾病的方法中。在一个实施方式中，它们用于治疗过度增殖性疾病。它们还可用于治疗如此处及以下段落中描述的其他病症。

[0569] 在一些实施方式中，过度增殖性疾病是癌症。在一些实施方式中，过度增殖性疾病是实体瘤癌症。在一些实施方式中，实体瘤癌症选自黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包括头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、肾癌和肾细胞癌。在一些实施方式中，过度增殖性疾病是血液恶性肿瘤。在一些实施方式中，实体瘤癌症选自慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。

[0570] 在一个实施方式中，本发明包括用TIL群治疗癌症的方法，其中，根据本公开内容，在输注TIL之前用非清髓性化疗预处理患者。在一个实施方式中，非清髓性化疗是以60mg/kg/天施用环磷酰胺持续2天(TIL输注前第27和26天)和以25mg/m²/天施用氟达拉滨持续5天(TIL输注前第27至23天)。在一个实施方式中，在根据本公开内容的非清髓性化疗和TIL输注(在第0天)后，患者以720,000IU/kg每8小时接受一次IL-2的静脉输注，直至生理耐受。

[0571] 本文所述的TIL在治疗、预防和/或控制所示疾病或病症中的疗效可使用本领域已知的各种模型进行测试，为人类疾病的治疗提供指导。例如，用于确定卵巢癌治疗疗效的模型描述于例如Mullany等, *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; 以及Fong等, *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12。用于确定胰腺癌治疗疗效的模型描述于Herrerros-Villanueva等, *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294。用于确定乳腺癌治疗疗效的模型描述于例如Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212。用于确定黑色素瘤治疗疗效的模型描述于例如Damsky等, *Pigment Cell&Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859。用于确定肺癌治疗疗效的模型描述于例如Meuwissen等, *Genes&Development*, 2005, 19, 643-664。用于确定肺癌治疗疗效的模型描述于例如Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60; 以及Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32。

[0572] 在一些实施方式中，IFN-伽马(IFN- γ)指示过度增殖性疾病治疗的治疗疗效。在一些实施方式中，用TIL治疗的受试者的血液中的IFN- γ 指示活性TIL。在一些实施方式中，采用了IFN- γ 产生的效价测定。IFN- γ 产生是细胞毒性潜力的另一种量度。可通过测定用本发明方法(包括例如图20或图21中所述那些)制备的TIL治疗受试者的血液中细胞因子IFN- γ 的水平，来检测IFN- γ 的产生。在一些实施方式中，与用称为过程1C的方法(如图13中所示)制备的TIL治疗的受试者相比，本发明方法获得的TIL在用本发明方法的TIL治疗的受试者的血液中提供增加的IFN- γ 。在一些实施方式中，IFN- γ 的增加指示用本发明方法产生的TIL治疗的患者的治疗疗效。在一些实施方式中，与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN- γ 增加了1倍、2倍、3倍、4倍或者5倍或者更多倍。在一些实施方式中，与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN- γ 的分泌增加了1倍。在一些实施方式中，与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN- γ 的分泌增加了2倍。在一些实施方式中，与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如

除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN- γ 的分泌增加了3倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN- γ 的分泌增加了4倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,IFN- γ 的分泌增加了5倍。在一些实施方式中,使用Quantikine ELISA试剂盒检测IFN- γ 。在一些实施方式中,使用Quantikine ELISA试剂盒检测IFN- γ 。在一些实施方式中,在用本发明方法产生的TIL治疗的患者离体的TIL中,测量IFN- γ 。在一些实施方式中,检测用本发明方法产生的TIL治疗的患者血液中的IFN- γ 。在一些实施方式中,检测用本发明方法产生的TIL治疗的患者血清中的IFN- γ 。

[0573] 在一些实施方式中,与通过其他方法制备的TIL(包括图20或图21中未示例的那些)相比,通过本发明的方法制备的TIL(包括例如图20或图21描述的那些,例如称为过程1C方法的方法)表现出增加的多克隆性。在一些实施方式中,显著改善的多克隆性和/或增加的多克隆性指示癌症治疗的治疗功效和/或临床功效增加。在一些实施方式中,多克隆性指T细胞库多样性。在一些实施方式中,多克隆性增加可指示关于施用本发明方法产生的TIL的治疗功效。在一些实施方式中,与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图20或图21所示那些之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加了1倍、2倍、10倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图9所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了1倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图9所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了2倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图9所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了10倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图9所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了100倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图9所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了500倍。在一些实施方式中,与未经治疗的患者相比和/或与使用除本文所述那些之外的方法(包括例如除了图9所示那些之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加了1000倍。

1、共同施用的方法

[0574] 在一些实施方式中,如本文所述产生的TIL,包括例如来自图20或图21中所述方法的TIL,可与一种以上免疫检查点调节剂组合施用,例如下文描述的抗体。例如,靶向PD-1并且可与本发明的TIL共同施用的抗体包括例如但不限于:尼沃鲁单抗(BMS-936558,百时美施贵宝; Opdivo[®]),兰洛利珠单抗(lambrolizumab, MK03475或MK-3475,默克; Keytruda[®]),人源化抗PD-1抗体JS001(ShangHai JunShi),单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro, Inc.),匹地利珠单抗(抗PD-1mAb CT-011, Medivation),抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(BeiGene)和/或抗PD-1抗体SHR-1210(ShangHai HengRui),人单克隆抗体REGN2810(Regeneron),人单克隆抗体MDX-1106(Bristol-Myers Squibb),和/或人源化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(Novartis)。在一些实施方式中,PD-1抗体来自克隆:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号

BP0146。适用于根据本文所述步骤A至步骤F产生的TIL的共同施用方法的其它合适的抗体是美国专利号8,008,449中公开的抗PD-1抗体,其内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合部分特异性结合PD-L1并抑制其与PD-1的相互作用,从而增加免疫活性。任何本领域已知的与PD-L1结合并破坏PD-1和PD-L1之间相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体,均适合用于根据本文所述步骤A至步骤F产生的TIL的共同施用方法。例如,靶向PD-L1并且处于临床试验中的抗体包括BMS-936559(Bristol-Myers Squibb)和MPDL3280A(Genentech)。靶向PD-L1的其他合适的抗体公开于美国专利号7,943,743中,其内容通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解,任何与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体,均适合用于根据本文所述步骤A至步骤F产生的TIL的共同施用方法。在一些实施方式中,当患者具有难以用单独施用抗PD-1抗体治愈的癌症类型时,施用根据步骤A至步骤F产生的TIL组合的受试者被共同施用抗PD-1抗体。在一些实施方式中,当患者患有重构黑色素瘤(refractory melanoma)时,给患者施用与抗PD-1组合的TIL。在一些实施方式中,当患者患有非小细胞肺癌(NSCLC)时,给患者施用与抗PD-1组合的TIL。

2、可选的患者的淋巴细胞耗竭预处理

[0575] 在一个实施方式中,本发明包括用TIL群治疗癌症的方法,其中,根据本公开内容,在输注TIL之前用非清髓性化疗对患者进行预处理。在一个实施方式中,本发明包括用于治疗患者的癌症的TIL群,该患者已用非清髓性化疗进行预处理。在一个实施方式中,TIL群用于通过输注施用。在一个实施方式中,非清髓性化疗是以60mg/kg/天施用环磷酰胺持续2天(TIL输注前第27和26天)和以25mg/m²/天施用氟达拉滨持续5天(TIL输注前第27至23天)。在一个实施方式中,在根据本公开内容的非清髓性化疗和TIL输注(在第0天)后,患者以720,000IU/kg每8小时接受一次IL-2(阿地白细胞介素,作为PROLEUKTN市售)的静脉输注,直至生理耐受。在某些实施方式中,TIL群与IL-2组合用于治疗癌症;其中,IL-2在TIL群之后施用。

[0576] 实验结果表明,过继性转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前的淋巴细胞耗竭通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争成分(“细胞因子沉降”)而在提高治疗疗效中起关键作用。因此,本发明的一些实施方式在引入本发明的TIL之前对患者使用淋巴细胞耗竭步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

[0577] 通常,采用施用氟达拉滨或环磷酰胺(活性形式称为马磷酰胺),及它们的组合来完成淋巴细胞耗竭。此种方法描述于Gassner等,Cancer Immunol Immunother.2011,60,75-85;Muranski等,Nat.Clin.Pract.Oncol.,2006,3,668-681、Dudley等;J.Clin.Oncol.2008,26,5233-5239和Dudley等,J.Clin.Oncol.2005,23,2346-2357,所有这些文献都通过引用整体并入本文。

[0578] 在一些实施方式中,氟达拉滨以0.5μg/mL至10μg/mL氟达拉滨的浓度施用。在一些实施方式中,氟达拉滨以1μg/mL氟达拉滨的浓度施用。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗施用1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更长时间。在一些实施方式中,氟达拉滨以10mg/kg/天、15mg/kg/天、20mg/kg/天、25mg/kg/天、30mg/kg/天、35mg/kg/天、40mg/kg/天或45mg/kg/天的剂量施用。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以35mg/kg/天施用2至7天。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以35mg/kg/天施用4至5天。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以

25mg/kg/天施用4至5天。

[0579] 在一些实施方式中,通过施用环磷酰胺获得0.5 μ g/mL至10 μ g/mL浓度的马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)。在一些实施方式中,通过施用环磷酰胺获得1 μ g/mL浓度的马磷酰胺(活性形式的环磷酰胺)。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗施用1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更长时间。在一些实施方式中,环磷酰胺以100mg/m²/天、150mg/m²/天、175mg/m²/天、200mg/m²/天、225mg/m²/天、250mg/m²/天、275mg/m²/天或300mg/m²/天的剂量施用。在一些实施方式中,静脉注射(即i.v.)施用环磷酰胺。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以35mg/kg/天施用2至7天。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以250mg/m²/天静脉注射施用4至5天。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以250mg/m²/天静脉注射施用4天。

[0580] 在一些实施方式中,通过将氟达拉滨和环磷酰胺共同施用于患者来进行淋巴细胞耗竭。在一些实施方式中,氟达拉滨以25mg/m²/天静脉注射施用且环磷酰胺以250mg/m²/天静脉注射施用,持续4天。

[0581] 在一个实施方式中,通过以60mg/m²/天的剂量施用环磷酰胺持续2天,然后以25mg/m²/天的剂量施用氟达拉滨持续5天,来进行淋巴细胞耗竭。

3、IL-2方案

[0582] 在一个实施方式中,IL-2方案包括高剂量IL-2方案;其中,高剂量IL-2方案包括:在施用治疗有效份的第三TIL群之后的第二天开始静脉内施用阿地白细胞介素或其生物类似物或变体;其中,阿地白细胞介素或其生物类似物或变体以0.037mg/kg或0.044mg/kg IU/kg (患者体重)的剂量每8小时一次静脉推注施用15分钟,直至耐受,最多14剂。休息9天后,可以重复该时间表进行另外14个剂量,总共最多28个剂量。

[0583] 在一个实施方式中,IL-2方案包括递减型(decrescendo) IL-2方案。递减型IL-2方案已描述于0'Day等,J.Clin.Oncol.1999,17,2752-61和Eton等,Cancer 2000,88,1703-9,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施方式中,递减型IL-2方案包括在6小时内静脉内施用 18×10^6 IU/m²,然后在12小时内静脉内施用 18×10^6 IU/m²,然后在24小时内静脉内施用 18×10^6 IU/m²,然后在72小时内静脉内施用 4.5×10^6 IU/m²。该治疗循环可每28天重复一次,最多4个循环。在一个实施方式中,递减型IL-2方案包括在第1天18,000,000 IU/m²,在第2天9,000,000 IU/m²,在第3和4天4,500,000 IU/m²。

[0584] 在一个实施方式中,IL-2方案包括每天、每2天、每4天、每6天、每7天、每14天或每21天,以0.10mg/天至50mg/天的剂量施用聚乙二醇化的IL-2。

4、过继性细胞转移(Adoptive Cell Transfer)

[0585] 过继性细胞转移(ACT)是一种非常有效的免疫治疗形式,涉及将具有抗肿瘤活性的免疫细胞转移至癌症患者体内。ACT是一种治疗方法,涉及体外识别具有抗肿瘤活性的淋巴细胞,将这些细胞大量体外扩增,以及将其输注到患癌宿主中。用于过继性转移的淋巴细胞可以来自切除肿瘤的基质(肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)。可以如本文所述制备用于ACT的TIL。在一些实施方式中,例如根据图9中描述的方法来制备TIL。如果它们经基因工程改造以表达抗肿瘤T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR),富含混合淋巴细胞肿瘤细胞培养物(MLTC),或使用自体抗原呈递细胞和肿瘤衍生肽克隆,则它们也可来源或来自血液。淋巴细胞来源于待输注的患癌宿主的ACT称为自体ACT。美国公开号2011/0052530涉及用于实施过继性细胞治疗以促进癌症消退的方法,主要用于治疗患有转移性黑色素瘤的患者,其通过

引用整体并入本文。在一些实施方式中,TIL可以如本文所述施用。在一些实施方式中,TIL可以单剂量施用。此种施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方式中,TIL和/或细胞毒性淋巴细胞可以多剂量施用。剂量可以是每年一次,两次,三次,四次,五次,六次或超过六次。剂量可以是每月一次,每两周一次,每周一次,或隔天一次。只要需要,TIL和/或细胞毒性淋巴细胞的施用可以继续。

实施例

[0586] 现在参考以下实施例描述本文包括的实施方式。提供这些实施例仅用于说明的目的,并且本文包括的公开内容决不应被解释为限于这些实施例,而是应该被解释为包括由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

实施例

实施例1:冷冻保存的TIL细胞治疗的生产

[0587] 本实施例描述了根据现行良好组织操作 (Good Tissue Practices) 和现行良好生产规范 (Good Manufacturing Practices) 在G-Rex烧瓶中的TIL治疗的cGMP生产。

过程参考扩增计划

预估(接种后)第几天	操作	目标标准	预期容器	预估总体积 (mL)
0	肿瘤解剖	≤ 50 个所需肿瘤碎片/ G-Rex100MCS	G-Rex100MCS: 1 个烧瓶	≤1000
11	REP 接种	5×10^6 至 200×10^6 个活细胞/ G-Rex500MCS	G-Rex500MCS: 1 个烧瓶	≤5000
16	REP 分装	1×10^9 个活细胞/ G-Rex500MCS	G-Rex500MCS ≤5 个烧瓶	≤25000
22	收获	全部可获得的细胞	3 至 4 个 CS-750 袋	≤530

烧瓶体积:

烧瓶类型	工作体积/烧瓶 (mL)
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

设备

[0588] 设备列表:第0天,CM1培养基制备/肿瘤洗涤液制备/肿瘤解剖:

- 差压计 (Magnehelic Gauge)
- 生物安全柜 (BSC)
- 培养箱
- CO₂分析仪
- 微量移液器 (100–1000μL)
- 吸管辅助器 (Pipet-Aid)
- Baxa中继泵
- Sebra封管机
- 2°C–8°C冰箱
- –80°C冰柜
- –20°C冰柜

- 计时器

[0589] 设备列表:CM2制备/第11天REP接种

- 差压计
- 生物安全柜 (BSC)
- 培养箱
- 培养箱
- CO₂分析仪
- 干浴
- 水浴
- CytoTherm
- 焊机
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- Baxa中继泵
- Sebra封管机秤

[0590] 设备列表:CM2制备/第11天REP接种

- 离心机
- 微量移液器 (100–1000μL)
- 吸管辅助器
- 计时器
- 2℃–8℃冰箱
- –80℃冰柜
- 控速冷冻机
- LN₂储存冷冻柜 (Quarantine)
- –20℃冰柜

[0591] 设备列表:CM4制备/第16天

- 差压计
- 生物安全柜 (BSC)
- 培养箱
- 培养箱
- CO₂分析仪
- 焊机
- 焊机
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- Baxa中继泵
- Sebra封管机秤
- 微量移液器 (100–1000μL)
- 吸管辅助器

- 2℃-8℃冰箱
- -80℃冰柜

[0592] 设备列表:第22天,配制、填充、冷冻保存

- 差压计
- 生物安全柜 (BSC)
- 培养箱
- 培养箱
- CO₂分析仪
- 焊机
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- Baxa中继泵
- Sebra封管机秤
- 微量移液器 (20-200μL) 吸管辅助器

[0593] 设备列表:第22天,配制、填充、冷冻保存

- 吸管辅助器
- 2℃-8℃冰箱
- -80℃冰柜
- 控速冷冻机
- LN₂储存冷冻柜
- LN₂储存冷冻柜 (Quarantine)
- LOVO细胞处理系统

7.0材料

[0594] 材料:第0天,CM1培养基制备/肿瘤洗涤液制备/肿瘤

[0595] 解剖

- 一次性解剖刀,无菌
- 50mL血清移液管,无菌
- 1mL塑料血清移液管,无菌
- 10mL血清移液管,无菌
- 离心管,50mL,28×114mm,锥形底座,螺帽,PP,无菌
- 25mL血清移液管,无菌
- 5mL血清移液管,无菌
- MF75系列,一次性组织培养过滤器,1000mL,aPES过滤器,0.2μm,无菌
- 移液管,血清100mL
- 2-巯基乙醇1000X,液体,55mM,在D-PBS中
- Hank平衡钠盐溶液 (1X),液体,w/o氯化钙、氯化镁、硫酸镁
- GlutaMAX 1-200mM (100X),液体
- ART Barrier移液器吸头,1000μL,独立包装,无菌
- 150mm培养皿,加深,无菌

- 6孔超低吸附板,9.5cm²孔生长面积,PS,无菌
- Thermo Scientific Samco通用移液器,7.7mL,无菌
- 中继泵流体转运套件,公鲁尔锁端
- 8英寸长镊子,无菌
- 硫酸庆大霉素,50mg/mL储备溶液
- 一次性科学镊子,4.5英寸,不锈钢,无菌
- 100mm培养皿,无菌,加深
- 泵送液体分配系统
- 硫酸庆大霉素,50mg/mL储备溶液
- 双功能注射器盖,红色
- RPMI-1640,1L瓶
- G-Rex 100M烧瓶,封闭系统
- 无菌性标尺
- 重组IL-2
- 人体肿瘤样品,头颈,N/A
- 人体肿瘤样品,宫颈,N/A
- GemCell人血清AB,热灭活,N/A
- 人类肿瘤样品,黑色素瘤
- GemCell人血清AB,热灭活

[0596] 材料:CM2制备/第11天REP接种

- 鲁尔锁 (Luer-Lok) 注射器,60mL无菌针头16G×1.5",无菌
- 50mL血清移液管,无菌
- 1mL血清移液管,塑料,无菌
- Nunc内螺纹冻存管,无菌
- 10mL血清移液管,无菌
- 离心管,15mL
- 离心管,50mL
- 移液管,血清100mL
- 1cc鲁尔锁注射器,无菌
- 3mL注射器,鲁尔锁吸头,无菌
- 5mL血清移液管,无菌
- Nalgene*MF75*系列过滤器单元接收容器,250mL,无菌
- Nalgene MF75系列过滤器单元接收容器,500mL,无菌
- 1000mL Nalgene快速流动无菌一次性过滤器单元,0.22μm PES
- CryoStor CS-10
- 2-巯基乙醇1000X,液体,55mM,在D-PBS中
- GlutaMAX 1-200mM (100X),液体
- 1000μL ART Barrier无菌移液器吸头,独立包装
- VIA1盒

- 转运包容器,1000mL,带连接器,无菌
- 转运包300mL,带连接器
- 无菌酒精棉片
- 中继泵流体转运套件,公鲁尔锁端
- CTS AIM V 1L瓶
- 纯MACS GMP CD3 (OKT-3)
- 硫酸庆大霉素,50mg/mL储备溶液
- 4英寸管,带穿刺针和注射器适配器
- 鲁尔锁注射器,10mL
- 管,四尖嘴公鲁尔歧管
- 重力式给血装置(• Gravity Blood Administration Set),Y型,无注射位点,170 μ m

血液过滤器

- 泵送液体分配系统
- 10L Labtainer 3端口袋
- 硫酸庆大霉素,50mg/mL储备溶液
- 100mL注射器
- 3000mL培养袋
- OrigenCell Connect CC2
- 双功能注射器盖,红色
- RPMI-1640,1L瓶
- G-Rex 500M烧瓶,封闭系统
- 重组IL-2
- 同种异体的经辐照饲养细胞
- 同种异体的经辐照饲养细胞
- 人血清,AB (HI) 型 (Gemini)
- 人血清,AB (HI) 型 (Gemini)

[0597] 材料:CM4制备/第16天

- 鲁尔锁注射器,60mL,无菌
- 1mL塑料血清移液管,无菌
- Nunc无菌内螺纹圆柱管样品瓶
- 10mL血清移液管,无菌
- 离心管,15mL
- 离心管,50mL
- 血清移液管,100mL
- 带鲁尔锁的无菌注射器,3mL
- 5mL血清移液管,无菌
- 鲁尔锁注射器,10mL
- Nalgene*MF75*系列
- 过滤器单元接收容器,250mL,无菌

- GlutaMAX 1-200mM (100X), 液体
- 1000µL ART Barrier移液器吸头, 独立包装, 无菌
- VIA1盒

[0598] 材料: CM4制备/第16天

- 转运包容器, 1000mL, 带连接器, 无菌
- 无菌酒精棉片
- 中继泵流体转运套件, 公鲁尔锁端
- CTS AIM-V 1000mL, N/A
- 血浆转运装置4英寸管, 带母鲁尔接头
- 30mL鲁尔锁无菌注射器
- CTS AIM V 10L袋
- 泵送液体分配系统
- 10L Labtainer 3端口袋
- 双功能注射器盖, 红色
- G-Rex500M烧瓶, 封闭系统
- 重组IL-2

[0599] 材料: 第22天, 配制、填充、冷冻保存

- 鲁尔锁注射器, 60mL, 无菌
- 16G针x 1.5英寸, 无菌
- 50mL血清移液管, 无菌
- Nunc内螺纹冻存管, 无菌
- 10mL血清移液管, 无菌
- 离心管, 15mL
- 离心管, 50mL
- 1cc鲁尔锁注射器, 无菌
- 3mL注射器, 鲁尔锁吸头, 无菌
- 25mL血清移液管, 无菌
- 5mL血清移液管, 无菌
- 鲁尔锁注射器, 10mL
- 血清移液管, 100mL
- ART Barrier无菌移液器吸头, 200µL, 独立包装
- VIA1盒
- Plasma-Lyte A注射液1L
- LOVO一次性细胞洗涤套装
- LOVO辅助袋套件
- 无菌酒精棉片
- 中继泵流体转运套件, 公鲁尔锁端
- CTS AIM V 1L瓶
- 人白蛋白25%

- 血浆转运装置4英寸管,带母鲁尔接头
- 管,四公鲁尔歧管
- 重力式给血装置
- Y型装置,无注射位点,170 μ m血液过滤器
- 泵送液体分配系统
- 10L Labtainer 3端口袋
- 100mL注射器
- CS750冻存袋
- 3L培养袋
- OrigenCell Connect CC2
- 双功能注射器盖,红色
- Cryostor CS10,100mL袋
- 分配尖嘴,通风
- 重组IL-2

[0600] 过程

8.1第0天,CM1培养基制备

8.1.1检查房间消毒、管线清除和材料。确认房间消毒。

8.1.2确保完成预处理表格。

8.1.3环境监测。在处理前,确保已开始进行预处理环境监控。

8.1.4制备RPMI 1640培养基。在BSC中,使用适当尺寸的移液器,从1000mL RPMI 1640培养基中取出100.0mL,放入适当尺寸的带有“废弃物”标签的容器中。

8.1.5在BSC中,将试剂添加至RPMI 1640培养基瓶中。如下表所示,向RPMI 1640培养基瓶中添加以下试剂。记录添加的体积。每瓶添加的量:热灭活的人AB血清(100.0mL); GlutaMax(10.0mL);硫酸庆大霉素50mg/mL(1.0mL);2-巯基乙醇(1.0mL)。

8.1.6混合培养基。给步骤8.1.5的RPMI 1640培养基瓶加盖,旋转瓶子以确保试剂充分混合。

8.1.7过滤RPMI培养基。通过1L 0.22微米过滤器单元过滤步骤8.1.6的RPMI 1640培养基。

8.1.8给经过滤的培养基贴上标签。无菌地盖住经过滤的培养基,标签上具有以下信息。

8.1.9从BSC中取出不必要材料。从BSC中取出培养基试剂,将硫酸庆大霉素和HBSS留在BSC中以用于8.2节中洗涤培养基的配制。

8.1.10储存未使用的消耗品。将所有剩余的打开/解冻的培养基试剂转移到适当储存条件下或丢弃为废物。注:按照过程注释5.9,给培养基试剂分配适当有效期,贴上批次记录批号。

8.1.11解冻IL-2等分试样。解冻一个1.1mL的IL-2等分试样(6×10^6 IU/mL)(BR71424),直至所有的冰均熔化。记录IL-2:批号和有效期(注:确保已粘贴IL-2标签)。

8.1.12将IL-2储备溶液转移至培养基。在BSC中,将1.0mL IL-2储备溶液转移至步骤8.1.8中制备的CM1第0天培养基瓶中。加入CM1第0天培养基1瓶和IL-2(6×10^6 IU/mL)

1.0mL。

8.1.13混合,重新贴标签。盖上盖子,旋转瓶子以混合含有IL-2的培养基。重新标记为“完全CM1第0天培养基”,分配新的批号。

8.1.14按照样品计划,取出样品培养基。使用适当尺寸的移液管取出20.0mL培养基,加到50mL锥形管中。

8.1.15贴好标签,储存。给样品贴上样品计划库存标签,在2℃至8℃下储存“培养基保留”样品,直至根据样品计划提交登录进行检测。

8.1.16签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.1.17准备“组织块”锥形管。在BSC中,将25.0mL的“完全CM1第0天培养基”(步骤8.1.13中制备)转移至50mL锥形管中。将试管贴上标签“组织小块”,记录批号。

8.1.18将G-Rex100MCS转移到BSC。无菌地将G-Rex100MCS (W3013130) 转移到BSC。

8.1.19准备G-Rex100MCS。在BSC中,关上G-Rex100MCS上的所有夹子,使排气过滤器夹子保持打开状态。

8.1.20准备G-Rex100MCS。通过鲁尔连接件将G-Rex100MCS烧瓶的红色管线连接到中继泵流体转运装置(W3009497)的较大直径端。

8.1.21准备Baxa泵。将Baxa泵置于BSC旁边。从BSC卸下中继泵流体转运装置的泵管部分并将其安装在中继泵中。

8.1.22准备泵送培养基。在BSC内,从泵送液体分配系统(PLDS) (W3012720) 卸下注射器并丢弃。注:确保不损害PLDS移液器的无菌性。

8.1.23准备泵送培养基。通过鲁尔连接件将PLDS移液器连接到中继泵流体转运装置的较小直径端,将移液器尖端放置在“完全CM1第0天培养基”(步骤8.1.13中制备)中以进行抽取。打开培养基和G-Rex100MCS之间的所有夹子。

8.1.24将完全CM1培养基泵入G-Rex100MCS烧瓶中。将泵速设置为“高”和“9”,然后将所有完全CM1第0天培养基泵入G-Rex100MCS烧瓶。一旦转移完所有培养基,清除管线,停止泵送。

8.1.25从烧瓶上断开泵。确保除通气过滤器外,所有烧瓶上的夹子都已关闭。从红色培养基管线上拆下中继泵流体转运装置,在红色培养基管线上放一个红色盖子(W3012845)。

8.1.26热封。从BSC上取下G-Rex100MCS烧瓶,(按照过程注释5.12)热封终端鲁尔接口附近红色管线上的红色盖子。

8.1.27标记G-Rex100MCS。给G-Rex100MCS烧瓶贴上QA提供的过程中“第0天”标签。给样品贴上以下标签“第0天”。

8.1.28监控培养箱。保温箱参数:温度LED显示屏: $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$;CO₂百分比: $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。

8.1.29加热培养基。将步骤8.1.17制备的标有“组织碎片”的50mL锥形管和步骤8.1.27制备的G-Rex100MCS放入培养箱中,加热 ≥ 30 分钟。下面记录加热时间。记录预热时间 ≥ 30 分钟(是/否)。

[组织碎片锥形管或G-Rex100MCS]

8.1.30检查8.1节。

8.2第0天,制备肿瘤洗涤培养基

8.2.1将庆大霉素添加至HBSS中。在BSC中,将5.0mL庆大霉素(W3009832或W3012735)添加至1×500mL HBSS培养基(W3013128)瓶中。记录体积。每瓶添加:HBSS(500.0mL);硫酸庆大霉素50mg/mL(5.0mL)。

8.2.2盖上HBSS瓶,旋紧。盖上步骤8.2.1制备的含有庆大霉素的HBSS,旋紧瓶子,确保彻底混合试剂。

8.2.3过滤溶液。通过1L 0.22微米过滤器单元(W1218810),过滤在步骤8.2.1中制备的含有庆大霉素的HBSS。

8.2.4无菌盖上过滤后的培养基,贴上标签。无菌盖上过滤后的培养基,标记以下信息。进入8.3节。

8.2.5检查8.2节。

8.3第0天,肿瘤处理

8.3.1获得肿瘤。从QAR获得肿瘤样本,立即转移到2℃至8℃套件中进行处理。确保将所有必要信息记录在肿瘤运输批次记录。

8.3.2记录肿瘤信息。

8.3.3贴上肿瘤标签。贴上肿瘤附件。QAR发布标签如下。贴上的肿瘤运输批次记录为#5。

8.3.4将用于肿瘤解剖的必要材料放入BSC。

8.3.5打开材料。打开BSC内部的所有材料,确保不影响材料的无菌性。

8.3.6标记材料。标记3个50mL锥形管:第一个标记为“镊子”,第二个标记为“解剖刀”,第三个标记为“新鲜肿瘤洗涤培养基”。将5×100mm培养皿标记为“洗涤1”、“洗涤2”,“洗涤3”、“保持”和“不良”。将1个6孔板标记为“良好中间碎片”。

8.3.7等分肿瘤洗涤培养基。使用适当尺寸的移液器,将5.0mL的“肿瘤洗涤培养基”转移至一个6孔板的每个孔中,得到良好的中间肿瘤碎片(总计30.0mL)。注:在进行肿瘤洗涤和解剖过程中,视需要将镊子和解剖刀分别存放在各自的肿瘤洗涤培养基锥形瓶中。

8.3.8等分肿瘤洗涤培养基。使用适当尺寸的移液器,将50.0mL步骤8.2.4中制备的“肿瘤洗涤培养基”转移至“洗涤1”、“洗涤2”,“洗涤3”和“保持”的每个100mm培养皿中(总共200.0mL)。

8.3.9等分肿瘤洗涤培养基。使用适当尺寸的移液器,将20.0mL步骤8.2.4中制备的“肿瘤洗涤培养基”转移至每个50mL锥形瓶中(总共60.0mL)。

8.3.10准备盖子用于肿瘤块。从2个6孔板上无菌地取下盖子。将盖子用于所选肿瘤块。注:在整个肿瘤处理过程中,不要跨过开放的组织培养板和盖子。8.3.11将肿瘤转移到BSC中。将肿瘤无菌转移到BSC中。记录处理开始时间。

8.3.12肿瘤洗涤1:使用8”镊子(W3009771)从样本瓶中取出肿瘤,转移至步骤8.3.8准备的“洗涤1”皿中。注:将溶液保留在样本瓶中。

8.3.13肿瘤洗涤1。用镊子轻轻洗涤肿瘤,通过下方计时器使样本放置≥3分钟。记录洗涤时间(某分:某秒)。

8.3.14按照样品计划,准备生物负载样品。根据样品计划,将20.0mL(或可用体积)溶液从肿瘤样本瓶转移至50mL锥形瓶中。

8.3.15贴好标签,储存样品。贴上样品计划库存标签,将在步骤8.3.14收集的生物负载

样品储存在2℃至8℃下,直至提交进行检测。

8.3.16签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.3.17肿瘤洗涤2。使用一套新的镊子,将肿瘤从“洗涤1”皿中取出,转移至8.3.8中准备的“洗涤2”皿中。

8.3.18肿瘤洗涤2。用镊子轻轻搅动 ≥ 3 分钟以洗涤肿瘤样本,然后静置。记录时间。

8.3.19为所需肿瘤块准备肿瘤洗涤培养基液滴。使用移液管,将步骤8.3.9准备的锥形瓶的4滴单独的肿瘤洗涤培养基滴入上翻盖的6孔板(2个盖)的6个圆圈中的每个圆圈中。将一个额外的液滴放置在两个圆圈上,总计50滴。

8.3.20肿瘤洗涤3。使用镊子,将肿瘤从“洗涤2”皿中取出,转移至步骤8.3.8准备的“洗涤3”皿中。

8.3.21肿瘤洗涤3。用镊子轻轻搅动洗涤肿瘤样本,静置 ≥ 3 分钟。记录时间。

8.3.22准备肿瘤解剖皿。将尺子放在150mm培养皿盖下方。

8.3.23将肿瘤转移到解剖皿中。使用镊子,将肿瘤样本无菌转移至150mm解剖皿盖上。

8.3.24测量肿瘤。首尾相连排列所有肿瘤样品,记录大概的总长度和碎片数。给每个肿瘤样本拍摄清晰图片。

8.3.25评估肿瘤。评估肿瘤坏死/脂肪组织。评估肿瘤坏死组织/脂肪组织。评估是否观察到 $>30\%$ 的整个肿瘤区域是坏死组织和/或脂肪组织;如果是,联系区域管理确保肿瘤大小合适,然后进行步骤8.3.26。评估是否观察到 $<30\%$ 的整个肿瘤区域是坏死组织或脂肪组织;如果是,继续步骤8.3.27,不进行清理解剖。

8.3.26如果适用:清理解剖。如果肿瘤较大并且观察到 $>30\%$ 的组织外部为坏死/脂肪,则使用解剖刀和/或镊子的组合,通过切除坏死/脂肪组织进行“清理解剖”,同时保留肿瘤的内部结构。注:为了维持肿瘤的内部结构,仅使用垂直切割压力。不用解剖刀进行切锯动作。注:将脂肪组织、坏死组织和外来组织放在“不良”培养皿中。

8.3.27解剖肿瘤。使用解剖刀和/或镊子的组合,将肿瘤样品切成均匀的适当尺寸的碎片(最多6个中间碎片)。注:为了维持肿瘤的内部结构,只能使用垂直切割压力。不用解剖刀进行切锯动作。注:确保将未解剖的中间碎片完全浸没在(步骤8.2.4中制备的)“肿瘤洗涤培养基”中。

8.3.28转移中间肿瘤碎片。将步骤8.3.8的每个中间碎片转移到“保持”皿中。

8.3.29解剖肿瘤碎片。一次处理一个中间碎片,将解剖皿中的肿瘤中间碎片切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的小块,以使每块上的出血组织、坏死组织和/或脂肪组织的量最小。注:为了维持肿瘤的内部结构,仅使用垂直切割压力。不用解剖刀进行切锯动作。

8.3.30选择肿瘤块。选择至多八(8)个无出血组织、坏死组织和/或脂肪组织的肿瘤块。使用标尺作为参考。继续解剖,直至获得8个良好碎片,或整个中间碎片已被解剖。将每个选定的碎片转移至步骤8.3.19制备的“肿瘤洗涤培养基”的滴液之一中。

8.3.31储存中间碎片以防止干燥。从中间碎片中选择至多八(8)个小块后,将中间碎片的残余物放入步骤8.3.7中制备的“良好中间碎片”6孔板的新的单个孔中。注:将脂肪组织或坏死组织置于(步骤8.3.6制备的)“不良”皿中。

8.3.32重复中间碎片解剖。进行下一个中间碎片,重复步骤8.3.29至步骤8.3.31,直至所有中间碎片都被处理,视需要获得新鲜解剖刀和镊子。

8.3.33确定收集的块的数量。如果所需组织有剩余,则从“良好中间碎片”6孔板中选择另外的良好肿瘤块以填充液滴(最多50块)。记录产生的解剖小块总数。注:在整个解剖过程中,必要时确保用清洗培养基保持肿瘤中间碎片的水分。记录收集的解剖块总数。

8.3.34从培养箱中取出锥形管。从培养箱中取出“组织小块”50mL锥形管。在步骤8.1.29中记录时间。确保锥形管加热 ≥ 30 分钟。

8.3.35准备锥形管。将50mL锥形管“组织小块”放到BSC中,确保不损害开放处理表面的无菌性。

8.3.36将肿瘤碎片转移到50mL锥形管中。使用移液器、解剖刀、镊子或组合,将选定的50个最佳肿瘤碎片从合适的培养皿盖转移至“组织小块”50mL锥形管。注:如果肿瘤块在转移过程中掉落且所需组织保留,则应添加来自良好肿瘤中间碎片孔的其他小块。记录小块数量。

8.3.37准备BSC用于G-REX100MCS。从BSC取出用于容器接种的所有非必需物品,保留“良好组织”板(如果它们包含多余碎片)。

8.3.38从培养箱中取出含有培养基的G-Rex100MCS。从培养箱中取出含有培养基的G-Rex100MCS。完成步骤8.1.29。

8.3.39将烧瓶放入BSC。无菌通过G-Rex100MCS烧瓶进入BSC。注:转移烧瓶时,不要从容器的盖子或底部握住(容器)。通过握住容器的侧面来转移容器。注:处理G-Rex烧瓶时仅使用IPA WIPES。

8.3.40将肿瘤碎片加到G-Rex100MCS烧瓶中。在BSC中,举起G-Rex100MCS烧瓶盖子,确保内部管线保持无菌状态。旋转装有肿瘤块的锥形管以使肿瘤块悬浮,将内容物快速倒入G-Rex100MCS烧瓶。

8.3.41使肿瘤块均匀分布。确保肿瘤块均匀地分布在烧瓶的膜上。视需要,轻轻地前后摇动烧瓶以均匀分布肿瘤块。

8.3.42记录容器中肿瘤碎片的总数。记录容器的底部膜上的肿瘤碎片的数量和观察漂浮在容器中的肿瘤碎片的数量。注:如果接种的碎片数量不等于步骤8.3.36H收集的数量,联系区域管理,并且在第10.0节中记录。

8.3.43孵育G-Rex烧瓶。在以下参数下孵育G-Rex100MCS:孵育G-Rex烧瓶:温度LED显示屏: $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$; CO_2 百分比: $5.0\% \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

8.3.44计算孵育窗口。进行计算以确定在第11天取出G-Rex100MCS培养箱的适当时间。计算:孵育时间;下限=孵育时间+252小时;上限=孵育时间+276小时。

8.3.45环境监测。处理后,验证BSC和人员监控。

8.3.46丢弃材料。将剩余的未加热的培养基储存在 2°C 至 8°C ,贴好标签。处理完成后,弃去任何剩余的加热过的培养基和解冻的IL-2的等分试样。

8.3.47提交样品。确保将所有第0天的样品提交计入系统并以LIMS转移。

8.3.48检查8.3节。

8.4第11天-培养基制备

8.4.1检查房间、清洁、管线清除和材料。确认房间消毒、管线清除以及材料在有效期内。

8.4.2预处理表格。设备列表:BSC;天平;Sebra封管机;Gatherex™培养基取出和细胞

恢复设备；确保将提供的QA标示放在适当的BSC上；确保提供的QA标示批号和患者ID与批次记录中的批号和患者ID匹配。

8.4.3 监控培养箱。监控培养箱。培养箱参数：

温度LED显示屏： $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ； CO_2 百分比： $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。注：8.4节可与8.5节同时运行。

8.4.4 加热培养基。将3x1000mL RPMI 1640培养基 (W3013112) 瓶和3x1000mL AIM-V (W3009501) 瓶在培养箱中加热 ≥ 30 分钟。记录时间。培养基：RPMI 1640和AIM-V。注：将一个另外的1x1000ml的AIM-V培养基 (W3009501) 瓶放置在室温下，以用于步骤8.5.34。将瓶子标上“仅用于细胞计数稀释”和批次记录批号。

8.4.5 环境监测。进行处理前，确保按照SOP-00344进行预处理环境监控。

8.4.6 从培养箱中取出RPMI 1640培养基。当到达时间时，取出RPMI 1640培养基。在步骤8.4.4中记录结束孵育时间。确保将培养基加热 ≥ 30 分钟。

8.4.7 制备RPMI 1640培养基。在BSC中，从三个预热的1000mL RPMI 1640培养基瓶中各取100.0mL，放入尺寸合适的标有“废弃物”的容器中。

8.4.8 在BSC中，将试剂添加至RPMI 1640培养基瓶。在BSC中，将以下试剂添加至三个RPMI 1640培养基瓶中的每一个中，记录添加至每个瓶中的体积。GemCell人血清，热灭活的AB型 (100.0mL)，GlutaMax (10.0mL)，硫酸庆大霉素，50mg/mL (1.0mL)，2-巯基乙醇 (1.0mL)。

8.4.9 过滤培养基。盖上步骤8.4.8的瓶子，旋转以确保试剂充分混合。通过单独的1L 0.22微米过滤器过滤每瓶培养基。

8.4.10 给经过滤的培养基贴上标签。无菌地盖上过滤后的培养基，给每个瓶子贴上标签“CM1第11天培养基”。

8.4.11 解冻IL-2等分试样。解冻 $3 \times 1.1\text{mL}$ IL-2的等分试样 ($6 \times 10^6 \text{IU/mL}$) (BR71424)，直至所有冰解冻为止。记录IL2批号和有效期。注：确保已贴上IL-2标签。

8.4.12 从培养箱中取出AIM-V培养基。从培养箱中取出三瓶AIM-V培养基。记录步骤8.4.4中的结束孵育时间。确保培养基已加热 ≥ 30 分钟。

8.4.13 将IL-2添加到AIM-V中。在BSC中，使用微量移液器，将3.0mL解冻的IL-2加入一个1L瓶的预热AIM-V培养基中。加入IL-2后，用培养基冲洗微量移液器吸头。每个等分试样均使用新的无菌微量移液器吸头。记录添加的总体积。给瓶子贴上标签“含IL-2的AIM-V”。

8.4.14 转移材料。无菌转移10L Labtainer袋和中继泵转运装置到BSC中。

8.4.15 准备10L Labtainer培养基袋。关闭10L Labtainer袋上的所有管线。通过鲁尔锁连接将中继泵转运装置的较大直径的管端连接到10L Labtainer袋的中间母端口。

8.4.16 准备Baxa泵。将Baxa泵安装在BSC旁边。使转运装置管线通过位于BSC外部的Baxa泵。将Baxa泵设置为“高”和“9”。

8.4.17 准备10L Labtainer培养基袋。在BSC中，从泵送液体分配系统 (PLDS) 中取出注射器并丢弃。注：确保不损害PLDS移液器的无菌性。

8.4.18 准备10L Labtainer培养基袋。通过鲁尔连接件将PLDS移液管连接到中继泵流体转运装置的较小直径端，将移液管尖端放入含有IL-2的AIM-V培养基瓶 (在步骤8.4.13中制备) 中进行抽吸。打开培养基瓶和10L Labtainer之间的所有夹子。

8.4.19 将培养基泵入10L Labtainer。在BSC中，使用PLDS，将步骤8.4.13制备好的包含

IL-2的预热AIM-V培养基以及另外两个AIM-V瓶转移至10L Labtainer袋中。添加3瓶步骤8.4.10的经过滤的CM1第11天培养基。添加最后一瓶后,清除袋子连接的管线。注:在添加每瓶培养基之间停止泵。

8.4.20取下Labtainer袋的PLDS。从转运装置上取下PLDS,在BSC中管线的鲁尔接口上盖上一个红色的盖子。

8.4.21混合培养基。轻轻揉按袋子以使其混合。

8.4.22给培养基贴上标签。在BSC中,在培养基袋上贴上以下信息。到期日期为制备日期起的24小时。

8.4.23按照样品计划取样培养基。在BSC中,将60mL注射器连接到步骤8.4.22制备的“完全CM2第11天培养基”袋的可用母端口。取出20.0mL培养基,放入50mL锥形管中。在“完全CM2第11天培养基”袋的母端口上放一个红色盖子。

8.4.24贴好标签,储存样品。贴上样品计划库存标签,将培养基保留样品储存在2℃至8℃下,直至提交登录进行检测。

8.4.25签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.4.26密封转运装置管线。在BSC外,靠近红色盖子,热封(按照过程说明5.12)转运装置管线上的红色盖子。将转运装置保留在袋子上。

8.4.27准备细胞计数稀释管。在BSC中,向4个15mL锥形管中添加4.5mL标记有“用于细胞计数稀释”和批号的AIM-V培养基。用批号和管编号(1至4)标记管。将4个冻存管标上“饲养细胞”和管编号(1至4)。将管保存在BSC,用于步骤8.5.30。

8.4.28将试剂从BSC转移到2℃至8℃。将所有剩余的2-巯基乙醇、GlutaMax和人血清从BSC转移至2℃至8℃。确保所有试剂均贴有记录批号和按照过程注释5.9的适当有效期。

8.4.29准备1L转运包。在BSC外,将1L转运包连接(按照过程注释5.11)到连接至步骤8.4.22制备的“完全CM2第11天培养基”袋的转运装置上。给转运包标上“饲养细胞CM2培养基”和批号。

8.4.30准备1L转运包。在距离袋子几英寸的1L转运包管线的管线上做一个标记。将空的转运包放在天平上,使管线在天平上达到标记的点。

8.4.31去皮称重。将秤去皮,将空的转运包留在秤上。

8.4.32准备饲养细胞转运包。将Baxa泵设置为“中”和“4”。将步骤8.4.22中制备的 500.0 ± 5.0 mL的“完全CM2第11天”培养基泵入“细胞CM2培养基”转运包中。称重,记录添加至转运包中的完全CM2培养基的体积。

8.4.33热封管线。一旦填充,按照过程注释5.12热封管线。将带有转运装置的CM2第11天培养基袋与饲养细胞培养基转运包分开,保持连接朝向1L转运包。

8.4.34如果适用:孵育饲养细胞培养基转运包。如果适用,将“完全CM2第11天培养基”放置在培养箱中,直至用于步骤8.6.6。

8.4.35孵育完全CM2第11天培养基。将步骤8.4.22制备的“完全CM2第11天培养基”放入培养箱,直至用于步骤8.7.2。

8.4.36检查8.4节。

8.5第11天-TIL收获

8.5.1预处理表格。监控培养箱。培养箱参数:温度LED显示: $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$;CO₂百分

比: $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。注: 第8.5节可与第8.4节和第8.6节同时运行。

8.5.2从培养箱中取出G-Rex100MCS。从培养箱中取出G-Rex100MCS之前, 进行以下检查以确保符合培养参数。下限来自步骤8.3.44B。上限来自步骤8.3.44C。记录从培养箱取出的时间。确定: 是否 $8.3.44B \leq \text{从培养箱中取出的时间} < \text{步骤8.3.44C}$? * 如果否, 联系区域管理。小心地从培养箱中取出G-Rex100MCS, 确保除大型过滤器管线外, 所有夹子均已关闭。记录处理开始时间。

8.5.3准备300mL转运包。将300mL转运包标记为“TIL悬液”。

8.5.4准备300mL转运包。无菌连接(按照过程注释5.11)重力血液过滤器的TIL悬液转移(单线)。参见例如。

8.5.5准备300mL转运包。将300mL转运包放在天平上, 记录干重。

8.5.6准备1L转运包。标记1L转运包为“上清液”和批号。

8.5.7将转运包连接到G-Rex100MCS。(按照过程注释5.11)将来自G-Rex100MCS的红色培养基取出管线无菌连接到“上清液”转运包。将G-Rex100MCS的透明细胞取出管线无菌连接到与“TIL悬液”转运包相连的血液过滤器顶部的两个加标管线(spike line)之一。例如参见。

8.5.8 GatheRex设置。将G-Rex100MCS放置在GatheRex的左侧, 将“上清液”和“TIL悬液”转运包放置在GatheRex的右侧。

8.5.9 GatheRex设置。将G-Rex100MCS的红色培养基取出管线安装到GatheRex上的顶部夹子(标有红色线)和导管。将G-Rex100MCS的透明收获管线安装到GatheRex上的底部夹子(标有蓝色线)和导管。

8.5.10 GatheRex设置。将来自GatheRex的气体管线连接到G-Rex100MCS烧瓶的无菌过滤器上。注: 从G-Rex100MCS烧瓶中取出上清液之前, 确保关闭细胞取出管线上的所有夹子。

8.5.11减少G-Rex100MCS体积。将约900mL培养上清液从G-Rex100MCS转移至1L转运包中。目视检查G-Rex100MCS烧瓶, 以确保烧瓶处于水平状态且培养基已减少至抽吸汲取管的末端。注: 如果Gatherex过早停止, 则可通过再次按下向右箭头按钮来重启。

8.5.12准备烧瓶, 收获TIL。在取出上清液之后, 关闭至红色管线的所有夹子。

8.5.13开始收获TIL。记录TIL收获的开始时间。

8.5.14开始收获TIL。用力敲击烧瓶并旋转培养基以释放细胞。检查烧瓶以确保所有细胞均已分离。注: 如果细胞未分离, 联系区域管理。

8.5.15开始收获TIL。将烧瓶向远离收集管倾斜, 使肿瘤块沿边缘沉降。向收集管缓慢倾斜烧瓶, 使碎片留在烧瓶的另一侧。注: 如果细胞收集管不在壁和底部膜的交界处, 将烧瓶倾斜 45° 角度同时敲击烧瓶通常足以使管正确放置。

8.5.16收获TIL。释放通往TIL悬液转运包的所有夹子。

8.5.17收获TIL。使用GatheRex, 将细胞悬液通过血液过滤器转移至300mL转运包中。注: 保持边缘倾斜, 直至收集到所有细胞和培养基。

8.5.18收获TIL。检查膜上是否有贴壁细胞。

8.5.19冲洗烧瓶膜。冲洗G-Rex100MCS的底部。用洗涤培养基覆盖约 $1/4$ 的气体交换膜。注: 如果肿瘤块阻塞收获管线, 按下细胞收集管线上的“X”以暂停收集。按下Gatherex上的“释放夹子”按钮, 拿起转运包, 用逐渐增加的压力轻轻挤压, 直至碎片被移除。请勿过分挤

压袋子,否则可能会导致管线或袋子破裂。清除障碍物后,继续收集。

8.5.20关闭G-Rex100MCS的夹子。确保所有夹子均已关闭。

8.5.21热封。(按照过程注释5.12)在尽可能靠近连接处将TIL悬液转运包热封,以使总管长度保持大致相同。

8.5.22热封。按照过程注释5.12热封“上清液”转运包。保持足够的线进行连接。

8.5.23计算TIL悬液体积。记录TIL悬液转运包的重量,计算细胞悬液的体积。

8.5.24准备用于取样的上清液转运包。将4英寸血浆转运装置连接(按照过程注释5.11)到“上清液”转运包上,将鲁尔连接件保持在4英寸血浆转运装置上,然后转移至BSC中。

8.5.25准备用于取样的TIL悬液转运包。将4英寸血浆转运装置连接(按照过程注释5.11)到300mL“TIL悬液”转运包上,将鲁尔连接件保持在4英寸血浆转运装置上,然后转移至BSC中。

8.5.26抽取Bac-T样品。在BSC中,使用适当尺寸的注射器,从1L“上清液”转运包中吸取约20.0mL上清液,然后加到标有“Bac-T”的50mL无菌锥形管中。保存在BSC,用于步骤8.5.27。

8.5.27按照样品计划接种BacT。使用适当尺寸的注射器,从标记有BacT(步骤8.5.26制备)的50mL锥形管中取出1.0mL样品,接种厌氧瓶。在瓶子标签上留下的空白处记录瓶子的接种时间。好氧瓶重复以上操作。注:此步骤可不按顺序进行。

8.5.28贴好标签,储存样品。贴上样品计划库存标签,在室温下保存Bac-T样品,避光,直至根据样品计划提交登录进行检测。注:不要让标签挡住瓶子上的条形码。

8.5.29签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.5.30对样品进行TIL细胞计数。用瓶号(1至4)标记4个冻存管。使用单独的3mL注射器,使用鲁尔连接件从TIL悬液转运包中提取4x1.0mL细胞计数样品,放置在各自的冻存管中。

8.5.31关闭鲁尔接头。在管线上放一个红色盖子(W3012845)。

8.5.32孵育TIL。TIL转运包放置在培养箱中,直至需要。

8.5.33进行细胞计数。使用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。对未稀释的初始细胞进行计数。

8.5.34记录细胞计数的样品体积。注:如果无需稀释,则“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0。

8.5.35确定乘法因数(Multiplication Factor)。总细胞计数样品体积:8.5.34A+8.5.34B。乘法因数 $C \div 8.5.34A$ 。

8.5.36选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0。

8.5.37记录文件名、活力和Nucleoview的细胞计数。

8.5.38确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。活力: $(8.5.37A+8.5.37B) \div 2$ 。活细胞浓度: $(8.5.37C+8.5.37D) \div 2$ 。

8.5.39确定计数的上限和下限。下限: $8.5.38F \times 0.9$ 。上限: $8.5.38F \times 1.1$ 。

8.5.40两个计数均在可接受范围内吗?下限: $8.5.37C+8.5.37D \geq 8.5.39G$ 。上限:

8.5.37C+8.5.37D $\leq$ 8.5.39H。*如果任一结果为“否”，则在步骤8.5.41至步骤8.5.48进行第二组计数*。

8.5.41如果适用：进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。
注：根据预期细胞浓度调整稀释度。

8.5.42如果适用：记录细胞计数的样品体积。

8.5.43如果适用：确定乘法因数。总细胞计数样品体积：8.5.42A+8.5.42B。乘法因数C $\div$ 8.5.42A D

8.5.44如果适用：选择方案，输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案，已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注：如果无需稀释，输入“样品[μ L]”=200，“稀释[μ L]”=0。

8.5.45如果适用：从Nucleoview记录细胞计数

8.5.46如果适用：确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。确定平均活细胞浓度。

8.5.47如果适用：确定计数的上限和下限。下限：8.5.46F $\times$ 0.9。上限：8.5.46F $\times$ 1.1。

8.5.48如果适用：计数是否在可接受范围内？下限：8.5.45C+8.5.45D $\geq$ 8.5.47G。上限：8.5.45C+8.5.45D $\leq$ 8.5.47H。注：如果结果为“否”，进行步骤8.5.49，确定平均值。

8.5.49如果适用：由进行的所有4个计数来确定平均活细胞浓度。平均活细胞浓度：(A+B+C+D) $\div$ 4=平均值

8.5.50调整TIL悬液体积。计算取出细胞计数样品后TIL悬液的调整体积。步骤8.5.23C (A)的TIL细胞总体积。取出的细胞计数样品的体积(4.0ml) (B)。调整后的TIL细胞总体积C=A-B。

8.5.51计算活TIL细胞总数。平均活细胞浓度*：8.5.38F*或8.5.46F*或*8.5.49E*；总体积：8.5.50；活细胞总数：C=A $\times$ B。*圈出步骤参考用于确定活细胞浓度。注：如果“活TIL细胞总数”少于 5×10^6 个细胞，联系“区域管理”，进行步骤8.7.1。如果“活TIL细胞总数” $> 5 \times 10^6$ ，进行步骤8.5.52。

8.5.52流式细胞术计算。如果步骤8.5.51C的活TIL细胞总数 $\geq 4.0 \times 10^7$ ，计算获得流式细胞术样品有 1.0×10^7 个细胞的体积。*如果细胞数 $< 4.0 \times 10^7$ ，则N/A表中的其余字段。进行步骤8.7.1。流式细胞术所需的活细胞总数： 1.0×10^7 个细胞。流式细胞术所需的细胞体积：8.5.51的活细胞浓度/ 1.0×10^7 细胞A。

8.5.53如果适用：从培养箱中取出TIL。从培养箱中取出TIL悬液并记录步骤8.5.32中的最终培养时间。

8.5.54如果适用：根据“样品计划”取出流式细胞术样品。使用适当尺寸的注射器，从TIL悬液转运包中取出用于对样品进行表型分析的计算体积(8.5.52C)，放入50mL锥形管中。

8.5.55如果适用：标记并储存流式细胞术样品。贴上样品计划库存标签，在2℃至8℃下储存流式细胞术样品，直至根据样品计划提交登录进行检测。

8.5.56签名，取样。确保完成LIMS样品计划表，取出样品。

8.5.57如果适用：重新计算活细胞总数和体积流量。计算取出下面的细胞计数样品后的剩余活细胞总数和剩余体积。

参数	公式	结果
活 TIL 总数	步骤 8.5.51C	A. 个细胞
取出的 TIL 用于流式细胞术	1×10^7 细胞	B. 1×10^7 个细胞
剩余活 TIL 总数	$C=A-B$	C. 个细胞
TIL 体积	步骤 8.5.50C	D. mL
取出的 TIL 体积	步骤 8.5.52 C	E. mL
剩余的 TIL 体积	$F=D-E$	F. mL

8.5.58如果适用:计算TIL体积。计算等于 2.0×10^8 个活细胞的TIL悬液体积。

所需活细胞总数	步骤 8.5.51A 的活细胞浓度	含 2.0×10^8 个活细胞的 TIL 悬液体积 $C=A \div B$
A. 2.0×10^8 个细胞	B. 个细胞/mL	C. mL

8.5.59如果适用:计算要取出的TIL体积,计算要取出的过量TIL体积。

步骤 8.5.57F TIL 悬液总体积	步骤 8.5.58C 含 2.0×10^8 个 TIL 的悬液体积	要取出的 过量 TIL 体积 $C=A-B$
A. mL	B. mL	C. mL

8.5.60如果适用:取出过量TIL。在BSC中,使用适当尺寸的注射器,从TIL悬液转运包取出计算体积(步骤8.5.59C)。注:请勿多次使用注射器。如果适用,使用多个注射器。放在适当尺寸的无菌容器中,贴上日期和批号标签。在“TIL悬液”转运包管线上放一个红色盖子。

8.5.61如果适用:将TIL放在培养箱中。将TIL悬液转运包放在培养箱中,直至需要。记录时间。

8.5.62如果适用:计算。计算取出的过量TIL的总数。步骤8.5.51A从步骤8.5.59C取出的TIL体积。计算取出的过量TIL的总数。

步骤 8.5.51A 活细胞浓度	步骤 8.5.59C 要取出的 TIL 体积	取出的过量 TIL 的 总数 $C=A \times B$
A. 个细胞/mL	B. mL	C. 个细胞

8.5.63如果适用:计算。计算要添加到步骤8.5.62C的过量TIL细胞中的CS-10培养基的量。冷冻的目标细胞浓度为 1.0×10^8 个细胞/mL。

步骤 8.5.62C 取出的过量 TIL 的总数	冷冻的目标浓度	要添加的 CS-10 体积 (mL) $C=A \div B$
A. 个细胞	B. 1.0×10^8 个细胞/mL	C. mL

8.5.64如果适用:离心过量TIL。离心过量TIL细胞悬液。速度: $350 \times g$ 。时间:10:00分钟。温度:环境。制动:全速(9)。加速:全速(9)。

8.5.65如果适用:观察锥形管。记录观察结果:是否观察到沉淀?上清液是否清澈?*注:如果答案为否,联系区域管理。

8.5.66如果适用:添加CS-10。在BSC中,无菌地吸出上清液。轻轻拍打试管底部,将细胞重悬在剩余液体中。

8.5.67如果适用:添加CS10。缓慢添加步骤8.5.63C中计算的CS10体积。

8.5.68如果适用:标记小管。用QA提供的标签标记管。贴上样品标签。

8.5.69如果适用:填充小管。将1.0mL细胞悬液等分到适当尺寸的冻存管中。注:过量TIL填充不超过10个小管。

8.5.70如果适用:填充小管。根据SOP-00242,将剩余体积等分到适当尺寸的冻存管中。如果体积 $\leq 0.5\text{mL}$,则将CS10加到小管中,直至体积为0.5mL。

8.5.71如果适用:填充小管。用1.0mL CS10填充一个小管,标记为“空白”。

8.5.72如果适用:记录已填充的小管的数量。记录以下已填充的小管的数量,不包括空白。

8.5.73如果适用:监测环境。处理后,对BSC和人员监控进行验证。

样品的TIL冷冻保存

8.5.74如果适用:计算冷冻保存的体积。计算获得用于冷冻保存的 1×10^7 个细胞所需的细胞体积。

冷冻保存所需的 活 TIL 总数	步骤 8.5.51A 活细胞浓度	冷冻保存所需的细胞 体积 $C=A \div B$
A. 1×10^7 个细胞	B. 个细胞/mL	C. mL

8.5.75如果适用:取出样品进行冷冻保存。在BSC中,使用适当尺寸的注射器,从“TIL悬液”转运包中取出计算的体积(步骤8.5.74C)。放入适当尺寸的锥形管中,贴上“冷冻保存样品 1×10^7 个细胞”、日期和批号。在TIL悬液转运包上放一个红色盖子(W3012845)。

8.5.76如果适用:将TIL放在培养箱中。将TIL悬液转运包放在培养箱中,直至需要。

8.5.77如果适用:冷冻保存样品。根据以下参数将“冷冻保存样品 1×10^7 细胞”离心:速度: $350 \times g$,时间:10:00分钟,温度:环境,制动:全速(9);加速:全速(9)。注:确保离心机的速度和时间设置的单位适当。

8.5.78如果适用:观察锥形管。记录观察结果:是否观察到沉淀?上清液是否清澈?*注:如果答案为否,联系区域管理。

8.5.79如果适用:添加CS-10。在BSC中,无菌地吸出上清液。轻轻拍打试管底部,将细胞重悬在剩余液体中。

8.5.80如果适用:添加CS-10。缓慢加入0.5mL CS10。记录添加的体积。

8.5.81如果适用:标记小管。用QA签发标签标记小管。

8.5.82如果适用:填充小管。将重悬体积等分到标记的冻存管中。

8.5.83如果适用:填充空白。用0.5mL CS10填充另一个小管,标记为“空白”。

8.5.84如果适用:记录填充的小管的数量,不包括“空白”。冷冻保存样品小管装入约0.5mL。

8.5.85如果适用:环境监测。处理后,确认已进行BSC和人员监控。

8.5.86检查8.5节

8.6第11天-饲养细胞

8.6.1获得饲养细胞。从LN2冷冻机中获得3袋具有至少两个不同批号的饲养细胞。将细胞保存在干冰上,直至准备解冻。注:8.6节可与8.5节同时进行。

8.6.2获得饲养细胞。记录饲养细胞信息。确认获得了至少两个不同批次的饲养细胞。

8.6.3准备水浴或低温浴。准备用于饲养细胞解冻的水浴或低温浴。

8.6.4根据批号将饲养细胞袋放入单个拉链封口袋中,37.0℃±2.0℃水浴或低温浴约3至5分钟来解冻,或直至冰刚刚消失。用计时器记录解冻时间。

8.6.5饲养细胞线束准备。将4S-4M60(按照过程注释5.11)连接到CC2 Cell Connect (W3012820),在G处,用4S-4M60歧管的4个尖嘴端代替Cell Connect装置(B)的单个尖嘴。将H连接到G。

8.6.6如果适用:从培养箱中取出培养基。从培养箱中取出在步骤8.4.34准备的饲养细胞CM2培养基转运包。

8.6.7附加培养基转运包。将“饲养细胞CM2培养基”转运包(按照过程注释5.11)连接到CC2鲁尔接口上。注:通过无针注射口将袋子连接到线束的侧面。

8.6.8转移线束。将包含完全CM2第11天培养基的组件转移至BSC中。

8.6.9合并解冻的饲养细胞。在BSC内,将10mL的空气吸入100mL注射器中。用它来替换CC2上的60mL注射器。

8.6.10合并解冻的饲养细胞在取下盖子之前,先用酒精棉片擦拭饲养细胞袋上的每个端口。使用CC2的三个尖嘴刺入三个饲养细胞袋。注:保持恒定压力,同时沿一个方向旋转尖嘴。确保不要刺穿端口的侧面。

8.6.11合并解冻的饲养细胞。打开旋塞阀,以便打开从饲养细胞袋中取出的管线,关闭通往无针注射口的管线。

8.6.12合并解冻的饲养细胞。将饲养细胞袋的内容物吸进注射器。立刻排干全部三个袋子。排干饲养细胞袋后,在保持注射器压力的同时,夹住饲养细胞袋上的管线。

8.6.13记录饲养细胞体积。不要将下面的注射器从线束拆掉。记录注射器中饲养细胞的总体积。

8.6.14将饲养细胞添加至转运包。转动旋塞阀,以关闭通往饲养细胞袋的管线,打开通往培养基转运包的管线。确保未松开到培养基转运包的管线。

8.6.15将注射器中的饲养细胞加到“饲养细胞CM2培养基”转运包中。夹住包含饲养细胞的转运包的管线,将注射器留在线束上。

8.6.16混合合并的饲养细胞。揉按袋子以混合转运包中合并的饲养细胞。

8.6.17标记转运包。将袋子标为“饲养细胞悬液”。

8.6.18计算转运包中的总体积,计算饲养细胞悬液的总体积。

8.6.19取出细胞计数样品。对每个样品使用单独的3mL注射器,使用无针注射口从饲养细胞悬液转运包中提取4×1.0mL细胞计数样品。将每个样品等分到步骤8.4.27标记的冻存

管中。注：在每次细胞计数取样之间，用无菌酒精棉片 (W3009488) 擦拭不需要的注射端口，混合饲养细胞悬液。

8.6.20进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。通过将0.5mL 细胞悬液添加至标有批号和“用于细胞计数稀释”的4.5mL AIM-V培养基中，稀释细胞计数样品。这将产生1:10的稀释度。必要时进行调整。

8.6.21记录细胞计数的样品体积。

8.6.22确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	8.6.21A+8.6.21B	C. μL
乘法因数	$C \div 8.6.21A$	D.

8.6.23选择方案，输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案，已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。

8.6.24记录文件名、活力和Nucleoview的细胞计数。

8.6.25确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.6.24A+8.6.24B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.6.24C+8.6.24D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.6.26确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.6.25F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.6.25F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.6.27两个计数均在可接受范围内吗？

参数	公式	结果 (是/否)
下限	$8.6.24C+8.6.24D \geq 8.6.26G$	
上限	$8.6.24C+8.6.24D \leq 8.6.26H$	

注：如果任一结果为“否”，则在步骤8.6.28至步骤8.6.35进行第二组计数

8.6.28如果适用：进行细胞计数。按照SOP-00314和过程注释5.14，利用NC-200进行细胞计数和计算。注：稀释可根据预期细胞浓度进行调整。

8.6.29如果适用：记录细胞计数的样品体积。注：如果无需稀释，输入“样品[μL]”=200，“稀释[μL]”=0。

8.6.30如果适用：确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	8.6.29A+8.6.29B	C. mL
乘法因数	$C \div 8.6.29A$	D.

8.6.31选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0。

8.6.32如果适用:从Nucleoview记录细胞计数

8.6.33如果适用:确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.6.32A + 8.6.32B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.6.32C + 8.6.32D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.6.34如果适用:确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.6.33F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.6.33F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.6.35如果适用:计数是否在可接受范围内?

参数	公式	结果(是/否)
下限	$8.6.32C + 8.6.32D \geq 8.6.34G$	
上限	$8.6.32C + 8.6.32D \leq 8.6.34H$	

注:如果任一结果为“否”,则进行步骤8.6.36,找到总的平均活细胞浓度,进行计算。

8.6.36如果适用:由进行的所有4个计数确定平均活细胞浓度。

8.6.37调整饲养细胞悬液的体积。取出细胞计数样品后,计算调整后的饲养细胞悬液体积。由步骤8.6.18C的总饲养细胞体积减去4.0mL。

8.6.38计算活饲养细胞的总数。

参数	公式	结果
平均活细胞浓度*	8.6.25 F*或 8.6.33 F*或 8.6.36 E*	A. 个细胞/mL
总体积	8.6.37 C	B. mL
活细胞总数	A×B	C. 个细胞

如果活细胞总数小于 5×10^9 ,继续步骤8.6.39。如果活细胞总数 $\geq 5 \times 10^9$,则进行步骤8.5.70。

8.6.39如果适用:获得另外的饲养细胞。从LN₂冰箱获得另外一袋饲养细胞。将细胞放在干冰上,直至准备解冻。

8.6.40如果适用:获得另外的饲养细胞。记录饲养细胞信息。

8.6.41如果适用:解冻另外的饲养细胞。将第4个饲养细胞袋放入拉链封口袋中,在 $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 水浴或Cytotherm中解冻约3-5分钟,或直至冰刚刚消失。记录解冻时间。

8.6.42如果适用:合并另外的饲养细胞。在BSC中,将10mL空气吸入一个新的100mL注射器中。用它来更换线束上的注射器。

8.6.43如果适用:合并另外的饲养细胞,然后用酒精棉片擦拭饲养细胞袋的端口,然后再取下盖子。使用在步骤8.6.7中准备的线束的剩余尖嘴之一刺入饲养细胞袋。注:保持恒定压力,同时沿一个方向旋转尖嘴。确保不要刺穿端口的侧面。

8.6.44如果适用:合并另外的饲养细胞。打开旋塞阀,从而打开饲养细胞袋的管线,关闭不需要注射口的管线。

8.6.45如果适用:合并另外的饲养细胞。将饲养细胞袋的内容物吸进注射器。记录体积。

8.6.46如果适用:测量体积。测量注射器中饲养细胞的体积,记录在下面(B)。计算饲养细胞的新的总体积。

步骤 8.6.37C 饲养细胞体积	步骤 8.6.45 饲养细胞体积	饲养细胞总体积 $C=A+B$
A. mL	B. mL	C. mL

8.6.47如果适用:将饲养细胞添加到转运包中。转动旋塞阀,关闭通往饲养细胞袋的管线,打开通往“饲养细胞悬液”转运包的管线。确保未打开转运包的管线。将注射器中的饲养细胞分配到“饲养细胞悬液”转运包中。将管线夹在转运包上,将注射器留在线束上。

8.6.48如果适用:将饲养细胞添加到转运包中。揉按袋子,混合饲养细胞悬液转运包中的合并的饲养细胞。

8.6.49如果适用:制备稀释液。在BSC中,将4.5mL标有“用于细胞计数稀释”和批号的AIM-V培养基添加到4个15mL锥形管中。用批号和小管编号(1至4)标记管。给4个冻存管标上“另外的饲养细胞”和小管编号(1至4)。

8.6.50如果适用:准备细胞计数。对每个样品使用单独的3mL注射器,使用不需要的进样口从饲养细胞悬液转运包中取出 4×1.0 mL细胞计数样品。将每个样品等分到步骤8.6.49中标记的冻存管中。注:用无菌酒精棉片擦拭不需要的注射端口,在每次取样之间混合饲养细胞悬液以进行细胞计数。

8.6.51如果适用:进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。通过将0.5mL细胞悬液添加到4.5mL标有批号和“用于细胞计数稀释”的AIM-V培养基中,稀释细胞计数样品。这将产生1:10的稀释度。必要时进行调整。

8.6.52如果适用:记录细胞计数的样品体积。

8.6.53如果适用:确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	$8.6.52A+8.6.52B$	C. μL
乘法因数	$C \div 8.6.52A$	D.

8.6.54如果适用:选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。

8.6.55如果适用:记录文件名、活力和Nucleoview的细胞计数。

8.6.56如果适用:确定活细胞浓度的平均值和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.6.55A+8.6.55B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.6.55C+8.6.55D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.6.57如果适用:确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.6.56F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.6.56F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

两者均在可接受范围内吗?注:如果任一结果为“否”,则在步骤8.5.59至步骤8.5.65进行第二组计数。

8.6.59如果适用:进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。注:稀释可根据预期细胞浓度进行调整。

8.6.60如果适用:记录细胞计数的样品体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0

8.6.61如果适用:确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	$8.6.60A + 8.6.60B$	C. μL
乘法因数	$C \div 8.6.60A$	D.

8.6.62如果适用:选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0

8.6.63如果适用:从Nucleoview记录细胞计数。

8.6.64如果适用:确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.6.63A + 8.6.63B) \div$	E. %
活细胞浓度	$(8.6.63C + 8.6.63D) \div$	F. 个细胞/mL

8.6.65如果适用:确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.6.64F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.6.64F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.6.66如果适用:计数是否在可接受范围内?

参数	公式	结果(是/否)
下限	$8.6.63C \text{ 和 } D \geq 8.6.65G$	
上限	$8.6.63C \text{ 和 } D \leq 8.6.65H$	

注:如果任一结果为“否”,则进行步骤8.6.67,找到总的平均活细胞浓度,进行计算。

8.6.67如果适用:由进行的所有4个计数确定平均活细胞浓度。

8.6.68如果适用:调整饲养细胞悬液的体积。取出细胞计数样品后,计算调整后的饲养细胞悬液体积。用步骤8.6.46C的总饲养细胞体积减去4.0mL。

8.6.69如果适用:计算活饲养细胞的总数。

参数	公式	结果
平均活细胞浓度*	8.6.56 F*或 8.6.64 F*或 8.6.67 E*	A. 个细胞/mL
总体积	8.6.68 C	B. mL
活细胞总数	A×B	C. 个细胞

*圈出用于确定活细胞浓度的参考步骤。

8.6.70计算饲养细胞的体积。计算获得 5×10^9 个活饲养细胞所需的饲养细胞悬液的体积。

所需饲养细胞数量	步骤 8.6.38A*或 步骤 8.6.69A*的 活细胞浓度	饲养细胞的体积 = 5×10^9 个活细胞 C=A÷B
A. 5×10^9 个活细胞	B. 个细胞/mL	C. mL

*圈出适用步骤

8.6.71计算过量饲养细胞的体积。计算要取出的过量饲养细胞的体积。向下舍入到最近的整数。

*圈出适用步骤

步骤 8.6.46C*或 步骤 8.6.68C*的 转运包中饲养细胞 的总体积	步骤 8.6.70C 饲养细胞数= 5×10^9 个活细胞 的体积	取出的过量饲养细胞 (活细胞)的体积 C=A-B
A. mL	B. mL	C. mL

8.6.72取出过量的饲养细胞。在新的100mL注射器中,吸出10mL空气,将注射器连接到线束上。

8.6.73取出过量的饲养细胞。打开“饲养细胞悬液”转运包的管线。使用注射器吸取步骤8.6.71C计算出的饲养细胞体积,再从转运包中将另外的10.0mL放入100mL注射器中。取出饲养细胞体积后,关闭通往饲养细胞悬液转运包的管线。不要卸下最终注射器。注:注射器装满后,换上新的注射器。可使用多个注射器取出总体积。每个新注射器都吸入10mL空气。

8.6.74记录体积。记录取出的饲养细胞的总体积(包括另外的10mL)。

8.6.75添加OKT3。在BSC中,使用1.0mL注射器和16G针头吸取0.15mL OKT3。

8.6.76添加OKT3。从注射器上无菌地取下针头,将注射器连接到无针注射口上。注入OKT3。

8.6.77添加OKT3。打开旋塞阀进入“饲养细胞悬液”转运包,添加10mL步骤8.6.73取出的饲养细胞以冲洗OKT3。

8.6.78添加OKT3。将注射器上下颠倒并推动空气通过,以清除通往饲养细胞悬液转运包的管线。

8.6.79添加OKT3。将剩余的饲养细胞悬液留在注射器中。关闭所有夹子,然后从BSC上拆下线束。

8.6.80热封。热封(按照过程注释5.12)饲养细胞悬液转运包,留下足够的管线进行连接。丢弃线束。

8.6.81检查8.6节

8.7第11天G-Rex填充和接种

8.7.1设置G-Rex500MCS。在BSC外,从包装中取出G-Rex500MCS,检查烧瓶中是否有任何裂纹或扭结。确保所有鲁尔连接件和密封件都拧紧。关闭除排气过滤器管线之外的所有G-Rex500MCS管线上的夹子。使用记号笔在4.5L刻度处画一条线。

8.7.2从培养箱中取出培养基。从培养箱中取出步骤8.4.35制备“完全CM2第11天培养基”。

8.7.3准备泵送培养基。将G-Rex500MCS的红色管线(按照过程注释5.11)连接到与完全CM2第11天培养基相连的中继泵转运装置上。

8.7.4准备泵送培养基。将“完全CM2第11天培养基”袋挂在输液架上。通过Baxa泵进料泵管。

8.7.5将培养基泵入G-Rex500MCS。将Baxa泵设置为“高”和“9”。将4.5L培养基泵入G-Rex500MCS,填充至步骤8.7.1中标记的烧瓶刻度处。

8.7.6热封。将步骤8.7.3产生的连接附近的G-Rex500MCS红色管线热封(按照过程注释5.12)。

8.7.7给烧瓶贴上标签。在烧瓶上贴上“第11天”标签。给样品贴上过程中的“第11天QC”标签。

8.7.8如果适用:孵育烧瓶。直至用TIL接种时放在培养箱中。

8.7.9连接饲养细胞:将悬液转运包接到烧瓶。将G-Rex500MCS的红色管线无菌连接(按照过程注释5.11)到“饲养细胞悬液”转运包。

8.7.10向G-Rex500MCS添加饲养细胞。打开饲养细胞悬液和G-Rex500MCS之间的所有夹子,通过重力进料将饲养细胞悬液添加至烧瓶中。确保线路已完全清除。

8.7.11热封。热封(按照过程注释5.12)步骤8.7.9创建的连接附近的红色管线。

8.7.12将TIL悬液转运包连接到烧瓶上。将G-Rex500MCS的红色管线无菌连接(按照过程注释5.11)到“TIL悬液”转运包。

8.7.13向G-Rex500MCS添加TIL。打开TIL悬液和G-Rex500MCS之间的所有夹子,通过重力进料将TIL悬液添加至烧瓶中。确保线路已完全清除。

8.7.14热封。热封(按照过程注释5.12)步骤8.7.12创建的连接附近的红色管线,取出TIL悬液袋。

8.7.15孵育G-Rex500MCS。检查是否已关闭G-Rex500MCS上除大型过滤器管线之外的所有夹子,放置在培养箱中。培养箱参数:温度LED显示: $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, CO_2 百分比: $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

8.7.16计算孵育窗口。进行计算以确定在第16天从培养箱中取出G-Rex500MCS的正确时间。孵育时间(步骤8.7.15)。下限:培养时间+108小时。上限:孵育时间+132小时。

8.7.17环境监测。处理后,对BSC和人员监控进行验证。

8.7.18提交样品。提交样品登录。

8.7.19检查8.7节。

- 8.8第11天,冷冻保存过量的TIL

8.8.1如果适用:冻结过量的TIL瓶。冻结之前,已设置验证CRF。进行冷冻保存。

8.8.2如果适用:启动CRF。记录放入CRF中的瓶的总数(不包括空白)。验证转移到CRF中的样品瓶的数量是否与步骤8.5.72或步骤8.5.84或步骤8.5.72C或步骤8.5.84中准备的样品瓶总数匹配。

8.8.3如果适用:开始冷冻方案的自动部分。记录开始时间,启动冷冻方案的自动部分。

8.8.4如果适用:将小管从控速冷冻机转移到适当的储存容器中。冷冻完成后,将小管从CRF转移至适当的储存容器中。

8.8.5如果适用:将小管转移到适当的储存容器中。记录在LN2中的储存位置。

8.8.6检查8.8节

8.9第16天,制备培养基

8.9.1预热AIM-V培养基。至少在使用前12小时从2℃至8℃取出3个CTS AIMV 10L培养基袋,在室温下避光放置。确认每个袋子均在有效期内。在每个袋子上贴上袋子编号(1至3)、批号、日期和“加热开始时间:某时某分”。记录预热开始时间和日期。

8.9.2计算时间。加热步骤8.9.1的培养基。由步骤8.9.1计算培养基袋1、2和3的加热时间。确保将所有袋子加热12到24小时。

8.9.3检查房间消毒、管线清除和材料。确认房间消毒、管线清除和材料。

8.9.4确保完成预处理表格。

8.9.5环境监测。进行处理前,确保已开始进行预处理环境监控。

8.9.6设置10L Labtainer用于上清液。在BSC中,用鲁尔连接件将流体泵转运装置的较大直径的一端连接到10L Labtainer袋的母端口之一。

8.9.7设置10L Labtainer用于上清液。标为“上清液”和批号。

8.9.8设置10L Labtainer用于上清液。在从BSC上卸下之前,确保所有夹子都已关闭。注:TIL收获(8.10节)期间使用上清液袋,其可与培养基制备同时进行。

8.9.9解冻IL-2。每个CTS AIM V培养基袋解冻5x1.1mL的IL-2等分试样(6×10^6 IU/mL)(BR71424),直至所有冰融化。记录IL-2批号和有效期。贴上IL-2标签。

8.9.10等分GlutaMax。在BSC中,将100.0mL的Glutamax分装到适当大小的接收容器中。记录添加至每个接收容器的体积。注:按照步骤8.9.10至步骤8.9.28,最初制备一袋AIM-V培养基。步骤8.10.59确定了所需的其他袋子。

8.9.11标记接收容器。将每个接收容器标记为“GlutaMax”。

8.9.12将IL-2添加至GlutaMax。用微量移液器向每个GlutaMax接收器中加入5.0mL IL-2。确保按照操作说明5.18冲洗吸头,针对添加的每毫升使用新的移液器吸头。记录添加至每个Glutamax接收容器的体积。

8.9.13标记接收容器。将每个接收器标记为“GlutaMax+IL-2”和接收容器编号。

8.9.14准备用于制剂的CTS AIM V培养基袋。确保在使用前在室温下加热CTS AIM V 10L培养基袋(W3012717)并避光放置12至24小时。在步骤8.9.2记录结束孵育时间。

8.9.15准备用于制剂的CTS AIM V培养基袋。在BSC中,关闭4英寸血浆转运装置上的夹

子,然后使用尖嘴端口(spike port)将夹子连接到袋子。注:保持恒定压力,同时沿一个方向旋转尖嘴。确保不要刺穿端口的侧面。

8.9.16准备用于制剂的CTS AIM V培养基袋。通过鲁尔接口将中继泵流体转运装置的较大直径端连接到4英寸血浆转运装置。

8.9.17安装Baxa泵。将Baxa泵安装在BSC旁。从BSC取出中继泵流体转运装置的泵管部分,将其安装在中继泵中。

8.9.18准备配制培养基。在BSC中,将注射器从泵送液体分配系统(PLDS)中移除并丢弃。注:确保不损害PLDS移液器的无菌性。

8.9.19准备配制培养基。通过鲁尔连接件将PLDS移液器连接到中继泵流体转运装置的较小直径端,将移液器吸头置于步骤8.9.13中制备的“GlutaMax+IL-2”中,用于抽吸。打开接收器和10L袋之间的所有夹子。

8.9.20将GlutaMax+IL-2泵入袋中。将泵速设为“中”和“3”,将所有“GlutaMax+IL-2”泵入10L CTS AIM V培养基袋中。一旦无溶液残留,清理管线并停止泵。记录添加至下面每个Aim V袋中的含IL-2的GlutaMax的体积。

8.9.21移除PLDS。确保关闭所有夹子,从中继泵流体转运装置上卸下PLDS移液器。卸下中继泵流体转运装置,盖上4英寸血浆转运装置的红色盖子。

8.9.22标记袋子。标记每个制备好的“完全CM4第16天培养基”袋。

8.9.23按照样品计划,取出培养基保留。使用30mL注射器,通过将注射器连接到4英寸血浆转运装置上,取出20.0mL的“完全CM4第16天培养基”,然后将样品加到50mL锥形管中。注:仅从准备好的第一袋培养基中取出培养基保留样品。注:取出注射器后,确保将4英寸血浆转运装置夹紧或盖上红色盖子。

8.9.24连接新的中继泵流体转运装置。将新的流体泵转运装置的较大直径的一端连接到“完全CM4第16天培养基”袋的4英寸血浆转运装置上。

8.9.25贴好标签,储存样品。贴上样品计划库存标签,将培养基保留样品储存在2℃至8℃下,直至根据样品计划提交登录进行检测。

8.9.26签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.9.27监控培养箱。如果适用,监控步骤8.9.10准备的其他袋子。培养箱参数:温度LED显示:37.0±2.0℃,CO₂百分比:5.0±1.5%CO₂。

8.9.28加热完全CM4第16天培养基。在培养箱中将第一袋完全CM4第16天培养基加热≥30分钟,直至可使用。如果适用,按照步骤8.10.59加热其他袋子。

8.9.29制备稀释液。在BSC中,向每个4x15mL锥形管中加入4.5mL标记有“用于细胞计数稀释”的AIM-V培养基。用批号和管编号(1至4)标记锥形管。用管编号(1至4)标记4个冻存管。在BSC下保存管,用于步骤8.10.31。

8.9.30检查8.9节

8.10第16天,REP分装

8.10.1预处理表格。

8.10.2监控培养箱。培养箱参数:温度LED显示屏:37.0±2.0℃,CO₂百分比:5.0±1.5%CO₂。

8.10.3从培养箱中取出G-Rex500MCS。在从培养箱中取出G-Rex500MCS之前,进行以下

检查以确保符合培养参数。

步骤 8.7.16B 的下限 (某年某月某日 某时某分)	步骤 8.7.16C 的上限 (某年某月某日 某时某分)	从培养箱取出的时间 (某年某月某日 某时某分)	是否 8.7.16B< 从培养箱取出的时间 <步骤 8.7.16C 是/否*
------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------	---

从培养箱中取出G-Rex500MCS。

8.10.4设置1L转运包。按照过程注释5.12,热封1L转运包(W3006645),留下约12英寸管线。

8.10.5准备1L转运包。将1L转运包标为“TIL悬液”。

8.10.6称重1L转运包,将包括整个管线在内的1L转运包放在秤上,记录干重。

8.10.7 GatheRex设置。将G-Rex500MCS的红色培养基取出管线无菌连接到步骤8.9.8准备的10L Labtainer袋“上清液”上的中继泵转运装置上。将G-Rex500MCS的透明细胞取出管线无菌连接到步骤8.10.5准备的TIL悬液转运包上。

8.10.8 GatheRex设置。将G-Rex500MCS烧瓶放在GatheRex的左侧。将上清液实验室容器袋和TIL悬液转运包放在右侧。

8.10.9 GatheRex设置。从G-Rex500MCS到顶部夹子(标有红色线)安装了红色培养基取出管线,GatheRex上安装了导管。从G-Rex500MCS到底部夹子(标有蓝色线)安装了透明收获管线,在GatheRex上安装了导管。

8.10.10 GatheRex设置。将GatheRex的气体管线连接到G-Rex500 MCS的无菌过滤器上。注:从G-Rex500MCS取出上清液之前,确保已关闭细胞取出管线上的所有夹子。

8.10.11减少G-Rex500MCS体积。按照SOP-01777,将约4.5L培养上清液从G-Rex500MCS转移至10L Labtainer。目视检查G-Rex500MCS,确保将烧瓶的液位和培养基减小至吸管的末端。注:如果GatheRex过早停止,则可通过再次按下向右箭头按钮来重启。

8.10.12准备烧瓶用于TIL收获。取出上清液后,关闭至红色管线的的所有夹子。

8.10.13开始TIL收获。记录TIL收获的开始时间。

8.10.14开始TIL收获。用力敲击烧瓶并旋转培养基以释放细胞。检查烧瓶以确保所有细胞均已分离。注:如果细胞未分离,联系区域管理。

8.10.15开始TIL收获。倾斜烧瓶以确保软管在烧瓶的边缘。注:如果细胞收集吸管不在壁和底部膜的交界处,则以450度倾斜的角度敲击烧瓶通常足以正确放置吸管。

8.10.16收获TIL。松开通往TIL悬液转运包的所有夹子。

8.10.17收获TIL。使用GatheRex将细胞悬液转移至TIL悬液转运包中。注:确保保持倾斜的边缘,直至收集完所有细胞和培养基。

8.10.18收获TIL。检查膜的贴壁细胞。

8.10.19冲洗烧瓶膜。冲洗G-Rex500MCS的底部。用洗涤培养基覆盖约1/4的气体交换膜。

8.10.20关闭G-Rex500MCS上的夹子。确保关闭G-Rex500MCS上的所有夹子。

8.10.21热封。(按照过程注释5.12)将包含TIL的转运包热封到尽可能靠近连接处的位置,以使总管长度保持大致相同。

8.10.22热封。(按照过程注释5.12)热封含有上清液的10L Labtainer,放入BSC用于进行步骤8.10.25的样品收集。

8.10.23 计算TIL悬液体积。记录具有细胞悬液的转运包的重量,计算体积悬液。

8.10.24 准备好的转运包用于样品取出。按照过程注释5.11,将4英寸血浆转运装置连接到步骤8.10.21的TIL悬液转运包,使母鲁尔接口端尽可能靠近袋子。

8.10.25 从细胞上清液中取出检测样品。在BSC中,使用母鲁尔端口和适当尺寸的注射器从10L实验室容器中取出10.0mL上清液。放入15mL锥形管中,标记为“BacT”,在步骤8.10.28保留该管用于BacT样品。

8.10.26 从细胞上清液中取出检测样品。使用另一个注射器,取出10.0mL上清液,放入15mL锥形管中。保留用于支原体样品的试管,用于步骤8.10.32。试管标记为“支原体稀释液”。

8.10.27 封闭上清液袋。在鲁尔端口上放一个红色盖子,以关闭袋子,从BSC中送出。

8.10.28 无菌性和BacT检测取样。在BSC中,使用适当尺寸的注射器从步骤8.10.25制备的标记了BacT的15mL锥形瓶中取出1.0mL样品,接种厌氧瓶。对有氧瓶重复上述步骤。注:此步骤可不按顺序进行。

8.10.29 标记并储存样品。用样品计划库存标签标记样品,在室温下保存BacT样品,避光,直至根据样品计划提交登录进行检测。注:不要让标签挡住瓶子上的条形码。

8.10.30 签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.10.31 取出细胞计数样品。在BSC中,对每个样品使用单独的3mL注射器,使用鲁尔连接件从“TIL悬液”转运包中取出4x1.0mL细胞计数样品。将样品置于步骤8.9.29制备的冻存管中。

8.10.32 取出支原体样品。使用3mL注射器,从TIL悬液转运包中取出1.0mL,放入上面制备的15mL锥形标签“支原体稀释液”中。

8.10.33 标记并储存样品。在2℃至8℃下标记并储存支原体样品,直至根据样品计划提交登录进行检测。

8.10.34 签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.10.35 准备用于接种的转运包。在BSC中,将中继泵流体转运装置的大直径管线末端连接到包含TIL的转运包上的鲁尔接口适配器。使用止血钳将管线夹在转运包附近。在转运装置的末端放一个红色盖子。

8.10.36 将TIL放在培养箱中。从BSC中取出细胞悬液,放入培养箱中直至需要。记录时间。

8.10.37 进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。最初通过将0.5mL细胞悬液加入步骤8.9.29制备的4.5mL AIM-V培养基中来稀释细胞计数样品。得到1:10的稀释度。

8.10.38 记录细胞计数的样品体积。

8.10.39 确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	8.10.38A+8.10.38B	C. μL
乘法因数	$C \div 8.10.38A$	D.

8.10.40选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。

8.10.41记录文件名、活力和Nucleoview的细胞计数。

8.10.42确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.10.41A+8.10.41B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.10.41C+8.10.41D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.10.43确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.10.42F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.10.42F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.10.44两个计数均在可接受范围内吗?

参数	公式	结果(是/否)
下限	$8.10.41C \text{ 和 } D \geq 8.10.43G$	
上限	$8.10.41C \text{ 和 } D \leq 8.10.43H$	

8.10.45如果适用:进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。
注:可根据预期细胞浓度调整稀释度。

8.10.46如果适用:记录细胞计数的样品体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0

8.10.47如果适用:确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	$8.10.46A+8.10.46B$	C. mL
乘法因数	$C \div 8.10.46A$	D.

8.10.48如果适用:选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0。

8.10.49如果适用:从Nucleoview记录细胞计数。

8.10.50如果适用:确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.10.49A+8.10.49B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.10.49C+8.10.49D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.10.51如果适用:确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.10.50F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.10.50F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.10.52如果适用:计数是否在可接受范围内?

参数	公式	结果(是/否)
下限	8.10.49C和 $D \geq 8.10.51G$	
上限	8.10.49C和 $D \leq 8.10.51H$	

注：如果任一结果为“否”，进行步骤8.10.53，确定所收集的所有细胞计数的平均值。

8.10.53如果适用：由进行的所有4个计数来确定平均活细胞浓度。

8.10.54调整TIL悬液体积。取出细胞计数样品后，计算调整后的TIL悬液的体积。用步骤8.10.23C的TIL细胞总体积减去用于检测的5.0mL取出体积。

8.10.55计算活TIL细胞总数。

参数	公式	结果
平均活细胞浓度*	8.10.42 F*或 8.10.50 F*或 8.10.53E*	A. 个细胞/mL
总体积	8.10.54 C	B. mL
活细胞总数	$A \times B$	C. 个细胞

8.10.56计算用于传代培养的烧瓶。计算要接种的烧瓶总数。注：将要接种的G-Rex500MCS烧瓶的数量向上舍入，得到接近的整数。

步骤 8.10.55C 活细胞总数 A	所需目标细胞数/烧瓶 B	要接种的 G-Rex500MCS 烧瓶的数量 $C = A \div B$
个细胞	1.0×10^9 个细胞/烧瓶	个烧瓶

注：要接种的G-Rex500MCS烧瓶的最大数量为5个。如果计算得出的要接种的烧瓶数量超过5个，则使用所有可用的细胞悬液仅接种5个。

8.10.57计算用于传代的烧瓶数量

标准	是/否
步骤 8.10.56C，要接种的 G-Rex500MCS 烧瓶数量 ≤ 5 如果是，接种步骤 8.10.58 计算的烧瓶数量	
步骤 8.10.56C，要接种的 G-Rex500MCS 烧瓶数量 ≤ 5 如果是，用所有可用细胞接种 5 个烧瓶	

8.10.58 QA检查步骤8.10.38至步骤8.10.57中的细胞计数计算。

8.10.59确定所需的其他培养基袋的数量。除步骤8.9.28准备的袋子之外，计算还需要的培养基袋子数量。

要接种的 G-Rex500MCS 烧瓶的数量 (步骤 8.10.56C) A	所需培养基袋 的数量 $B=A \div 2^*$	步骤 8.9.22 准备 的袋子数量 C	要准备的其他 袋子的数量 $D=B-C$
		1	

*将所需培养基袋数量向上舍入为最接近的整数。

8.10.60如果适用:准备其他培养基。对于步骤8.10.59D计算出的需要的每两个G-Rex-500M烧瓶,准备一个10L袋子的“CM4第16天培养基”。进行步骤8.10.62,在准备和加热另外的培养基的同时,对第一个G-REX-500M烧瓶进行接种。

8.10.61如果适用:准备另外的培养基袋。准备并加热步骤8.10.59D确定的另外的培养基袋的计算数量,重复步骤8.9.10至步骤8.9.28。

8.10.62填充G-Rex500MCS。在台式机上打开G-Rex500MCS,检查了容器中是否有裂纹或管子是否扭结。确保所有鲁尔连接件和密封件都拧紧。用记号笔在烧瓶外部的4500mL线上标记。关闭G-Rex500MCS上所有大型过滤器线夹之外的所有线夹。

8.10.63填充G-Rex500MCS。将G-Rex500MCS的红色培养基管线无菌连接(按照过程注释5.11)到步骤8.9.28准备的培养基袋上的流体转运装置上。

8.10.64准备泵送培养基。将“CM4第16天培养基”挂在输液杆上。通过Baxa泵喂入泵管。

8.10.65将培养基泵送到G-Rex500MCS中。将Baxa泵设置为“高”和“9”,然后将4500mL的培养基泵入烧瓶。将4.5L的“CM4第16天培养基”泵入G-Rex500MCS,填充至上述烧瓶的线标记处。一旦转移了4.5L的培养基,停止泵。

8.10.66热封。将G-Rex500MCS的红色培养基管线热封(按照过程注释5.12)在步骤8.10.63产生的连接附近,取下培养基袋。

8.10.67重复填充。加热培养基并准备使用时,对步骤8.10.56C计算的每个烧瓶重复步骤8.10.62至步骤8.10.66。注:使用重力填充以上泵可以同时填充多个烧瓶。注:每袋培养基只能装满两个烧瓶。

8.10.68记录并标记装满的烧瓶。每个烧瓶装满后,用字母和QA提供的过程中“第16天”标签对每个烧瓶进行标记。

8.10.69标记样品。下面给样品贴上“第16天”标签。

8.10.70如果适用:孵育烧瓶。在等待用TIL接种的同时将烧瓶放在培养箱中。

8.10.71验证填充的烧瓶数量。记录已装瓶的总数。

8.10.72计算要添加的细胞悬液的体积。计算添加至新的G-Rex500MCS烧瓶中的TIL悬液的目标体积。

步骤 8.10.54C TIL 悬液总体积 A	步骤 8.10.71 填充的烧瓶数量 B	转移到每个烧瓶的 细胞悬液目标体积 $C=A \div B$
mL		mL

8.10.56 C如果烧瓶的数量超过5个,则使用细胞悬液的整个体积仅接种5个。

8.10.73准备用于接种的烧瓶。从培养箱的步骤8.10.70中取出G-Rex500MCS。

8.10.74准备泵送。关闭G-Rex500MCS上除了大型过滤器管线之外的所有夹子。通过Baxa泵喂入泵管。

8.10.75从培养箱中取出TIL。从培养箱中取出“TIL悬液”转运包,在步骤8.10.36记录培养结束时间。

8.10.76准备用于接种的细胞悬液。将步骤8.10.75的“TIL悬液”转运包无菌(按照过程注释5.11)连接到泵入口管线。

8.10.77去皮称重。将TIL悬液袋放在秤上。使用设置为“低”和“2”的Baxa泵,填装从TIL悬液袋至连接处的管线。放磅秤。

8.10.78用TIL悬液接种烧瓶。将Baxa泵设为“中”和“5”。将步骤8.10.72C计算出的TIL悬液的体积泵入烧瓶中。记录添加至每个烧瓶中的TIL悬液的体积。

8.10.79热封。(按照过程注释5.12)热封“TIL悬液”转运包,留下足够的管子以连接在下一个烧瓶上。使用管线汽提器,将G-Rex烧瓶管线中残留的TIL悬液清除到容器中。

8.10.80填充剩余的烧瓶。在接种的每个烧瓶之间,确保混合“TIL悬液”转运包,重复步骤8.10.76至步骤8.10.79,以接种所有剩余烧瓶。以字母顺序填充烧瓶。

8.10.81监控培养箱。注:如果必须在两个培养箱之间分装培养瓶,确保同时监控两个培养箱。培养箱参数:温度LED显示: $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$, CO_2 百分比: $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

8.10.82孵育烧瓶。记录每个烧瓶放在培养箱中的时间。

8.10.83计算孵育窗口。进行以下计算,以确定在第22天从培养箱中取出G-Rex500MCS的时间范围。

烧瓶	8.10.83A 孵育时间 (步骤 8.10.82) (某年某月某日 某时某分)	8.10.83B 下限 孵育时间 +132 小时 (某年某月某日 某时某分)	8.10.83C 上限: 孵育时间 +156 小时 (某年某月某日 某时某分)
----	--	--	---

8.10.84环境监测。处理后,对BSC和人员监控进行验证。

8.10.85提交样品。确保第16天所有样品均已提交登录。

8.10.86检查8.10节。

8.11第22天,制备洗涤缓冲液

8.11.1检查房间消毒、管线清除和材料。

8.11.2确保完成预处理表格。

8.11.3环境监测。进行处理前,确保已进行预处理环境监控。

8.11.4准备10L Labtainer袋。在BSC中,通过鲁尔连接件将4英寸血浆转运装置连接到10L Labtainer袋中。

8.11.5准备10L Labtainer袋,标上“上清液”、批号和初始/日期。

8.11.6准备10L Labtainer袋。移出BSC之前,关闭所有夹子。注:对于每两个要收获的G-Rex500MCS烧瓶,准备一个10L Labtainer袋。注:8.12节中使用上清液袋,其可与8.11节同时运行。

8.11.7连接流体转运装置。在BSC外,关闭4S-4M60上的所有夹子。将中继流体转运装置连接(按照过程注释5.11)至4S-4M60的公鲁尔接口端之一。

8.11.8将材料放到BSC中。将Plasmalyte-A和人白蛋白25%放入BSC。将4S-4M60和中继流体转运装置装配件放进BSC。

组分描述	所需的量
Plasmalyte-A	3000.0 mL
25%人白蛋白	120.0 mL
具有中继流体转运装置的 4S-4M60	1 个设备 步骤 8.11.7

8.11.9将Plasmalyte泵入3000mL袋中。将三袋Plasmalyte-A刺入4S-4M60连接器套件。注：在卸下之前，用酒精棉签(W3009488)擦拭端口盖。注：保持恒定压力，同时沿一个方向旋转尖嘴。确保不要刺穿端口的侧面。

8.11.10将Plasmalyte泵入3000mL袋中。通过鲁尔连接件将Origen 3000mL收集袋连接到中继站泵转运装置的较大直径端。

8.11.11将Plasmalyte泵入3000mL袋中。封闭3000mL Origen袋未使用的管线上的夹子。

8.11.12将Plasmalyte泵入3000mL袋中。将Baxa泵安装在BSC旁边。通过位于BSC外部的Baxa泵喂入转运装置管。将泵设置为“高”和“9”。

8.11.13将Plasmalyte泵入3000mL袋中。打开从Plasmalyte-A到3000mL Origen袋的所有夹子。

8.11.14将Plasmalyte泵入3000mL袋中。将所有Plasmalyte-A泵入3000mL源袋中。转移完所有Plasmalyte-A后，停止泵。

8.11.15将Plasmalyte泵入3000mL袋中。视需要，通过倒转泵并操纵袋子的位置，从3000mL Origen袋子中除去空气。

8.11.16将Plasmalyte泵入3000mL袋中。关闭所有夹子。通过鲁尔连接件从中继泵流体转运装置中取出3000mL袋子，在通往袋子的管线上放一个红色盖子(W3012845)。

8.11.17向3000mL袋中添加25%人白蛋白。打开排气迷你尖嘴。在不影响尖嘴无菌性的情况下，确保牢固地固定蓝色盖子。

8.11.18向3000mL袋中添加25%人白蛋白。用排气的迷你尖嘴刺入25%人白蛋白瓶的隔垫。注：确保不损害尖嘴的无菌性。

8.11.19向3000mL袋中添加25%人白蛋白。重复步骤8.11.17至步骤8.11.18两次，共三(3)个加标25%的人白蛋白瓶。

8.11.20向3000mL袋中添加25%人白蛋白。从一个排气的迷你尖嘴上取下蓝色盖子，将60mL注射器连接到25%人血清白蛋白瓶上。

8.11.21向3000mL袋中添加25%人白蛋白。吸取60mL 25%的人血清白蛋白。注：可能需要使用一瓶以上25%的人血清白蛋白。视需要，将注射器从排气迷你尖嘴断开，将其连接到25%人血清白蛋白瓶中的下一个排气迷你尖嘴上。请勿从25%人血清白蛋白瓶中取出排气迷你尖嘴。

8.11.22向3000mL袋中添加25%人白蛋白。一旦获得60mL，从排气的迷你尖嘴中取出注射器。

8.11.23向3000mL袋中添加25%人白蛋白。在步骤8.11.16中,将注射器连接到装有Plasmalyte-A的3000mL Origen袋的无针进样口上。加入所有人白蛋白25%。注:每次使用前,用酒精棉片擦拭不需要的进样口。

8.11.24向3000mL袋中添加25%人白蛋白。重复步骤8.11.20至步骤8.11.23,获得最终体积为120.0mL的人白蛋白25%。

8.11.25混合袋子。加入所有25%的人白蛋白后,轻轻混合袋子。

8.11.26标记袋子。标记为“LOVO洗涤缓冲液”和批号,标明24小时到期。

8.11.27制备IL-2稀释液。使用10mL注射器,通过LOVO洗涤缓冲液袋上的无针进样取出5.0mL LOVO洗涤缓冲液。将LOVO洗涤缓冲液加到50mL锥形管中,标记为“IL-2稀释液”和批号。注:每次使用前,用酒精棉片擦拭不需要的进样口。

8.11.28等分CRF空白袋LOVO洗涤缓冲液。使用100mL注射器,从无针进样口中吸出70.0mL LOVO洗涤缓冲液。注:每次使用前,用酒精棉片擦拭不需要的进样口。

8.11.29等分CRF空白袋LOVO洗涤缓冲液。在注射器上盖上红色盖子,贴上“空白冻存袋”和批号的标签。注:保持注射器在室温下,直至在步骤8.14.3中需要。

8.11.30完成洗涤缓冲液的制备。关闭LOVO洗涤缓冲液袋上的所有夹子。

8.11.31解冻IL-2。解冻1个1.1mL IL-2 (6×10^6 IU/mL),直至所有冰解冻为止。记录IL-2批号和有效期。注:确保贴有IL-2标签。

8.11.32制备IL-2。向标有“IL-2稀释液”的50mL锥形管中加入50 μ L IL-2储备溶液 (6×10^6 IU/mL)。

8.11.33制备IL-2。将锥形管重新标记为“IL-2 6×10^4 ”、日期、批号和有效期24小时。盖上盖子,保存在2℃至8℃下。

8.11.34冷冻保存制剂。将5个冻存盒放在2℃至8℃进行预处理,以进行最终产品的冷冻保存。

8.11.35制备细胞计数稀释液。在BSC中,向4个单独的15mL锥形管中添加4.5mL的AIM-V培养基(已标记批号和“用于细胞计数稀释”),用记录批号和管编号(1至4)标记管。放在一边,在步骤8.12.34中使用。

8.11.36准备细胞计数。用瓶编号(1至4)标记4个冻存管。在BSC下保存管,在步骤8.12.33中使用。

8.11.37检查8.11节

8.12第22天,TIL收获

8.12.1监控培养箱。培养箱参数温度LED显示屏:37℃ $\pm$ 2.0℃,CO₂百分比:5% $\pm$ 1.5%。注:8.12节可与8.11节同时运行。

8.12.2从培养箱中取出G-Rex500MCS烧瓶。从培养箱中取出G-Rex500MCS之前,进行以下检查以确保符合培养参数。

烧瓶	架子	步骤 8.10.83 B 下限 (某年某月某日某时某分)	步骤 8.10.83 C 上限 (某年某月某日某时某分)	从培养箱取出 时间 (某年某月某日某时某分)	是否 8.10.83 B< 从培养箱取出时间< 步骤 8.10.83 C 是/否*
----	----	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------	--

注:必须从培养箱中取出每个烧瓶后进行此步骤。

8.12.3准备TIL收集袋。将3000mL收集袋标记为“TIL悬液”、批号和初始/日期。

8.12.4密封额外的连接。按照过程注释5.12,在收集袋的每个连接末端附近将两个鲁尔连接件热封。

8.12.5 GatheRex设置。将红色培养基取出管线从G-Rex500MCS无菌连接(按照过程注释5.11)至步骤8.11.5准备的10L Labtainer袋。注:有关使用多个GatheRex设备,参考过程注释5.16。

8.12.6 GatheRex设置。将G-Rex500MCS的透明细胞取出管线无菌连接至步骤8.12.3准备的TIL悬液收集袋(按照过程注释5.11)。注:有关使用多个GatheRex设备,参考过程注释5.16。

8.12.7 GatheRex设置。将G-Rex500MCS烧瓶放在GatheRex的左侧。将上清液Labtainer袋和合并的TIL悬液收集袋放在右侧。

8.12.8 GatheRex设置。将G-Rex500MCS的红色培养基取出管线安装到GatheRex的顶部夹子(标有红色线)和导管。将G-Rex500MCS的透明收获线安装到GatheRex的底部夹子(标有蓝色线)和导管。

8.12.9 GatheRex设置。将GatheRex的气体管线连接到G-Rex500MCS的无菌过滤器。从G-Rex500MCS去除上清液之前,确保关闭细胞取出管线上的所有夹子。

8.12.10减小体积。将约4.5L的上清液从G-Rex500MCS转移至上清液袋中。目视检查G-Rex500MCS以确保烧瓶处于水平状态,培养基已减少至抽吸汲取管的末端。视需要,重复步骤。注:如果GatheRex过早停止,则可通过再次按下向右箭头按钮来重启。

8.12.11准备用于TIL收获的烧瓶。取出上清液后,关闭至红色管线的所有夹子。

8.12.12开始收集TIL。记录TIL收获的开始时间。

8.12.13开始收集TIL。用力敲击烧瓶并旋转培养基以释放细胞。检查烧瓶以确保所有细胞均已分离。将“TIL悬液”3000mL收集袋放在平坦表面的干抹布上。注:如果细胞未分离,联系区域管理。

8.12.14开始收集TIL。倾斜烧瓶以确保软管在烧瓶的边缘。注:如果细胞收集软管不在壁膜和底部膜的连接处,则将烧瓶以45°角倾斜时敲击烧瓶通常足以正确放置软管。

8.12.15收获TIL松开通往TIL悬液收集袋的所有夹子。

8.12.16收获TIL。使用GatheRex,将TIL悬液转移至3000mL收集袋中。注:保持边缘倾斜直至收集所有细胞和培养基。

8.12.17收获TIL。检查膜上是否有贴壁细胞。

8.12.18冲洗烧瓶膜。冲洗G-Rex500MCS的底部。用洗涤培养基覆盖约1/4的气体交换膜。

8.12.19关闭G-Rex500MCS上的夹子。确保所有夹子都已关闭。

8.12.20热封。将装有TIL的收集袋热封(按照过程注释5.12)尽可能靠近连接的位置,以使总管长度保持大致相同。

8.12.21热封。热封(按照过程注释5.12)上清液袋。

8.12.22完成剩余G-Rex 500MCS烧瓶的收获。重复步骤8.12.2和步骤8.12.5至步骤8.12.21,将所有TIL合并到同一收集袋中。注:每第二个烧瓶后必须更换10L上清液袋。注:有关使用多个GatheRex设备,参考过程注释5.16。

8.12.23准备LOVO源袋。获得一个新的3000mL收集袋。标记为“LOVO源袋”、批号和初始/日期。

8.12.24准备LOVO源袋。热封 (按照过程注释5.12) “LOVO袋”的管线,取下母鲁尔接头,留下足够的线进行连接。

8.12.25称重LOVO源袋。在秤和皮重上放置适当大小的塑料箱。将LOVO源袋 (包括端口和管线) 放入垃圾箱,记录干重。

8.12.26将细胞悬液转移到LOVO源袋中。关闭170μm重力血液过滤器的所有夹子。

8.12.27将细胞悬液转移到LOVO源袋中。将重力血液过滤器的长末端无菌连接 (按照过程注释5.11) 到LOVO源袋上。

8.12.28将细胞悬液转移到LOVO源袋中。将过滤器的两根来源管线之一无菌连接 (按照过程注释5.11) 到“合并的TIL悬液”收集袋中。

8.12.29将细胞悬液转移到LOVO源袋中。连接完成后,将过滤器上未使用的管线加热封 (按照过程注释5.12) 以将其移除。

8.12.30将转移细胞悬液装入LOVO源袋中。打开所有必要的夹子,将收集袋悬挂在IV杆上,以提升TIL悬液,以启动TIL的重力流转移,使其通过血液过滤器进入LOVO源袋。排水时轻轻旋转或揉捏TIL悬吊袋,以保持TIL均匀悬吊。注:不要将LOVO源袋悬挂在过滤设备上。将LOVO源袋放在平坦的干抹布上。

8.12.31关闭所有夹子。将所有TIL转移到LOVO源袋后,关闭所有夹子。

8.12.32热封。尽可能靠近连接加热封 (根据过程注释5.12) 以去除重力血液过滤器

8.12.33取出细胞计数样品。在BSC中,对每个样品使用单独的3mL注射器,使用无针注射口从LOVO源袋中取出4x1.0mL细胞计数样品。将样品放在步骤8.11.36中准备的冻存管中。注:用酒精棉片擦拭不需要的进样口,混合每个样品之间的LOVO源袋。

8.12.34进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。最初通过将0.5mL细胞悬液加入步骤8.11.35制备的4.5mL AIM-V培养基中来稀释细胞计数样品。得到1:10的稀释度。

8.12.35记录细胞计数的样品体积。

8.12.36确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	8.12.35A+8.12.35B	C. μL
乘法因数	$C \div 8.12.35A$	D.

8.12.37选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0

8.12.38从Nucleoview记录细胞计数。

8.12.39确定进行细胞计数的平均活力,活细胞浓度和有核细胞总浓度。

参数	公式	结果
活力	$(8.12.38A+8.12.38B) \div 2$	G.
活细胞浓度	$(8.12.38C+8.12.38D) \div 2$	H. 个细胞

有核细胞总浓度	$(8.12.38E+8.12.38F) \div 2$	I. 个细胞
---------	------------------------------	--------

8.12.40确定计数的上限和下限

参数	公式	结果
下限	$8.12.39H \times 0.9$	J. 个细胞/mL
上限	$8.12.39I \times 1.1$	K. 个细胞/mL

8.12.41两个计数均在可接受范围内吗？

参数	公式	结果（是/否）
下限	$8.12.38 C \text{ 和 } D \geq 8.12.40J$	
上限	$8.12.38 C \text{ 和 } D \leq 8.12.40K$	

注：如果任一结果为“否”，则在步骤8.12.42至步骤8.12.49进行第二组计数。

8.12.42如果适用：进行细胞计数。利用NC-200和过程注释5.14进行细胞计数和计算。

注：可根据预期细胞浓度调整稀释度。

8.12.43如果适用：记录细胞计数的样品体积

8.12.44如果适用：确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	$8.12.43A+8.12.43B$	C. μL
乘法因数	$C \div 8.12.43A$	D.

8.12.45如果适用：选择方案，输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案，已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注：如果无需稀释，输入“样品[μL]”=200，“稀释[μL]”=0

8.12.46如果适用：从Nucleoview记录细胞计数。

8.12.47如果适用：确定进行细胞计数的平均活力、活细胞浓度和有核细胞总浓度。

参数	公式	结果
活力	$(8.12.46A+8.12.46B) \div 2$	G.
活细胞浓度	$(8.12.46C+8.12.46D) \div 2$	H. 个细胞/mL
有核细胞总浓度	$(8.12.46E+8.12.46F) \div 2$	I. 个细胞/mL

8.12.48如果适用：确定计数的上限和下限

参数	公式	结果
下限	$8.12.47H \times 0.9$	J. 个细胞/mL
上限	$8.12.47H \times 1.1$	K. 个细胞/mL

8.12.49如果适用：计数是否在可接受范围内？

参数	公式	结果（是/否）
下限	$8.12.46C+8.12.46D \geq 8.12.48J$	
上限	$8.12.46C+8.12.46D \leq 8.12.48K$	

注：如果任一结果为“否”，进行步骤8.12.50以确定平均值。

8.12.50如果适用：用进行的所有4个计数确定平均活细胞浓度和平均有核细胞总浓度。

8.12.51 QA检查细胞计数。QA人员检查步骤8.12.38至步骤8.12.50中进行的计算。

8.12.52称重LOVO源袋。在去皮天平上放置适当尺寸的塑料箱。将完整LOVO源袋放入箱中，记录重量。计算细胞悬液的体积。

8.12.53计算活TIL细胞总数。

参数	公式	结果
平均活细胞浓度*	8.12.39 H*或 8.12.47 H*或 8.12.50 E*	A. 个细胞/mL
总体积	8.12.52 C	B. mL
活细胞总数	A×B	C. 个细胞
是否 $C \geq 1.5 \times 10^9$?	是/否**	

*圈出用于确定活细胞浓度的步骤参考。

**如果“是”，则继续。如果“否”，联系区域管理。

8.12.54计算有核细胞总数。

参数	公式	结果
平均有核细胞总浓度*	8.12.39 I*或 8.12.47 I*或 8.12.50 J*	A. 个细胞/mL
总体积	8.5.52 C	B. mL
有核细胞总数	A×B	C. 个细胞

*圈出用于确定有核细胞总浓度的步骤参考。

8.12.55制备支原体稀释液。在BSC中，通过鲁尔样品端口从一个上清液袋中取出10.0mL，放入15mL锥形瓶中。标记15mL锥形“支原体稀释液”，保存在BSC中以用于步骤8.14.69。

8.12.56检查8.12节

8.13 LOVO

8.13.1使用仪器左后方的开关打开LOVO。注：步骤8.13.1至8.13.13可与8.11节至8.12节同时进行。

8.13.2检查秤和压力传感器。

8.13.3确保任一秤上均未悬挂物品，检查每个秤的读数。记录步骤8.13.5中的值。注：如果任一秤的读数超出0+/-2g的范围，校准秤。

8.13.4如果所有秤在未悬挂重量时有公差，则在每个秤（#1至#4）上悬挂1kg重量，检查读数。记录步骤8.13.5中的值。

8.13.5检查秤。记录每个秤的显示值。如果值在范围内，继续处理。如果值不在范围内，进行校准。

8.13.6检查仪器操作方案屏幕的压力传感器读数,记录。压力的可接受范围读数为0 +/-10mmHg。如果显示值超出此范围,则按照机器说明储存新大气压设置。

8.13.7重复步骤。如果进行新的电子秤校准或储存新的大气压设置,重复步骤8.13.3至步骤8.13.6。

8.13.8从下拉菜单开始“TIL G-Rex收获”方案。

8.13.9显示溶液1屏幕:读取缓冲液类型为PlasmaLyte。

8.13.10至8.13.16遵循LOVO触摸屏提示。

8.13.17确定最终产品目标体积。注:使用步骤8.12.54C的有核细胞总数(TNC)值和下表,确定最终产物目标体积。记录最终产物体积(mL)。

细胞范围	最终产物(保留物)的目标体积(mL)
$0 < (\text{活}+\text{死}) \text{ 细胞总数} \leq 7.1 \times 10^{10}$	165
$7.1 \times 10^{10} < (\text{活}+\text{死}) \text{ 细胞总数} \leq 1.1 \times 10^{11}$	215
$1.1 \times 10^{11} < (\text{活}+\text{死}) \text{ 细胞总数} \leq 1.5 \times 10^{11}$	265

注:如果步骤8.12.53C的TVC $>1.5 \times 10^{11}$,联系区域管理。

8.13.18至8.13.22遵循LOVO触摸屏提示。

8.13.23装入一次性试剂盒。在装入一次性试剂盒之前,先用酒精抹布擦拭再用不起毛的抹布擦拭压力传感器端口。装入一次性试剂盒。按照屏幕上的指示安装一次性试剂盒。

8.13.24取出滤液袋。装入标准LOVO一次性试剂盒后,触摸“下一步”按钮。显示“集装箱信息和位置”屏幕。从秤上取下滤液袋。

8.13.25确保滤液容器是新的且超出刻度(Off-Scale)。

8.13.26输入滤液容量。将LOVO辅助袋无菌连接到现有过滤袋的公鲁尔接口管线上。确保所有夹子均已打开且流体通道畅通。触摸过滤容器容量输入字段。

显示数字小键盘。输入总的新滤液容量(5,000mL)。触摸按钮以接受输入。注:估计滤液量不应超过5000mL。

8.13.27将滤液容器放在工作台上。注:如果在连接过程中从F夹上拆下了管子,则将其放回夹子中。将新的过滤容器放在工作台上。不要将过滤袋挂在#3秤上。在此过程中,秤#3将为空。

8.13.28跟随过滤容器更换后的LOVO触摸屏提示。

8.13.29确保正确装入试剂盒。将显示“一次性试剂盒干燥检查”覆盖图。检查试剂盒是否正确装入,所有夹子均已打开。检查所有管线是否有扭结或其他障碍物,尽可能进行纠正。确保已正确安装试剂盒,检查所有Robert的夹子。按下“是”按钮。所有LOVO机械夹子自动关闭,并显示“检查一次性试剂盒安装”屏幕。LOVO经历了一系列加压步骤以检查试剂盒。

8.13.30试剂盒检查结果。如果工具包检查通过,则继续下一步。*如果否,则在检查完成后可进行第二次试剂盒检查。*如果否,请检查所有管线是否有扭结或其他障碍物,并进行纠正。*如果否,请确保正确安装了确定的是,检查所有罗伯特夹子。如果第二个是检查失败:请联系区域施用人员,并准备在第10.0节中安装新是。重复步骤8.13.23-所需的步骤8.13.30。

8.13.31连接PlasmaLyte。显示“连接溶液”屏幕。洗涤值将始终为3000mL。在屏幕上输入此值。按照过程注释5.11,将3000mL的PlasmaLyte袋无菌连接到穿过夹子1的管线上。将PlasmaLyte袋挂在IV杆上,将两个角袋环都放在钩子上。

8.13.32验证PlasmaLyte已连接。打开所有塑料夹。验证溶液体积条目为3000mL。触摸“下一步”按钮。显示“灌注一次性试剂盒”覆盖。确认已连接PlasmaLyte且通向PlasmaLyte袋的管线上的所有连接和塑料夹都已打开,然后触摸“是”按钮。

8.13.33观察到PlasmaLyte正在移动。一次性试剂盒灌注开始,显示“灌注一次性试剂盒”屏幕。肉眼观察到PlasmaLyte通过连接到PlasmaLyte袋的管子移动。如果没有流体在移动,按下屏幕上的“暂停”按钮,确定是否仍关闭了夹子或连接。解决问题后,请按屏幕上的“继续”按钮以继续使用一次性试剂盒。一次性试剂盒灌注成功完成后,将显示“连接源”屏幕。

8.13.34至8.13.35遵循LOVO触摸屏提示。

8.13.36将来源容器附接到管线上。按照过程注释5.11将步骤8.12.31中准备的LOVO源袋无菌连接到穿过S夹的管线上。可能有必要从夹子上拆下管线。注:如果已拆下,确保将来源管线更换到S夹中。

8.13.37悬挂源容器。将源容器挂在IV杆上,将两个角袋环都放在钩子上。不要将源悬挂在#1秤上。打开所有到源袋的夹子。

8.13.38连接已验证的源容器。触摸下一步按钮。显示灌注源覆盖。确认源已连接到一次性试剂盒且通往源的管线上的所有连接和塑料夹都已打开。触摸“是”按钮。

8.13.39确认PlasmaLyte正在移动。开始源灌注,显示源灌注屏幕。肉眼观察到PlasmaLyte正在通过与源袋相连的管线移动。如果没有流体在移动,按屏幕上的“暂停”按钮,然后确定夹子或连接是否仍关闭。解决问题后,按屏幕上的“继续”按钮以恢复源灌注。

8.13.40启动程序屏幕。当源灌注成功完成后,将显示“启动过程”屏幕。按下开始键,按下开始键后,将立即出现“预洗涤循环1”暂停屏幕。

8.13.41倒置处理袋。从#2磅秤上卸下过程中包装袋(也可以从过程中顶部端口管线导板上移除管线),将其手动翻转,以允许在一次性试剂盒灌注步骤中添加的洗涤缓冲液覆盖包装袋的所有内表面。重新将处理中的袋子挂在#2的秤上(袋子上的标签朝左)。如果顶管已卸下,则将其更换。

8.13.42倒置源袋。在按下“开始”按钮之前,混合源袋,但不从IV电极上移开,方法是揉按袋角并轻轻搅动细胞,以形成均匀的细胞悬液。按下恢复按钮。LOVO开始处理源袋中的液体,显示洗涤循环1屏幕。

8.13.43源冲洗暂停。一旦排放源容器排空并且LOVO已向洗涤源袋中添加了洗涤缓冲液,就会显示“冲洗源暂停”屏幕。在不从静脉输液架上取下源袋的情况下,揉按角落并充分混合。按下恢复。

8.13.44混合过程中袋子暂停。为使细胞再次准备通过旋转器,用洗涤缓冲液稀释处理袋。在将洗涤缓冲液添加至处理袋中后,LOVO会自动暂停并显示“混合处理袋”暂停屏幕。在不从秤上移开袋子的情况下,通过轻轻挤压袋子将产品充分混合。按下继续。

8.13.45揉按过程中角落暂停。当处理袋为空时,将洗涤缓冲液添加至处理袋的底部以冲洗袋子。添加冲洗液后,LOVO自动暂停并显示“揉按IP角落”暂停屏幕。当显示“揉按IP角

落”暂停屏幕时,请勿从秤#2取出袋子。待处理袋仍悬在秤#2上时,揉按袋子角落,使残留的细胞悬浮。确保袋子没有在秤上摆动,按下“继续”按钮。

8.13.46等待“取出产品”屏幕。LOVO过程结束时,将显示“取出产品”屏幕。当显示此屏幕时,可以操纵LOVO套件上的所有行李袋。注:直至显示“取出产品”时,才可以触摸任何袋子。

8.13.47取出滞留物袋。在滞留物袋的端口附近非常靠近管线的位置放置止血钳,以防止细胞悬液沉淀到管线中。在止血钳下方加热封(按照过程注释5.12),确保保持足够的线数以在步骤8.13.48中进行连接。取出滞留物袋。

8.13.48制备用于制剂的滞留物袋。将4英寸血浆转运装置的母鲁尔锁定端连接(按照过程注释5.11)到滞留物袋上。转移滞留物袋以用于步骤8.14.11。

8.13.49取出产品。按照“取出产品”屏幕上的说明进行操作。关闭LOVO套件上的所有夹子,以防止流体移动。

8.13.50取出产品。触摸下一步按钮。打开所有LOVO机械夹子,显示“拆卸套件”屏幕。

8.13.51记录数据。按照“拆卸工具包”屏幕上的说明进行操作。触摸“下一步”按钮。关闭所有LOVO机械夹子,显示结果概述屏幕。从结果概述屏幕记录数据。关闭所有泵和过滤器支撑。当LOVO提示时,卸下套件。*注:适用时,直接从LOVO结果摘要屏幕以HH:分分:秒秒格式和(HH:分分:秒秒)格式记录所有记录时间。

8.13.52至8.13.54通过LOVO关机选择方案。按照LOVO屏幕提示进行操作。

8.13.55检查8.13节

8.14最终制剂和填充

8.14.1目标体积/袋子计算。从下表DDD中,选择要填充的CS750袋数量、每袋目标填充体积、每袋取出用于保留的体积以及对应于步骤8.13.22中LOVO滞留物体积的每袋最终目标体积。

LOVO 产品的体积	要添加至产品的 CS10 体积	配制产品的最终预测体积	要填充的袋子数量	每袋的目标填充体积	每袋取出用于保留的体积	每袋的最终目标体积
165 mL	165 mL	330 mL	3	107mL	7mL	100 mL
215 mL	215 mL	430 mL	4	105 mL	5 mL	100 mL
265 mL	265 mL	530 mL	4	130 mL	5 mL	125 mL

8.14.2准备CRF空白。计算CS-10和LOVO洗涤缓冲液的体积以配制空白袋。

每袋的最终目标体积 8.14.1E A	空白 LOVO 洗涤缓冲液体积 B = A/2	空白 CS-10 体积 (mL) C = B
mL	mL	mL

8.14.3准备CRF空白。在BSC外部,使用步骤8.11.29准备的LOVO洗涤缓冲液注射器,通过鲁尔连接件将步骤8.14.2B计算出的体积添加至空CS750袋中。注:空白的CS750袋子配方无需无菌操作。

8.14.4准备CRF空白。使用适当尺寸的注射器,将在步骤8.14.2中计算出的CS-10体积添加到与步骤8.14.3制备的相同的CS750袋中。在CS750包上放一个红色盖子。

8.14.5准备CRF空白。尽可能从CS-750袋中赶出空气。将CS750袋尽可能热封(按照过程注释5.12),使其尽可能靠近袋,拆下管线。

8.14.6准备CRF空白。在CS750袋上贴上“CRF空白”、批号和首字母/日期标签。将CRF空白放置在冷袋上,直至将其放入CRF中为止。

8.14.7计算所需IL-2体积。计算添加至最终产品中的IL-2的体积

参数	公式	结果
最终滞留物体积	步骤 8.13.51	A. mL
最终配制体积	$B = A \times 2$	B. mL
所需的最终 IL-2 浓度 (IU/mL)	300 IU/mL	C. 300 IU/mL
所需的 IL-2 (IU)	$D = B \times C$	D. IU
步骤 8.11.33 的 IL-2 工作储备溶液	6×10^4 IU/mL	E. 6×10^4 IU/mL
要添加至最终产品的 IL-2 体积	$F = D \div E$	F. mL

8.14.8组装连接设备。(按照过程注释5.11)将4S-4M60无菌地连接至CC2 Cell Connect,在(G)处用4S-4M60歧管的4尖嘴端替换Cell Connect设备(B)的单个尖嘴。

8.14.9组装连接设备。将CS750冻存袋无菌连接(按照过程注释5.11)至步骤8.14.8中准备的线束上,用每个袋替换4个鲁尔接口公端(E)之一。参考步骤8.14.1确定所需的袋子数量。

8.14.10组装连接设备。将CS-10袋(按过程注释5.11)连接到4S-4M60的尖嘴上。将袋子放在2℃至8℃的两个冰袋之间来保存CS-10。

8.14.11将材料放入BSC。

项目	项目#或步骤参考	质量
4" 血浆转运装置		1
IL-2 (6.0×10^4) 等分试样	8.11.33	1
用适当尺寸注射器添加IL-2	8.14.7F	1
LOVO滞留物袋	8.13.48	1
红色盖子		5

8.14.12用IL-2制备TIL。使用适当大小的注射器,从“IL-2 6×10^4 ”等分试样中取出步骤8.14.7确定的IL-2量。

8.14.13用IL-2制备TIL。通过鲁尔连接件将注射器连接到步骤8.13.48准备的滞留物袋上,注入IL-2。

8.14.14用IL-2制备TIL。通过将注射器中的空气推入管线来清理管线。

8.14.15标为配制的TIL袋。关闭转运装置上的夹子,将袋子标为“配制的TIL”,然后将

其从BSC取出。

8.14.16如果适用：按照样品计划取样。如果步骤8.11.33制备的“IL-2 6×10^4 ”等分试样有剩余，则使用适当尺寸的注射器根据样品计划取出约5mL样品滞留物，加到50mL锥形管中。

8.14.17如果适用：按照样品计划取样。贴上样品计划库存标签，储存在2℃至8℃下，直至根据样品计划提交登录进行检测。

8.14.18如果适用：按照样品计划取样。对于取出的样品，确保填写LIMS样品计划表。

8.14.19将配制的TIL袋添加至设备中。添加IL-2后，将步骤8.14.10中“配制的TIL”袋连接（按照过程注释5.11）到设备上剩余的尖嘴上。

8.14.20添加CS10。将已安装配制的TIL、CS-750袋和CS-10的组装好的设备放入BSC。注：CS-10袋和所有CS-750袋都放在两个预先设置为2℃-8℃的冷袋之间。未将配制的TIL袋放在冷袋上。

8.14.21添加CS10。确保关闭所有夹子。转动旋塞阀，以关闭注射器。

8.14.22切换注射器。将约10mL的空气吸入100mL的注射器中，更换设备上的60mL的注射器。

8.14.23添加CS10。旋开旋塞阀，以使通往CS750袋的管线关闭。打开CS-10袋子的夹子，将在步骤8.14.1B中计算的体积拉入注射器。注：将使用多个注射器添加适当体积的CS-10。注：在步骤8.14.26中记录每个注射器的体积。

8.14.24添加CS10。关闭CS-10的夹子，打开配制的TIL袋的夹子，添加CS-10。以约10.0mL/分钟的速度添加第一个10.0mL的CS10。以约1.0mL/秒的速度添加剩余的CS-10。注：使用多个注射器添加适量的CS-10。添加完后，勿重复使用注射器。

8.14.25添加CS10。记录时间。注：从第一次添加CS-10到开始冻结的目标时间是30分钟。

8.14.26添加CS10。记录每次CS10添加的体积和添加的总体积。根据步骤8.14.1B计算的总匹配体积。

8.14.27添加CS10。关闭所有CS10袋子的夹子。

8.14.28准备CS-750袋子。转动旋塞阀，以便打开注射器。打开配方TIL袋的夹子，在悬液到达旋塞阀之前，将悬液停下来。

8.14.29准备CS-750袋。关闭配制的TIL袋的夹子。旋动旋塞阀，使其对CS750最终产品袋开放。

8.14.30准备CS-750袋子。使用新的注射器，通过抽出空气，从CS750最终产品袋中除去尽可能多的空气。在保持注射器柱塞压力的同时，将袋子夹紧。

8.14.31准备CS-750袋子。将约20mL的空气吸入新的100mL注射器中，连接至设备。注：每个CS-750最终产品袋应位于两个冷袋之间，以使配制好的TIL悬液保持低温。

8.14.32分配细胞。转动旋塞阀，以关闭通往最终产品袋的管线。从配制的TIL袋中将上述计算出的体积拉入注射器。注：可使用多个注射器获得正确的体积。

8.14.33分配细胞。转动旋塞阀，以使通往配制的TIL袋的管线关闭。一次使用一个最终产品袋，将细胞加到最终产品袋中。在步骤8.14.35记录到上述每个CS750袋中的细胞体积。

8.14.34分配细胞。用注射器中的空气清除管线，使细胞与尖嘴端口的顶部均匀。关闭

装满袋子的夹子。对每个最终产品袋子重复步骤8.14.29至步骤8.14.34,在每个袋子之间轻轻混合配制的TIL袋子。

8.14.35分配细胞。记录在下面每个最终产品包装袋中的TIL的体积。

8.14.36从最终产品袋中赶走空气,取出保留液。装满最后一个最终产品袋后,关闭所有夹子。

8.14.37从最终产品袋中赶走空气,取出保留液。将10mL的空气吸入新的100mL注射器中,更换设备上的注射器。

8.14.38从最终产品袋中赶走空气,取出保留液。一次操作一个袋子,从每个产品袋中抽出所有空气,再加上步骤8.14.1D确定的要保留的产品体积。注:取下样品体积后,将注射器倒转,用空气清理通向产品袋顶部端口的管线。除去保留体积和空气后,将管线夹在袋子上。

8.14.39记录取出的体积。记录从每个袋子中取出的保留体积。

8.14.40添加滞留物。将滞留物加入50mL锥形管中,标记为“保留”和批号。对每个袋子重复步骤8.14.37至步骤8.14.39。

8.14.41制备用于冷冻保存的最终产品。使用止血钳,靠近袋子夹住管线。拆下注射器和注射器所在设备上的红色盖子鲁尔接口。将设备移出BSC。

8.14.42制备用于冷冻保存的最终产品。取出空的滞留物袋和CS-10袋。注:保留设备上的用于注射器的鲁尔连接件。丢弃空的滞留物和CS-10袋。

8.14.43进行目视检查。注:步骤8.14.43至步骤8.14.46可与步骤8.14.47至步骤8.14.68同时进行。

8.14.44给最终产品袋贴上标签。下面附有样品最终产品标签。

8.14.45制备用于冷冻保存的最终产品。将冻存袋放在冰袋上或2℃至8℃下直至冷冻保存。

8.14.46准备外部标签。确保将QA合格的外部标签贴在盒标签上,与相应的最终产品标签匹配。将QA合格的外部标签贴在盒上。以下给样品贴上外部标签:

8.14.47取出细胞计数样品。使用适当尺寸的移液器,取出步骤8.14.38取出的2.0mL滞留物,放入15mL锥形管中以进行细胞计数。

8.14.48进行细胞计数。根据SOP-00314和过程注释5.14,利用NC-200进行细胞计数和计算。注:仅将一个样品稀释至适当的稀释因子以验证稀释是否足够。将其他样品稀释至适当的稀释倍数,然后进行计数。

8.14.49记录细胞计数的样品体积。注:如果无需稀释,则“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0。

8.14.50确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	8.14.49A+8.14.49B	C. μL
乘法因数	$C \div 8.14.49A$	D.

8.14.51选择方案,输入乘法因数。确保已根据“SOP-00314”选择了“活细胞计数测定”

方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0

8.14.52记录文件名、活力和Nucleoview的细胞计数。

8.14.53确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.14.52A+8.14.52B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.14.52C+8.14.52D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.14.54确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.14.53F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.14.53F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.14.55两个计数均在可接受范围内吗?

参数	公式	结果(是/否)
下限	$8.14.52C \text{ 和 } D \geq 8.14.54G$	
上限	$8.14.52C \text{ 和 } D \leq 8.14.54H$	

注:如果任一结果为“否”,则在步骤8.14.56至步骤8.14.63中进行第二组计数。

8.14.56如果适用:进行细胞计数。根据SOP-00314和过程注释5.14,使用NC-200时进行细胞计数和计算。注:可根据预期细胞浓度调整稀释度。

8.14.57如果适用:记录细胞计数的样品体积。

8.14.58如果适用:确定乘法因数。

参数	公式	结果
总细胞计数 样品体积	$8.14.57A+8.14.57B$	C. mL
乘法因数	$C \div 8.14.57A$	D.

8.14.59如果适用:选择方案,输入乘法因数。确保已选择“活细胞计数测定”方案,已输入所有乘法因数、样品体积和稀释液体积。注:如果无需稀释,输入“样品[μL]”=200,“稀释[μL]”=0。

8.14.60如果适用:从Nucleoview记录细胞计数。

8.14.61如果适用:确定平均活细胞浓度和进行计数细胞的活力。

参数	公式	结果
活力	$(8.14.60A+8.14.60B) \div 2$	E. %
活细胞浓度	$(8.14.60C+8.14.60D) \div 2$	F. 个细胞/mL

8.14.62如果适用:确定计数的上限和下限。

参数	公式	结果
下限	$8.14.61F \times 0.9$	G. 个细胞/mL
上限	$8.14.61F \times 1.1$	H. 个细胞/mL

8.14.63如果适用:计数是否在可接受范围内?

参数	公式	结果(是/否)
----	----	---------

下限	8.14.60C和D $\geq$ 8.14.62G	
上限	8.14.60C和D $\leq$ 8.14.62H	

注：如果任一结果为“否”，则进行步骤8.14.64，确定平均值。

8.14.64如果适用：由进行的所有4个计数来确定平均活细胞浓度。

8.14.65计算流式细胞术样品。进行计算，确保用于流式细胞术取样的细胞浓度足够。

Step 8.14.53 F*或 步骤 8.14.61 F*或 步骤 8.14.64 E*的 活细胞浓度 A	6×10^7 TVC 所需的 目标体积 $B = 6 \times 10^7$ 个细胞/A	是否 $B \leq 1.0$ mL? (是/否**)
个细胞/mL	mL	

*圈出用于确定活细胞浓度的步骤参考。**注：如果“否”，则联系区域管理。

8.14.66计算IFN- γ 。对样品进行计算，确保用于IFN- γ 取样的细胞浓度足够。

Step 8.14.53 F*或 步骤 8.14.61 F*或 步骤 8.14.64 E*的 活细胞浓度 A	最少 1.5×10^7 TVC 所需的 目标体积 $B = 1.5 \times 10^7$ 个细胞/A	是否 $B \leq 1.0$ mL? (是/否**)
个细胞/mL	mL	

*圈出用于确定活细胞浓度的步骤参考。**注：如果“否”，则联系区域管理。

8.14.67报告结果。完成提交样品表格的填写。

8.14.68热封。一旦确定样品体积，尽可能靠近袋子热封（按照过程注释5.12）最终产物袋，从设备中取出。

8.14.69按照样品计划，贴上标签，收集样品。

样品	容器数量	添加到每个容器的样品体积	容器类型	目的
*支原体	1	1.0 mL	15 mL 锥形瓶	登录
内毒素	2	1.0 mL	2 mL 冻存管	登录
革兰染色	1	1.0 mL	2 mL 冻存管	登录
IFN-g	1	1.0 mL	2 mL 冻存管	登录
流式细胞术	1	1.0 mL	2 mL 冻存管	登录
**Bac-T 无菌性	2	1.0 mL	Bac-T 瓶	登录
QC 保留	4	1.0 mL	2 mL 冻存管	CRF
附属小管	10	0.5 mL	2 mL 冻存管	CRF

*注：对于支原体样品，将上方配制的细胞悬液体积添加至步骤8.12.55标记为“支原体

稀释液”的15mL锥形管中。

****注:**进行步骤8.14.70的Bac-T接种。

8.14.70 无菌和BacT。测试采样。在BSC中,使用适当大小的注射器从上面收集的保留的细胞悬液中取出1.0mL样品,接种厌氧瓶。对有氧瓶重复上述步骤。注:储存的Bac-T瓶应在室温下避光保存。

8.14.71 贴好标签,储存样品。给所有样品贴上样品计划库存标签,妥善保存直至转移登录。进行下一步以冷冻保存最终产品和样品。注:有关最终产品和样品的冷冻保存,参见8.15节。

8.14.72 签名,取样。确保完成LIMS样品计划表,取出样品。

8.14.73 样品提交。第22天将所有测试样品提交登录。

8.14.74 环境监测。处理后,对BSC和人员监控进行验证。

8.14.75 检查8.14节

8.15 最终产品冷冻保存

8.15.1 准备控速冷冻机。确认已在冻结之前设置CRF。记录CRF设备。进行冷冻保存。

8.15.2 设置CRF探针。刺破CRF空白袋上的隔膜。插入6mL样品瓶温度探针。

8.15.3 将最终产品和样品置于CRF中。将空白袋放入预处理的盒中,转移至CRF机架的约中间位置。将最终产品盒转移至CRF样品架中,将样品瓶转移至CRF样品瓶架中。

8.15.4 将最终产品和样品置于CRF中。将产品架和样品瓶架转移至CRF中。在步骤8.15.5记录产品转移至CRF中的时间和反应室温度。注:将盒和样品瓶架均匀分布在CRF中,在每个架子之间留出尽可能大的空间。

8.15.5 确定达到 $4^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 所需的时间并进行CRF运行。箱内温度达到 $4^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 后,开始运行。记录时间。

参数	公式	值
最终产品转移到CRF的时间	(某时某分)	
最终产品转移到CRF的温度	从监视器读出	$^{\circ}\text{C}$
B. CRF开始时间	(某时某分)	
从配制到CRF开始所经过的时间	$C = B - \text{步骤} 8.14.25A$	min

8.15.6 完成CRF,储存。运行完成后停止CRF。从CRF取出盒子和小管。将盒和小管转移至气相 LN_2 进行储存。记录储存位置。

后处理 (Post Processing) 概述

- 后处理:最终药物产品
 - o (第22天) 在REP第22天通过流式细胞术测定CD3+细胞
 - o (第22天) 革兰染色法 (GMP)
 - o (第22天) 通过凝胶凝块LAL测定 (Gel Clot LAL Assay) 进行细菌内毒素测试 (GMP)
 - o (第16天) BacT无菌性测定 (GMP)
 - o (第16天) 通过TD-PCR检测支原体DNA (GMP)
 - o 合格外观属性 (步骤8.14.43)
 - o (第22天) BacT无菌性测定 (GMP)
 - o (第22天) IFN- γ 测定

实施例2:使用TALE核酸酶对冷冻保存的TIL治疗进行基因编辑

[0601] 该实施例描述了结合TIL生产过程使用的基因编辑步骤(例如图20所示的过程)。

[0602] 人TIL电穿孔的优化如下进行。源自黑色素瘤的4至6个pre-REP TIL系将被鉴定为表达>25%PD1。选定的TIL细胞系将被解冻、静息和活化,每次操作1个细胞系。五百万个活化的TIL将与以下对照或测试RNA中的每个一起进行电穿孔:无电穿孔对照(NE);无RNA对照;绿色荧光蛋白(GFP)mRNA转染对照、CD52 TALEN KO对照、PD1 TALEN、LAG-3TALEN和TIM-3TALEN。将对活细胞进行计数,预留等分试样用于转染效率测量(GFP表达)。经电穿孔的细胞将通过REP扩增。将评估Post-REP TIL的细胞活力和倍数扩增(细胞计数器)和靶基因敲落(流式和qPCR)。目标结果是活力>80%或NE的10%以内;转染率>70%;TIL倍数扩增为NE的30%以内;以及敲除>50%。

[0603] TIL生产过程的TALEN介导的PD-1敲除如下进行。使用来自多种组织学的多达6种新鲜肿瘤,可包括黑色素瘤、肉瘤以及乳腺癌和肺癌。研究规模的准备将根据图20和21所示的过程进行。将在每个过程的预定时间点来施加先前实验的电穿孔条件。Post-REP TIL将进行以下评估:细胞活力和倍数扩增(细胞计数器);细胞表型(流式细胞术);TCRV β 库(流式);T细胞效应子功能(再刺激后产生IFN- γ);以及靶基因敲落(流式和qPCR)。目标结果是:活力>80%或在NE的10%以内;转染率>70%;扩增倍数为NE的30%以内;与过程2A产生的TIL相比,T细胞谱系/亚群维持;TIL效力足够;以及PD-1敲除>50%。在此项研究之后,将进行PD-1敲落的TIL的全规模制备和充分表征。

[0604] 除PD-1之外,还将进行检测以验证两个另外的靶基因的沉默。

实施例3:TIL中TALEN介导的PD-1的失活

[0605] 该实施例描述了结合本文所述TIL生产过程的TALEN介导的PD-1的失活(例如图20或图21所示过程)。TIL生产过程可包括预先将OKT-3和/或4-1BB激动剂加入到细胞培养基中,例如如图21的实施方式2所示。可选地,可以在第一次扩增或第二次扩增的第0天或第1天开始添加OKT-3和/或4-1BB激动剂。

[0606] 可根据Menger等,Cancer Res.,2016年4月15日,76(8):2087-93;Gautron等,Molecular Therapy:Nucleic Acids 2017,9:312-321或美国专利号9,458,439描述的方法(其各自公开内容通过引用并入本文)进行TALEN的构建和电穿孔。例如,可使用由Daboussi等,Nat Commun 2014,5:3831(其内容通过引用并入本文)所述的固相组装方法来产生靶向PD-1基因的TALEN,或者如Gautron,Molecular Therapy:Nucleic Acids 2017,9:312-321所述,其可购自Trilink Biotechnologies或其他供应商。可采用Gautron等,Molecular Therapy:Nucleic Acids 2017,9:312-321和本文其他地方所述的方法来活化TIL,其中,使用Dynabeads人T-蛋白活化因子CD3/CD28磁珠(购自Invitrogen),以1:1比率的CD3+磁珠:细胞或人T细胞活化因子CD3/CD28抗体复合物(例如Immunocult CD3/CD28活化因子,购自StemCell Technologies)来活化TIL。电穿孔之前,可使用Agile Pulse BTX系统(Harvard Apparatu),将总共 5×10^6 TIL/180 μ L BTX Cytoporation培养基T与约10至20 μ g的体外转录的TALEN mRNA(mMESSAGE mMACHINE T7试剂盒;Ambion)混合。可通过本文其他地方所述的pre-REP和REP方法扩增电穿孔的细胞。将评估Post-REP TIL的细胞活力和倍数扩增(细胞计数器)和PD-1敲落(流式和qPCR)。目标结果是活力>80%或在“未电穿孔”(NE)对照的10%以内;转染率>70%;TIL倍数扩增为NE的30%以内;以及PD-1敲除>50%。可使用本领域已知

的电穿孔方法,例如美国专利号6,010,613和6,078,490中描述的那些,其公开内容通过引用并入本文。

[0607] 可使用本文所述的方法或如下进行脉冲电穿孔优化。为了确定可转染细胞的电压范围,对TIL进行了第一系列的实验。测试了五个不同的程序:

程序	第 1 组				第 2 组				第 3 组			
	脉冲	V	持续时间 (ms)	间隔 (ms)	脉冲	V	持续时间 (ms)	间隔 (ms)	脉冲	V	持续时间 (ms)	间隔 (ms)
1	1	600	0.1	0.2	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2
2	1	900	0.1	0.2	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
3	1	1200	0.1	0.2	1	1200	0.1	100	4	130	0.2	2
4	1	1200	0.1	10	1	900	0.1	100	4	130	0.2	2
5	1	900	0.1	20	1	600	0.1	100	4	130	0.2	2

[0608] 可使用不同电穿孔程序,在含有约20 μ g的编码GFP的质粒和对照质粒pUC的0.4cm间隙的比色皿(约10⁶个细胞/mL的量级)中,对TIL进行电穿孔。电穿孔后约24小时,通过流式细胞术分析电穿孔细胞中的GFP表达,以确定转染效率。国际专利申请公开号W0 2014/184744和美国专利申请公开号US 2013/0315884 A1(其公开内容通过引用并入本文)先前已报道了TIL中质粒电穿孔所需的最小电压,程序3和程序4各自允许TIL的有效TALEN导入过程。

[0609] 图23所示的TALEN构建体靶向Pdcd1基因的外显子2(如图所示),并可用于PD1的失活。

[0610] 提供以上提出的实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的组合物、系统和方法的实施方式的完整公开和描述,并不意图限制发明人认为是其发明的范围。对于本领域技术人员显而易见的用于实施本发明的上述模式的修改旨在落入所附权利要求的范围内。本说明书中提及的所有专利和出版物表示本发明所属领域的技术人员的技术水平。

[0611] 所有标题和小节名称仅用于清楚和参照目的,并不以任何方式视为限制。例如,本领域技术人员将理解,根据本文所述的本发明的精神和范围,适当地组合来自不同标题和小节的各个方面的有效性。

[0612] 本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文,并且出于所有目的,其程度如同每个单独的出版物或专利或专利申请被明确地和单独地指出通过引用整体并入用于所有目的。

[0613] 在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可对本申请进行许多修改和变化,这对本领域技术人员来说是显而易见的。这里描述的具体实施方式和实施例仅作为示例提供,并且本申请仅受所附权利要求以及权利要求所赋予的等同物的全部范围的限制。

序列表

<110> 艾欧凡斯生物治疗公司(Iovance Biotherapeutics, Inc.)

<120> 肿瘤浸润淋巴细胞的基因编辑及其在免疫治疗中的用途

<130> 116983-5037

<150> US 62/663,885

<151> 2018-04-27

<150> US 62/680,821

<151> 2018-06-05

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 莫罗单抗重链

<400> 1

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
          20           25           30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35           40           45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
          50           55           60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
          115          120          125
Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
          130          135          140
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145          150          155          160
Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

```

				165						170					175
Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser
				180						185					190
Thr	Trp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser
				195						200					205
Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
				210						215					220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
225							230				235				240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
				245						250					255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260						265					270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				275						280					285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
				290						295					300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
305							310				315				320
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
				325						330					335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340						345					350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				355						360					365
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
				370						375					380
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
385							390				395				400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410					415
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420						425					430
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				435						440					445
Gly	Lys														
				450											
<210>	2														
<211>	213														

<212> PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 莫罗单抗轻链

 $\langle 400 \rangle$ 2[illegible] $\langle 210 \rangle \quad 3$

⟨211⟩ 134

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 重组人IL-2 (rhIL-2)

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 1 5 10 15
 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 35 40 45
 Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 50 55 60
 Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 65 70 75 80
 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 85 90 95
 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 100 105 110
 Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
 115 120 125
 Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 4

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 阿地白介素

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

	100		105		110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile					
	115		120		125
Ser Thr Leu Thr					
130					
<210> 5					
<211> 130					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 重组人IL-4 (rhIL-4)					
<400> 5					
Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn					
1	5		10		15
Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp					
	20		25		30
Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg					
	35		40		45
Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr					
	50		55		60
Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu					
65	70		75		80
Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly					
	85		90		95
Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn					
	100		105		110
Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys					
	115		120		125
Ser Ser					
130					
<210> 6					
<211> 153					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 重组人IL-7 (rhIL-7)					
<400> 6					
Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val					
1	5		10		15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
 20 25 30
 Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
 35 40 45
 Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
 50 55 60
 Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
 65 70 75 80
 Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
 85 90 95
 Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
 100 105 110
 Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
 115 120 125
 Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
 130 135 140
 Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组人IL-15 (rhIL-15)

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
 1 5 10 15
 Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
 20 25 30
 His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
 35 40 45
 Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
 50 55 60
 Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
 85 90 95
 Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
 100 105 110

Asn Thr Ser

115

<210> 8

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组人IL-21 (rhIL-21)

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val

1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro

20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys

35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg

50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr

65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp

85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser

100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly

115 120 125

Ser Glu Asp Ser

130

<210> 9

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人4-1BB,肿瘤坏死因子受体超家族,成员9

(智人)

<400> 9

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu

1 5 10 15

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro

20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys		
35	40	45
Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile		
50	55	60
Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser		
65	70	75
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly		
85	90	95
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu		
100	105	110
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln		
115	120	125
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys		
130	135	140
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro		
145	150	155
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala		
165	170	175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu		
180	185	190
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu		
195	200	205
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe		
210	215	220
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly		
225	230	235
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu		
245	250	255

<210> 10
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 鼠4-1BB,肿瘤坏死因子受体超家族,成员9
 (小家鼠)
 <400> 10
 Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
 1 5 10 15
 Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln

20	25	30
Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro		
35	40	45
Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys		
50	55	60
Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr		
65	70	75
His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro		
85	90	95
Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr		
100	105	110
Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn		
115	120	125
Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg		
130	135	140
Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro		
145	150	155
Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu		
165	170	175
Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala		
180	185	190
Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe		
195	200	205
Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln		
210	215	220
Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser		
225	230	235
Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu		
245	250	255

<210> 11

<211> 441

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的重链

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr		
		15

			20				25				30					
Trp	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35				40				45					
Gly	Lys	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe	
			50				55				60					
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65							70				75				80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
			85				90				95					
Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ile	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			100				105				110					
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
			115				120				125					
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
130							135				140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
145			150				155				160					
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	
			165				170				175					
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	
			180				185				190					
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
195							200				205					
Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	
210							215				220					
Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
225			230				235				240					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
			245				250				255					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	
			260				265				270					
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
275							280				285					
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	
290							295				300					
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
305			310				315				320					
Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	
			325				330				335					

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的轻链

<400> 12

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
 85 90 95
 Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的重链可变区

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的轻链可变区

<400> 14

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

⟨210⟩ 15

<211> 6

<212> PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 乌托鲁单抗的重链CDR1

<400> 15

Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5

$\langle 210 \rangle$ 16

<211> 17

<212> PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 乌托鲁单抗的重链CDR2

<400> 16

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 8

⟨212⟩ PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

<223> 乌托鲁单抗的重链CDR3

<400> 17

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的轻链CDR1

<400> 18

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His

1 5 10

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的轻链CDR2

<400> 19

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌托鲁单抗的轻链CDR3

<400> 20

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val

1 5 10

<210> 21

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1					5					10					15					
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Tyr					
				20				25				30								
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile					
				35				40				45								
Gly	Glu	Ile	Asn	His	Gly	Gly	Tyr	Val	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Glu					
				50				55				60								
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu					
65					70				75				80							
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala					
				85				90				95								
Arg	Asp	Tyr	Gly	Pro	Gly	Asn	Tyr	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp	Gly					
				100				105				110								
Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser					
				115				120				125								
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala					
				130				135				140								
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val					
145					150				155				160							
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala					
				165				170				175								
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val					
				180				185				190								
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His					
				195				200				205								
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly					
				210				215				220								
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser					
225					230				235				240							
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg					
				245				250				255								
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro					
				260				265				270								
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala					
				275				280				285								
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val					
				290				295				300								
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr					
305					310				315				320							

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的可变重链

<400> 23

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
 115 120

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的可变轻链

<400> 24

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
           20           25           30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
           35           40           45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
           50           55           60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65           70           75           80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
           85           90           95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
           100          105          110

```

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR1

<400> 25

```

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1           5

```

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR2

<400> 26

```

Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1           5           10           15

```

<210> 27

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的重链CDR3

<400> 27

Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR1

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR2

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 乌瑞鲁单抗的轻链CDR3

<400> 30

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr

1 5 10

<210> 31

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Fc结构域

<400> 31

Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				20					25					30	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				35				40					45		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
				50				55					60		
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
65					70					75					80
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				85					90					95	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				100					105					110	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
				115					120					125	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
				130					135				140		
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
145					150					155					160
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
				165					170					175	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				180					185					190	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
				195					200				205		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
				210				215				220			
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
225					230										
<210>	32														
<211>	22														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	接头														
<400>	32														
Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
1				5					10					15	

Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20

<210> 33

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 33

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20

<210> 34

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 34

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys

1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20

25

<210> 35

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 35

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys

1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20

25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 36

Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Cys
1				5						10					15	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu				
				20						25						

<210> 37

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 37

Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ser	Cys
1				5						10					15	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu				
				20						25						

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 38

Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
1				5						10					15	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu									
				20												

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 39

Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	
1				5						10					15	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu										

20

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 40

Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu

20

<210> 41

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 41

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His

1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20

25

<210> 42

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Fc结构域

<400> 42

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

20

25

30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

35

40

45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

50

55

60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

65	70	75	80
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
	85	90	95
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	100	105	110
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
	115	120	125
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
	130	135	140
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys			
145	150	155	160
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
	165	170	175
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
	180	185	190
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
	195	200	205
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
	210	215	220
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
225	230	235	240
Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	245		

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 43

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1

5

10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 44

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 45

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser

1 5 10 15

<210> 46

<211> 254

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4-1BBL

<400> 46

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe

35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser

50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp

65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val

85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp

100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu

115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe

130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser

145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala

				165				170				175			
Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala
				180				185				190			
Arg	Asn	Ser	Ala	Phe	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ala
				195				200				205			
Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Val	His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His
				210				215				220			
Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Arg	Val
225				230				235				240			
Thr	Pro	Glu	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Glu		
				245				250							
<210> 47															
<211> 168															
<212> PRT															
<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 4-1BBL可溶性结构域															
<400> 47															
Leu	Arg	Gln	Gly	Met	Phe	Ala	Gln	Leu	Val	Ala	Gln	Asn	Val	Leu	Leu
1				5				10				15			
Ile	Asp	Gly	Pro	Leu	Ser	Trp	Tyr	Ser	Asp	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly	Val
				20				25				30			
Ser	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	Tyr	Lys	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu	Leu	Val
				35				40				45			
Val	Ala	Lys	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr	Val	Phe	Phe	Gln	Leu	Glu	Leu	Arg
50				55				60							
Arg	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Leu	His
65				70				75				80			
Leu	Gln	Pro	Leu	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr
				85				90				95			
Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg	Asn	Ser	Ala	Phe	Gly
				100				105				110			
Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Ser	Ala	Gly	Gln	Arg	Leu	Gly	Val
				115				120				125			
His	Leu	His	Thr	Glu	Ala	Arg	Ala	Arg	His	Ala	Trp	Gln	Leu	Thr	Gln
130				135				140							
Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Thr	Pro	Glu	Ile	Pro	Ala
145				150				155				160			
Gly	Leu	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Glu								

165

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4B4-1-1版本1的可变重链

<400> 48

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Val	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Gly	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Ser	Phe	Thr	Thr	Ala	Arg	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser										

115

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4B4-1-1版本1的可变轻链

<400> 49

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Asp	Tyr
			20					25					30		
Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55						60			

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4B4-1-1版本2的可变重链

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 4B4-1-1版本2的可变轻链

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr

20	25	30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser	His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile	
35	40	45
Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> H39E3-2的可变重链

<400> 52

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly		
1	5	10
Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
20	25	30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala		
65	70	75
Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn		
85	90	95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr		
115	120	

<210> 53

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> H39E3-2的可变轻链

<400> 53

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15
Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
          20           25           30
Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
          35           40           45
Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
          50           55           60
Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
65           70           75           80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
          85           90           95
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
          100          105

```

<210> 54

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人OX40 (智人)

<400> 54

```

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1           5           10           15
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
          20           25           30
Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
          35           40           45
Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
          50           55           60
Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65           70           75           80
Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
          85           90           95
Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
          100          105          110
Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
          115          120          125

```

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160
 Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175
 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190
 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205
 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
 225 230 235 240
 Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
 260 265 270
 Thr Leu Ala Lys Ile
 275

<210> 55

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 鼠OX40 (小家鼠)

<400> 55

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
 35 40 45
 Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
 50 55 60
 Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
 65 70 75 80
 Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
 85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg		
100	105	110
Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro		
115	120	125
Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn		
130	135	140
Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu		
145	150	155
Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu		
165	170	175
Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val		
180	185	190
Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro		
195	200	205
Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu		
210	215	220
Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp		
225	230	235
Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr		
245	250	255
Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile		
260	265	270

<210> 56

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的重链

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
1	5	10
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly		
20	25	30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys		
50	55	60
Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu		
65	70	75
		80

Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
Arg	Tyr	Lys	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gly	His	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	
		100					105						110			
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
		115					120						125			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
		130					135						140			
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
145					150					155					160	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165					170						175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
		195					200							205		
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
		210					215						220			
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
225					230					235					240	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245					250						255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265						270	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		275					280						285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295							300		
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
305					310					315					320	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
				325					330						335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340					345						350		
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
		355					360							365		
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
		370					375							380		
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	

385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val			
	405	410	415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
	420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
	435	440	445
Pro Gly Lys			
450			
<210> 57			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 他利昔珠单抗的轻链			
<400> 57			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
	100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
	115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的重链CDR1

<400> 60

Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的重链CDR2

<400> 61

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
 1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的重链CDR3

<400> 62

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的轻链CDR1

<400> 63

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的轻链CDR2

<400> 64

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser

1 5 10

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 他利昔珠单抗的轻链CDR3

<400> 65

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp

1 5

<210> 66

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 11D4的重链

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
225	230	235
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
290	295	300
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
305	310	315
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr		
325	330	335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
340	345	350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
355	360	365

Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
370						375					380				
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
385					390					395					400
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
				405					410					415	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
			420					425					430		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
	435						440								

<210> 67
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 11D4的轻链
 <400> 67

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1			5					10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Trp
		20					25					30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile
	35					40					45				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Pro	Pro
			85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
		100					105						110		
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
	115					120						125			
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130				135					140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
145				150					155					160	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
			165					170						175	

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 11D4的重链可变区

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 11D4的轻链可变区

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 11D4的轻链CDR1

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 11D4的轻链CDR2

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 11D4的轻链CDR3

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 76

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的重链

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35	40	45
Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp		
100	105	110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys		
115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu		
130	135	140
Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro		
145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn		
195	200	205
Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg		
210	215	220
Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
260	265	270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
275	280	285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg		
290	295	300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
340	345	350

Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
355								360						365	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
370								375						380	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met
385								390						395	400
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				405						410				415	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
			420					425						430	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440						445	
Gly	Lys														
450															
<210>	77														
<211>	213														
<212>	PRT														
<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
<220>															
<223>	18D8的轻链														
<400>	77														
Glu	Ile	Val	Val	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro
			100					105					110		
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr
			115					120					125		
Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
			130					135					140		

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 78

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的重链可变区

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 79

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的轻链可变区

<400> 79

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的重链CDR1

<400> 80

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 81

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的重链CDR2

<400> 81

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的重链CDR3

<400> 82

Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10 15

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的轻链CDR1

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 84

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的轻链CDR2

<400> 84

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 85

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 18D8的轻链CDR3

<400> 85

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr

1 5

<210> 86

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的重链可变区

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His			
20	25	30	
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val			
35	40	45	
Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met			
50	55	60	
Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 87

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的轻链可变区

<400> 87

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser			
20	25	30	
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro			
35	40	45	
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala			
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser			
65	70	75	80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg			
85	90	95	
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的重链CDR1

<400> 88

Ser His Asp Met Ser

1 5

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的重链CDR2

<400> 89

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu

1 5 10 15

Arg

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的重链CDR3

<400> 90

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的轻链CDR1

<400> 91

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的轻链CDR2

<400> 92

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu119-122的轻链CDR3

<400> 93

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 94

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的重链可变区

<400> 94

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的轻链可变区

<400> 95

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50			55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg
				85				90						95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 96

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的重链CDR1

<400> 96

Asp	Tyr	Ser	Met	His
1			5	

<210> 97

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的重链CDR2

<400> 97

Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Lys
1				5				10					15		
Gly															

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的重链CDR3

<400> 98

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 99

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的轻链CDR1

<400> 99

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的轻链CDR2

<400> 100

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr

1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Hu106-222的轻链CDR3

<400> 101

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 102

<211> 183

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> OX40L

<400> 102

```

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1           5           10           15
Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
          20           25           30
Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
          35           40           45
Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
          50           55           60
Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65           70           75           80
Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
          85           90           95
Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
          100          105          110
Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
          115          120          125
Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
          130          135          140
Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145          150          155          160
Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
          165          170          175
Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
          180

```

<210> 103

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> OX40L可溶性结构域

<400> 103

```

Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
1           5           10           15
Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
          20           25           30
Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
          35           40           45

```

Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
 50 55 60
 Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
 65 70 75 80
 Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
 85 90 95
 Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
 100 105 110
 Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
 115 120 125
 Cys Val Leu
 130

<210> 104

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> OX40L可溶性结构域 (备选)

<400> 104

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
 20 25 30
 Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
 35 40 45
 Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
 50 55 60
 Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
 65 70 75 80
 Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
 85 90 95
 Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
 100 105 110
 Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 115 120 125

<210> 105

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 008的可变重链

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 106

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 008的可变轻链

<400> 106

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 85 90 95
 Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys

100	105
<210> 107	
<211> 120	
<212> PRT	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 011的可变重链	
<400> 107	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	
20 25 30	
Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly	
50 55 60	
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln	
65 70 75 80	
Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
85 90 95	
Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	
115 120	
<210> 108	
<211> 108	
<212> PRT	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 011的可变轻链	
<400> 108	
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser	
20 25 30	
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser	
35 40 45	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro	
50 55 60	

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 85 90 95
 Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 100 105

<210> 109

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 021的可变重链

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 110

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 021的可变轻链

<400> 110

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

$\langle 220 \rangle$

<223> 023的可变轻链

<400> 112

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Pro
				85					90					95	
Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105							

<210> 113

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链可变区

<400> 113

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115												

<210> 114

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 轻链可变区

<400> 114

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
			35				40					45			
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			50				55					60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
65					70					75				80	
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Asn	Thr	Leu	Pro	Trp
				85						90				95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
				100						105					

<210> 115

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链可变区

<400> 115

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5				10					15		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Gly	Gly	Ile	Tyr	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Asn	Gln	Asn	Phe
			50				55					60			
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Phe	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys

	85		90		95
Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly					
	100		105		110
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro					
	115		120		
<210> 116					
<211> 108					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 轻链可变区					
<400> 116					
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala					
	20		25		30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly					
	50		55		60
Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser					
65	70		75		80
Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu					
	85		90		95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg					
	100		105		
<210> 117					
<211> 122					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 人源化抗体的重链可变区					
<400> 117					
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu					
1	5		10		15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr					
	20		25		30
Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met					
	35		40		45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 118

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的重链可变区

<400> 118

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 119

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的轻链可变区

<400> 119

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25						30	
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40						45		
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala
65					70					75				80	
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105						

<210> 120

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的轻链可变区

<400> 120

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25						30	
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40						45		
Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala
65					70					75				80	
Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105						

<210> 121

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的重链可变区

<400> 121

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Glu	Ser	Asn	Glu	Tyr	Glu	Phe	Pro	Ser	His
			20					25					30		
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Lys	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
			35				40					45			
Ala	Ala	Ile	Asn	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Met
		50				55					60				
Glu	Arg	Arg	Phe	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Thr	Lys	Lys	Thr	Leu	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	His	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala								
			115				120								

<210> 122

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的重链可变区

<400> 122

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Glu	Tyr	Glu	Phe	Pro	Ser	His
			20					25					30		
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Val
			35				40					45			
Ala	Ala	Ile	Asn	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Met
		50				55					60				
Glu	Arg	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 123

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的轻链可变区

<400> 123

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 124

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化抗体的轻链可变区

<400> 124

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg		
85	90	95
Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110
<210> 125		
<211> 138		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 重链可变区		
<400> 125		
Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly		
1	5	10
Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln		
20	25	30
Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr		
65	70	75
Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser		
85	90	95
Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr		
100	105	110
Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp		
115	120	125
Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
130	135	
<210> 126		
<211> 126		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 轻链可变区		
<400> 126		

Met	Arg	Pro	Ser	Ile	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Phe	Trp	Leu	His
1				5					10					15	
Gly	Ala	Gln	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser
			20					25					30		
Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Asp
		35					40					45			
Ile	Asn	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro
	50					55					60				
Arg	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser
65				70					75					80	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile	Ser
			85					90					95		
Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp
			100					105					110		
Asn	Leu	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys		
		115					120					125			

<210> 127

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体PD-1靶序列1

<400> 127

ttctccccag ccctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca 49

<210> 128

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体PD-1靶序列1

<400> 128

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagaga 49

<210> 129

<211> 530

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体重复序列 PD-1-左

<400> 129

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys			
1	5	10	15
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala			
20	25	30	
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly			
35	40	45	
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			
50	55	60	
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn			
65	70	75	80
Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val			
85	90	95	
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala			
100	105	110	
Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu			
115	120	125	
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala			
130	135	140	
Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg			
145	150	155	160
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val			
165	170	175	
Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val			
180	185	190	
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu			
195	200	205	
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu			
210	215	220	
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr			
225	230	235	240
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala			
245	250	255	
Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly			
260	265	270	
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys			
275	280	285	
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala			
290	295	300	
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly			

305	310	315	320
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			
	325	330	335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His			
	340	345	350
Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val			
	355	360	365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala			
	370	375	380
Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu			
385	390	395	400
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala			
	405	410	415
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg			
	420	425	430
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val			
	435	440	445
Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val			
	450	455	460
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu			
465	470	475	480
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu			
	485	490	495
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr			
	500	505	510
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala			
	515	520	525
Leu Glu			
530			
<210> 130			
<211> 529			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 合成的构建体重复序列 PD-1-右			
<400> 130			
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys			
1	5	10	15
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala			

20	25	30
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val	Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly	
35	40	45
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val	Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys	
50	55	60
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val	Val Ala Ile Ala Ser Asn	
65	70	75
Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val	Gln Ala Leu Leu Pro Val	
85	90	95
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val	Val Ala Ile Ala	
100	105	110
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val	Gln Arg Leu Leu	
115	120	125
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val	Val Ala	
130	135	140
Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val	Gln Arg	
145	150	155
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
165	170	175
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
180	185	190
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
195	200	205
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
210	215	220
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
225	230	235
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala		
245	250	255
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
260	265	270
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln		
275	280	285
Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His		
290	295	300
Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly		
305	310	315
Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln		
325	330	335

Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly
 340 345 350
 Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu
 355 360 365
 Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile
 405 410 415
 Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
 420 425 430
 Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val
 435 440 445
 Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
 450 455 460
 Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
 465 470 475 480
 Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
 485 490 495
 Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
 500 505 510
 Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu
 515 520 525

Glu

<210> 131

<211> 530

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体重复序列 PD-1-左

<400> 131

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50	55	60
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His		
65	70	75
Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
85	90	95
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala		
100	105	110
Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
115	120	125
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala		
130	135	140
Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
145	150	155
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
165	170	175
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
180	185	190
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
195	200	205
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
210	215	220
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
225	230	235
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala		
245	250	255
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
260	265	270
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys		
275	280	285
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
290	295	300
His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly		
305	310	315
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
325	330	335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn		
340	345	350
Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
355	360	365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380
 Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525
 Leu Glu
 530
 <210> 132
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的构建体重复序列 PD-1-右
 <400> 132
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
	85	90 95
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala		
	100	105 110
Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		
	115	120 125
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala		
	130	135 140
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
145	150	155 160
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
	165	170 175
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
	180	185 190
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
	195	200 205
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
210	215	220
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
225	230	235 240
Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala		
	245	250 255
Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
	260	265 270
Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys		
	275	280 285
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala		
290	295	300
His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly		
305	310	315 320
Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
	325	330 335
Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn		
	340	345 350
Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val		
	355	360 365
Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala		
	370	375 380
Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu		

385	390	395	400
Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala			
	405	410	415
Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu			
	420	425	430
Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val			
	435	440	445
Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln			
	450	455	460
Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln			
465	470	475	480
Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr			
	485	490	495
Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro			
	500	505	510
Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu			
	515	520	525

Glu

<210> 133

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体 PD-1-左 TALEN

<400> 133

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggctc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgtctgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgctc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cccagcagg tgggtggcat cgccagcaat 720
ggcggtgga agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840

```

ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 900
 caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
 agccacgatg gcggaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
 caggccacag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag 1140
 caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
 ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat attggtggca agcaggcgct ggagacggtg 1260
 caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc 1320
 atcgccagca ataattggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
 ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1440
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
 ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggaagca ggcgctggag 1560
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1620
 gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 1680
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1740
 ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
 cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataattggtg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1920
 caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
 agcaatggcg gcggaaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
 ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctctgcctt tggcctgcct cggcggcgct 2160
 cctgcgctgg atgcagtga aaagggttg ggggatccta tcagccgtt ccagctggtg 2220
 aagtcgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gactacatcg agctgatcga gatcgcccg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct ggcggctcc 2400
 aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccg cggtacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtacccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttc cggccgactg ataa 2814

<210> 134

<211> 2829

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体 PD-1-右 TALEN

<400> 134

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgagca ccacaggca 180
 ctggctcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
 ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgctcg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acgggtggcg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
 attgcaaaac gtggcggtcg gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
 acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caagtcgtcg caatcgccag caataacgga 540
 gggaagcaag ccctcgaaac cgtgcagcgg ttgttctctg tgctctgcca ggcccacggc 600
 cttacccttg agcaggtggt ggccatcgca agtaacattg gaggaaagca agccttgag 660
 acagtgcagg ccctgttgcc cgtgctgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc 720
 gtggccattg cctccaacat cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca ggccctgctg 780
 cccgtcctct gtcaagctca cggcctgact cccaacaag tggtcgcat cgctctaat 840
 aacggcggga agcaggcact ggaaacagtg cagagactgc tccctgtgct ttgccaagct 900
 catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgct attgcctcaa acaacggggg caagcaggcc 960
 cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctcacgggct cactccaca 1020
 cagggtggtc caattgccag caacggcggc ggaaagcaag ctcttgaaac cgtgcaacgc 1080
 ctctgccccg tgctctgtca ggctcatggc ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc 1140
 agtaataatg gcgggaaaca ggctcttgag accgtccaga ggctgctccc agtgcctgc 1200
 caggcacacg ggctgacccc ccagcaggtg gtggctatcg ccagcaataa tgggggcaag 1260
 caggccctgg aaacagtcca gcgcctgctg ccagtgttt gccaggctca cgggctcact 1320
 cccgaacagg tcgtggcaat cgctccaac ggagggaagc aggctctgga gaccgtgcag 1380
 agactgctgc ccgtcttggt ccaggccac ggactcacac ctcagcaggt cgtcgccatt 1440
 gcctctaaca acgggggcaa acaagccctg gagacagtgc agcggctgtt gcctgtgttg 1500
 tgccaagccc acggcttgac tcctcaaca gtggctcgca tcgcctcaa tggcgcgga 1560
 aaacaagctc tggagacagt gcagagggtg ctgcccgtcc tctgccaagc ccacggcctg 1620
 actccccaac aggtcgtcgc cattgccagc aacggcggag gaaagcaggc tctcgaaact 1680
 gtgcagcggc tgcttctgt gctgtgtcag gctcatgggc tgacccccca gcaagtgggtg 1740
 gctattgcct ctaacaatgg aggcaagcaa gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca 1800
 gtgctgtgcc agggccacgg gctcacacc cagcaggtgg tcgcatcg cagtaacggc 1860
 gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgctgcttc cagtgtctg ccaggcacac 1920
 ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatcccatg atgggggcaa gcaggccctg 1980
 gagaccgtgc agagactcct gccagtgttg tgccaagctc acggcctcac cctcagcaa 2040
 gtcgtggcca tcgcctcaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
 ttatctcgcc ctgatccggc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt cgcttgccc 2160
 tgccctggcg ggctcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc 2220
 cgttcccagc tgggtgaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280

aagtacgtgc cccacgagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccacaggac 2340
 cgtatccttg agatgaaggt gatggagttc ttcatgaagg tgtacggcta caggggcaag 2400
 cacctgggcg gctccaggaa gcccacggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac 2460
 tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggct acaacctgcc catcggccag 2520
 gccgacgaaa tgcagaggta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
 aacgagtggg ggaaggtgta cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc 2640
 ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc 2700
 aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcggcg gcgagatgat caaggccggc 2760
 accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcggcc 2820
 gactgataa 2829

<210> 135

<211> 2814

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体 PD-1-左 TALEN

<400> 135

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
 gctatcgata tcgccgatct acgcacgtc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
 aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacagg cactggtcgg ccacgggttt 180
 acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgtgtgc 240
 aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gagcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
 ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
 agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
 gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
 ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 540
 acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
 gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 660
 ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac 720
 gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 780
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 840
 ctggagacgg tccagcggt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 900
 caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1020
 agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
 caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag 1140
 caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc 1200
 cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
 cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1320

atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
 ctgtgccagg cccacggcctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1440
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
 ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
 gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg 1680
 ccggtgtgtg gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac 1740
 gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc 1800
 cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggcctt gacccccgag 1920
 caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg 1980
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
 agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat 2100
 ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctctgcctt tggcctgcct cggcgggcgt 2160
 cctgcgctgg atgcagtga aaagggttg ggggataccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
 aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggctcc 2400
 aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg ccagcgtgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttc cggccgactg ataa 2814

<210> 136

<211> 2829

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的构建体 PD-1-右 TALEN

<400> 136

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagtgc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacaggcca 180
 ctggctggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccgcagcgc 240
 ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cggttgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420

```

attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtcg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccgag caagtcgtcg caatcgccag ccatgatgga 540
gggaagcaag ccctcgaaac cgtgcagcgg ttgcttcctg tgctctgcca ggcccacggc 600
cttaccctc agcagggtgt ggccatcgca agtaacggag gaggaaagca agccttgag 660
acagtgcagc gcctgttgcc cgtgctgtgc caggcacacg gcctcacacc agagcaggtc 720
gtggccattg cctcccatga cggggggaaa caggctctgg agaccgtcca gaggctgctg 780
cccgtcctct gtcaagctca cggcctgact cccaacaag tggtcgcat cgcctctaata 840
ggcggcgagg agcaggcact ggaacagtg cagagactgc tccctgtgct ttgccaagct 900
catgggttga ccccccaaca ggtcgtcgct attgcctcaa acgggggggg caagcaggcc 960
cttgagactg tgcagaggct gttgccagtg ctgtgtcagg ctcacgggct cactccacaa 1020
cagggtggtc caattgccag caacggcggc ggaaagcaag ctcttgaaac cgtgcaacgc 1080
ctcctgcccg tgctctgtca ggtcatggc ctgacaccac aacaagtcgt ggccatcgcc 1140
agtaataatg gcgggaaaca ggtctttgag accgtccaga ggctgtccc agtgcctctg 1200
caggcacacg ggctgacccc cgagcaggtg gtggctatcg ccagcaatat tgggggcaag 1260
caggccctgg aaacagtcca ggccctgctg ccagtgttt gccaggctca cgggtcact 1320
ccccagcagg tcgtggcaat cgcctccaac ggcgaggga agcaggctct ggagaccgtg 1380
cagagactgc tgcccgtctt gtgccaggcc caggactca cacctgaaca ggtcgtcgcc 1440
attgcctctc acgatggggg caaacaagcc ctggagacag tgcagcggct gttgcctgtg 1500
ttgtgccaag cccacggctt gactcctcaa caagtgtcgc ccatcgctc aaatggcggc 1560
ggaaaacaag ctctggagac agtgcagagg ttgctgcccg tcctctgcca agcccacggc 1620
ctgactcccc aacaggctcg cgccattgcc agcaacaac gaggaaagca ggctctcgaa 1680
actgtgcagc ggctgcttcc tgtgtgtgt caggctcatg ggctgacccc cgagcaagtg 1740
gtggctattg cctctaattg aggcaagcaa gcccttgaga cagtccagag gctgttgcca 1800
gtgctgtgcc agggccacgg gctcacacc cagcaggtgg tcgcatcgcc cagtaacaac 1860
gggggcaaac aggcattgga aaccgtccag cgcctgctc cagtgtctg ccaggcacac 1920
ggactgacac ccgaacaggt ggtggccatt gcatcccatg atgggggcaa gcaggccctg 1980
gagaccgtgc agagactcct gccagtgtt tgccaagctc acggcctcac ccctcagcaa 2040
gtcgtggcca tcgcctcaaa cggggggggc cggcctgcac tggagagcat tgttgcccag 2100
ttatctcgcc ctgatccggc gttggccgcg ttgaccaacg accacctcgt cgccttgccc 2160
tgctcgccg ggctcctgc gctggatgca gtgaaaaagg gattggggga tcctatcagc 2220
cgttcccagc tggatgaagtc cgagctggag gagaagaaat ccgagttgag gcacaagctg 2280
aagtacgtgc cccacgagta catcgagctg atcgagatcg cccggaacag caccaggac 2340
cgtatcctgg agatgaaggt gatggagttc ttcataagg tgtacggcta caggggcaag 2400
cacctggcg gctccaggaa gcccacggc gccatctaca ccgtgggctc ccccatcgac 2460
tacggcgtga tcgtggacac caaggcctac tccggcggt acaacctgcc catcgccag 2520
gccgacgaaa tgcagaggta cgtggaggag aaccagacca ggaacaagca catcaacccc 2580
aacgagtggg ggaagggtga cccctccagc gtgaccgagt tcaagttcct gttcgtgtcc 2640
ggccacttca agggcaacta caaggcccag ctgaccaggc tgaaccacat caccaactgc 2700
aacggcgccg tgctgtccgt ggaggagctc ctgatcgcg gcgagatgat caaggccggc 2760

```

accctgaccc tggaggaggt gaggaggaag ttcaacaacg gcgagatcaa cttcgcggcc 2820
gactgataa 2829

过程2A - 22天的过程，2至3天收获/运输

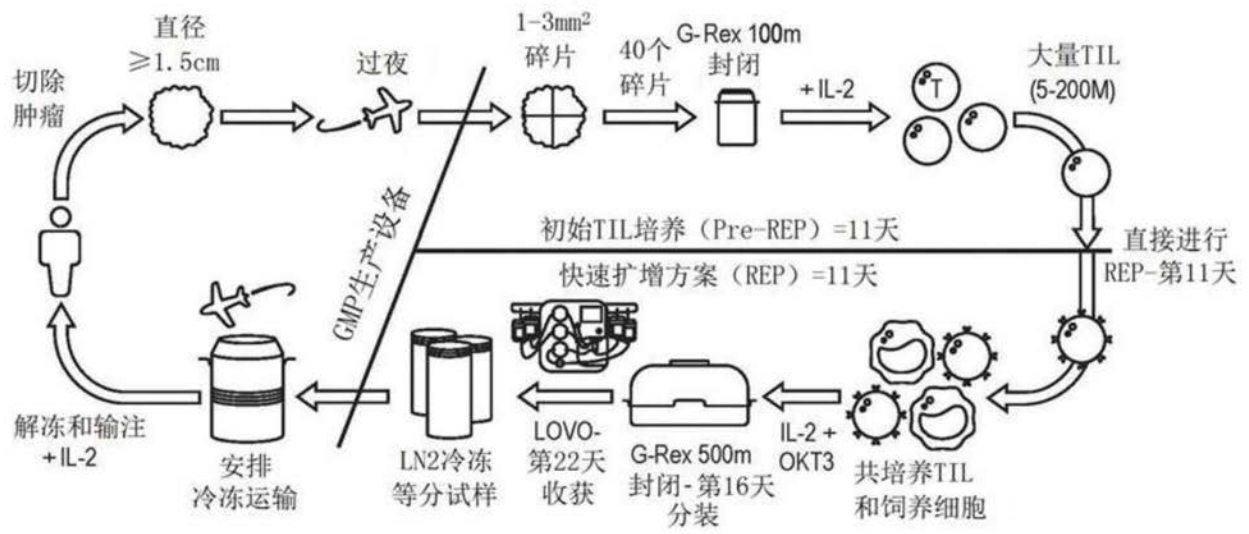


图1

过程发展

步骤	目前过程-1C	新过程-2A	影响
1	4个碎片/10 G-Rex 10-21天	40个碎片/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11天	增加肿瘤样品/容器, 缩短培养, 减少步骤, 适合封闭系统
2	PreREP 冷冻 -> 检测 ->解冻 -~第27天 - >40e6TIL	直接进行REP- 第 11天 - <200e6	缩短过程, 减少步骤, 消除检测
3	36 G-Rex 100~第30天 >5e6TIL - 分装~第36天	4-5 G-Rex 500CS- TIL- 分装第16天	减少步骤, 封闭系统, 缩短REP
4	收获, 第~43+天 通过离心 收获	收获, 第22天 LOVO-自动细胞 洗涤器	减少步骤, 自动化, 封闭系统
5	新鲜产品- Hypothermosol-单个 输液袋	冷冻保存的产品- CS10, 在LN ₂ 中, 多个等分试样	运输灵活性, 患者安排, 发布检测更简单, 全球试验
6	43+天的过程时间	22天的过程时间	患者周转, 洁净室 吞吐量, COG

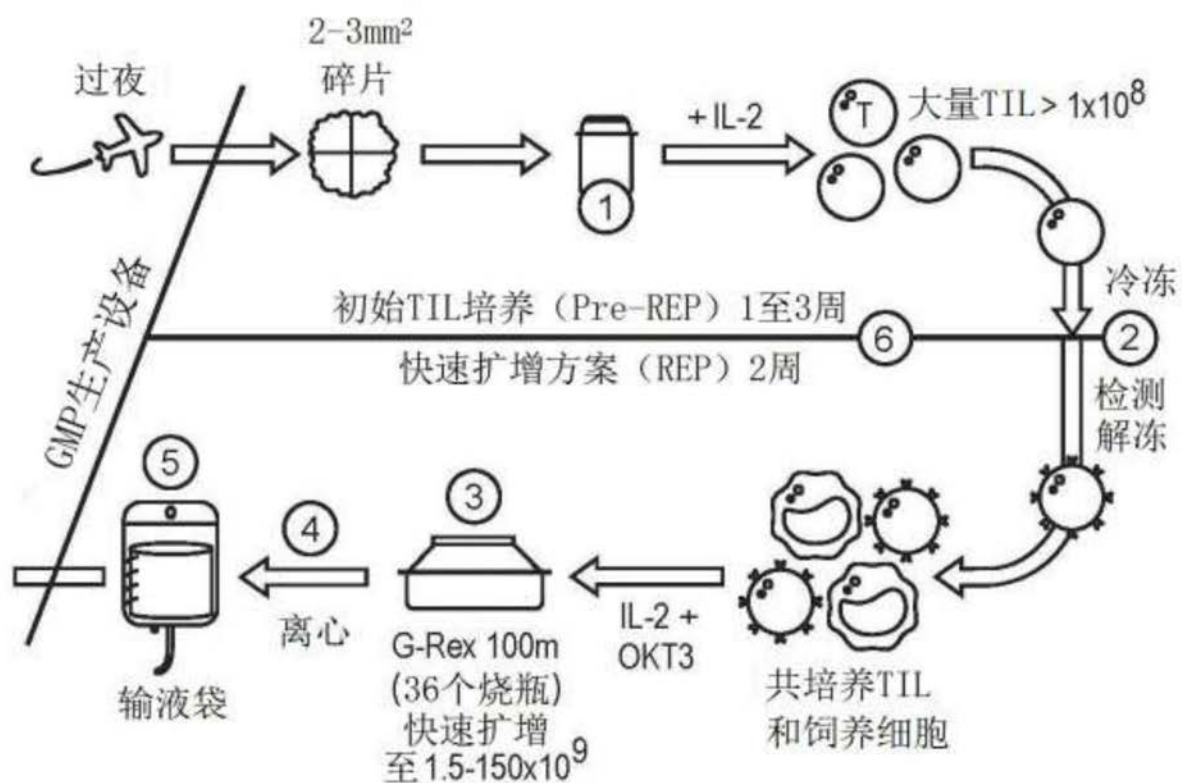


图2

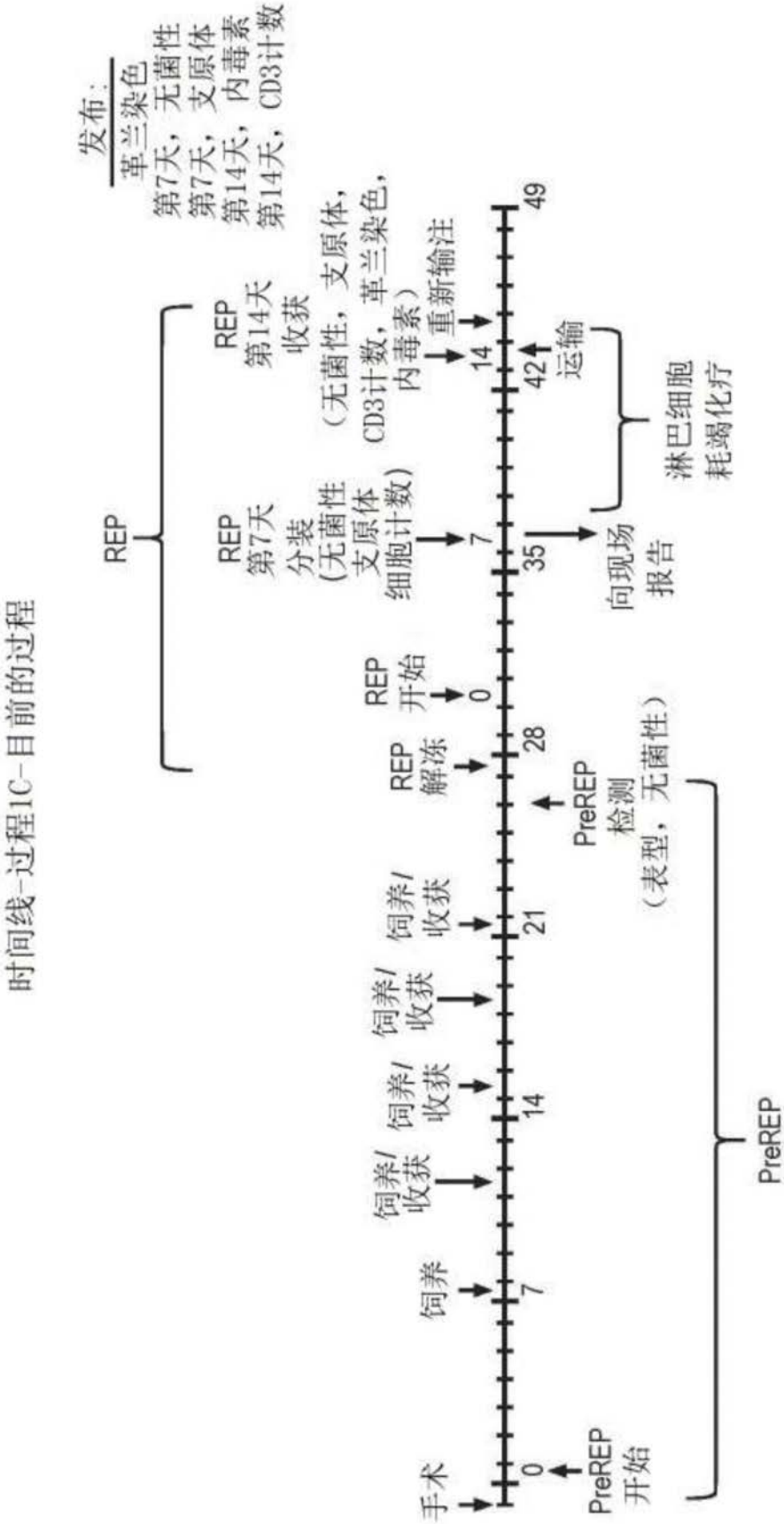


图3

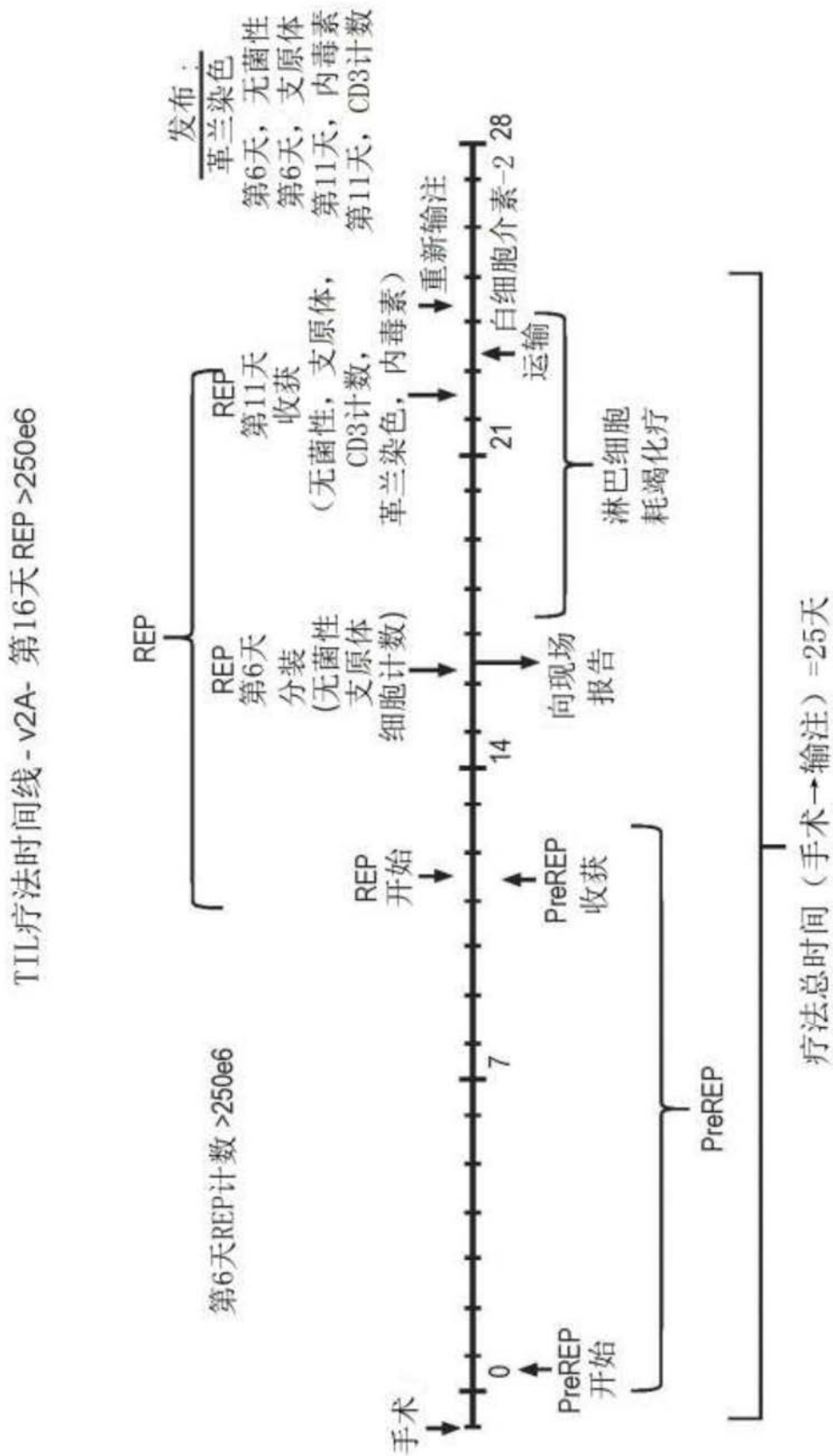


图4

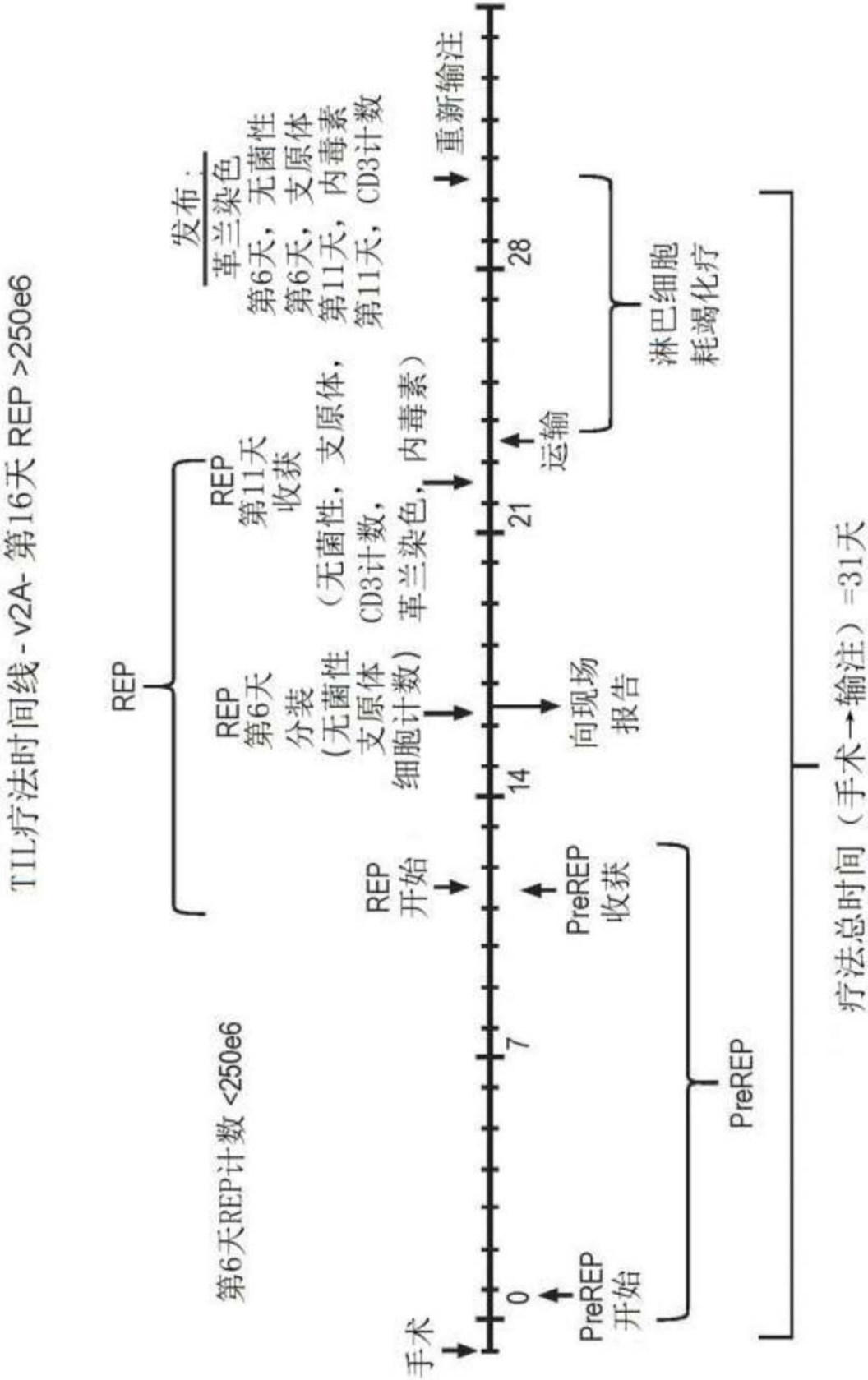


图5

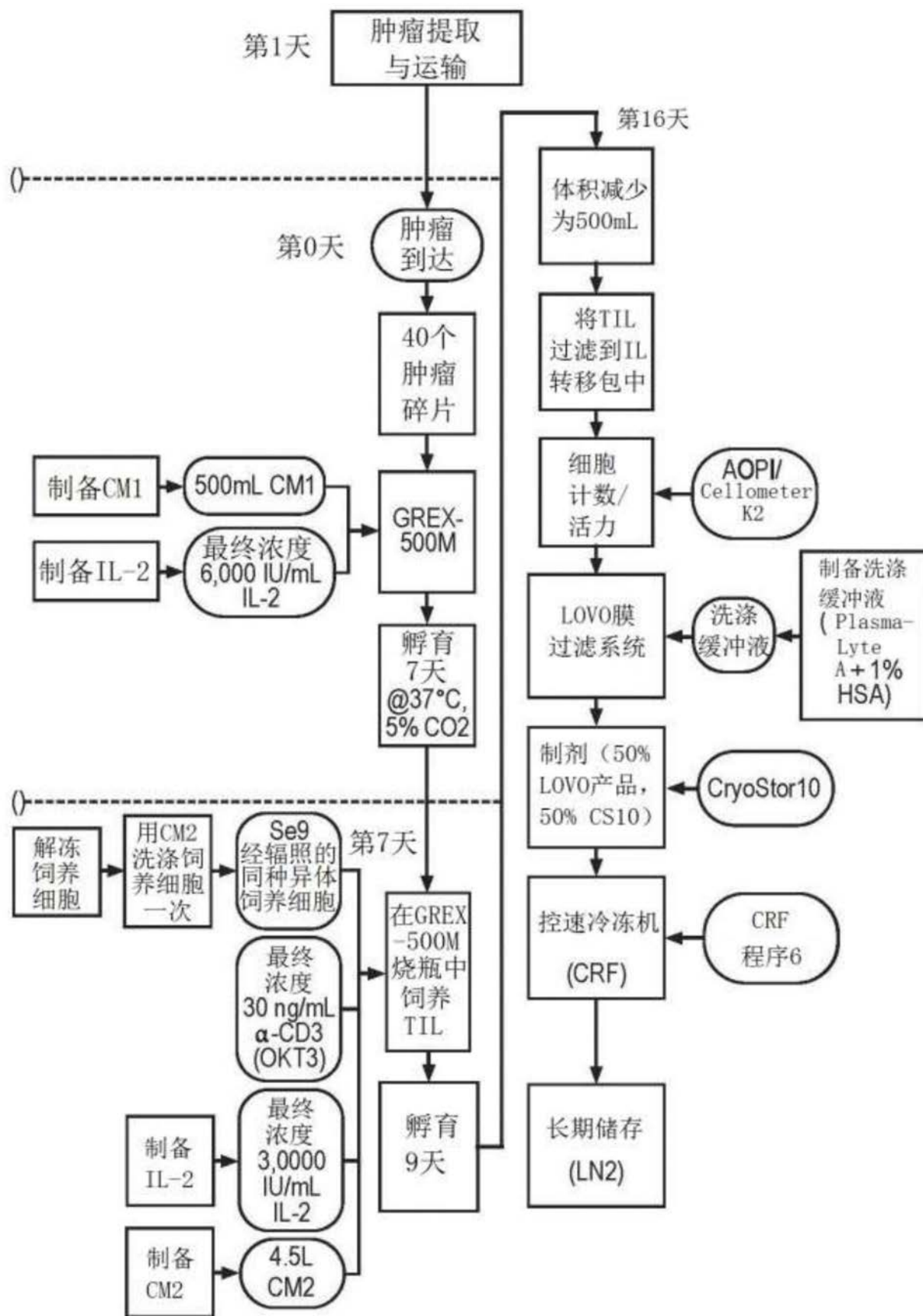


图6

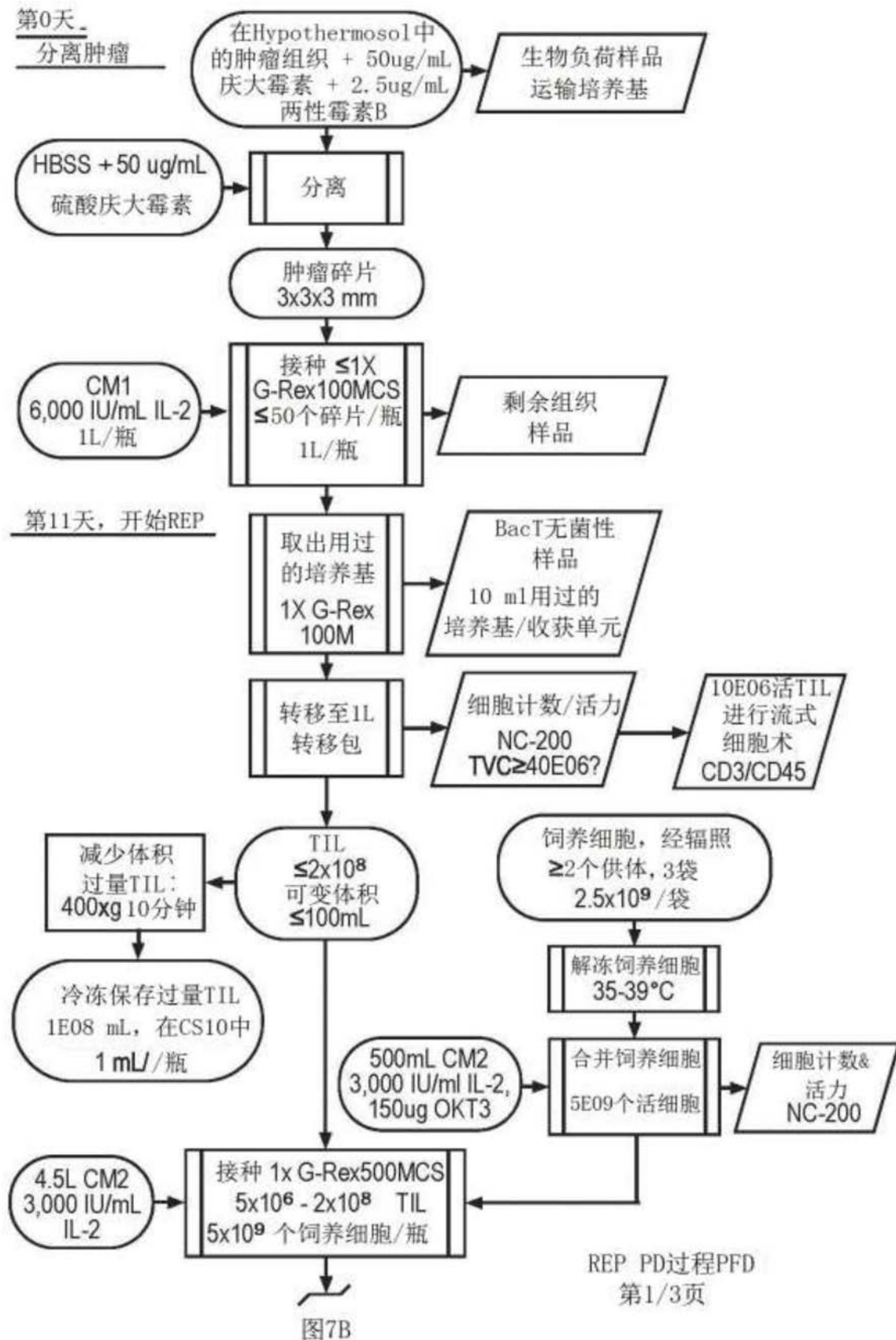
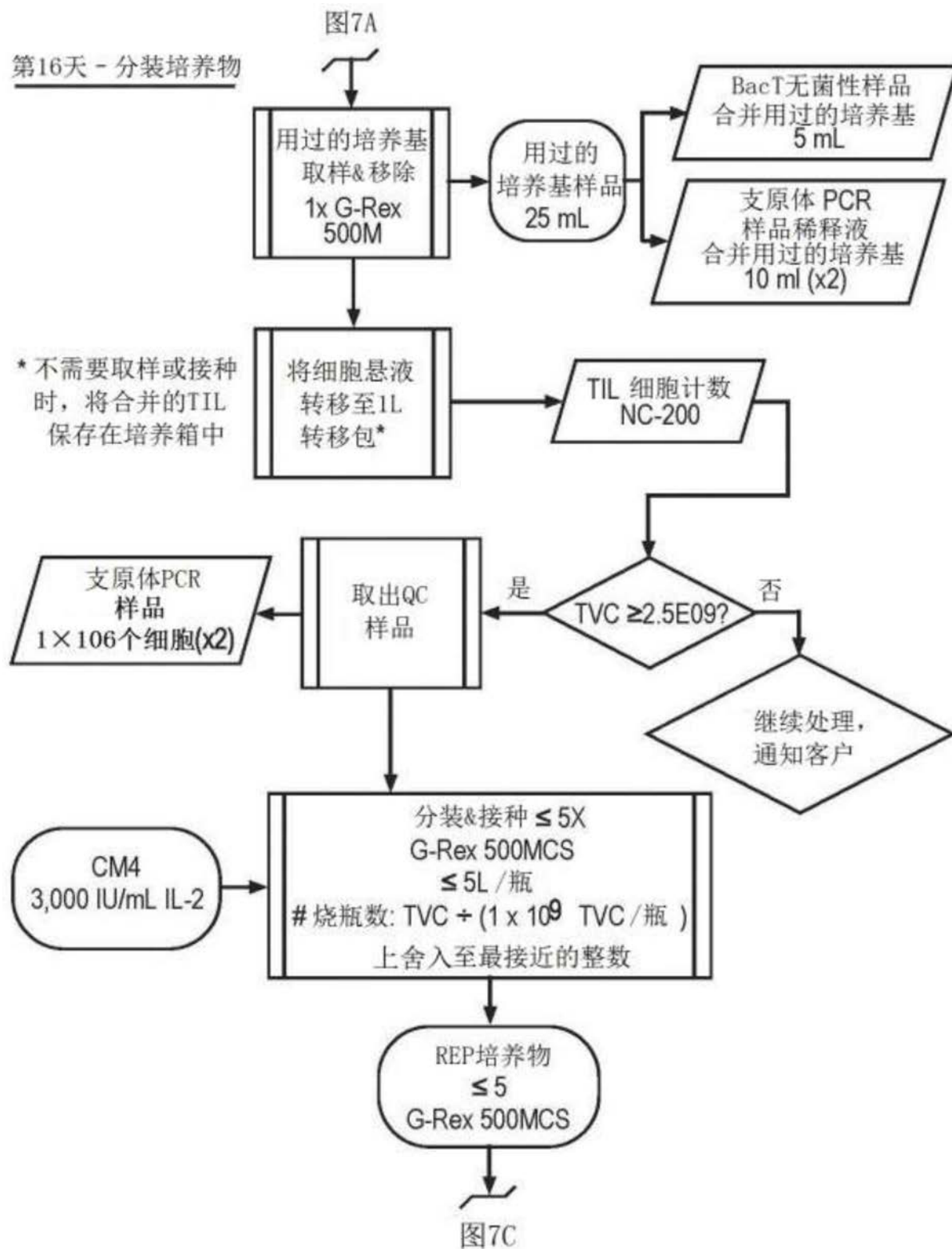


图7A



REP PD过程PFD
第2/3页

图7B

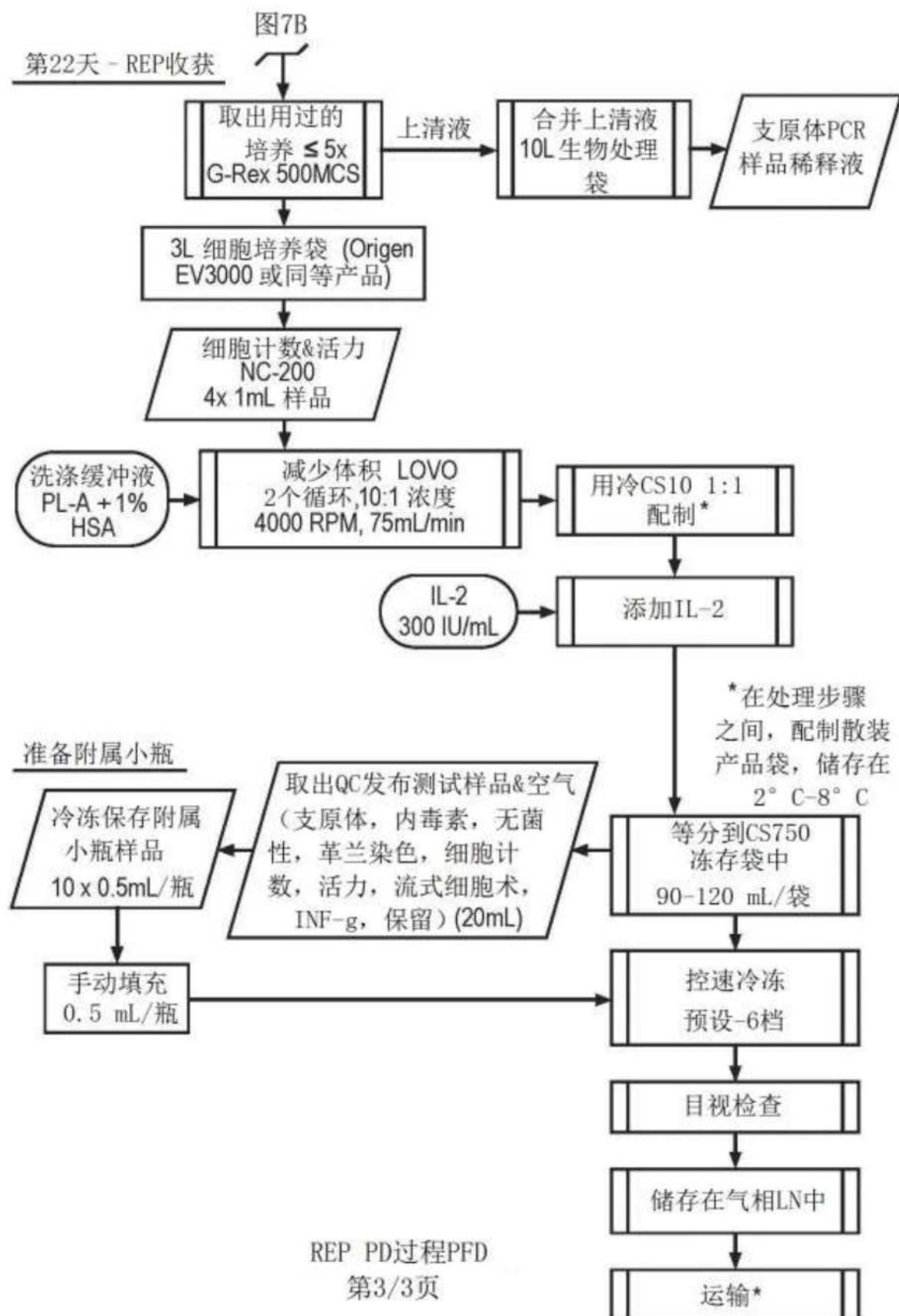


图7C

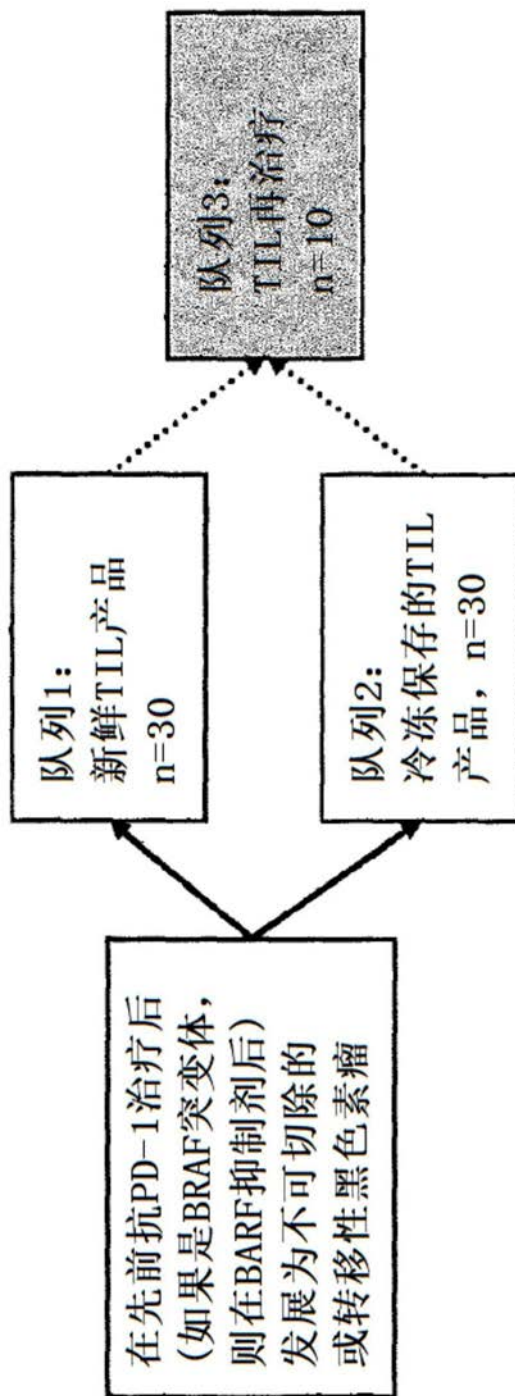


图8

过程2A：步骤A至E约22天**1. 步骤A**

获得患者肿瘤样品

2. 步骤B

碎片化和第一次扩增

3至14天

3. 步骤C

第一次扩增向第二次扩增过渡

不储存，封闭系统

4. 步骤D

第二次扩增

IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞

封闭系统

5. 步骤E

收获步骤D的TIL

封闭系统

6. 步骤F

最终制剂和/或转移至输液袋

(可选地冷冻保存)

图9

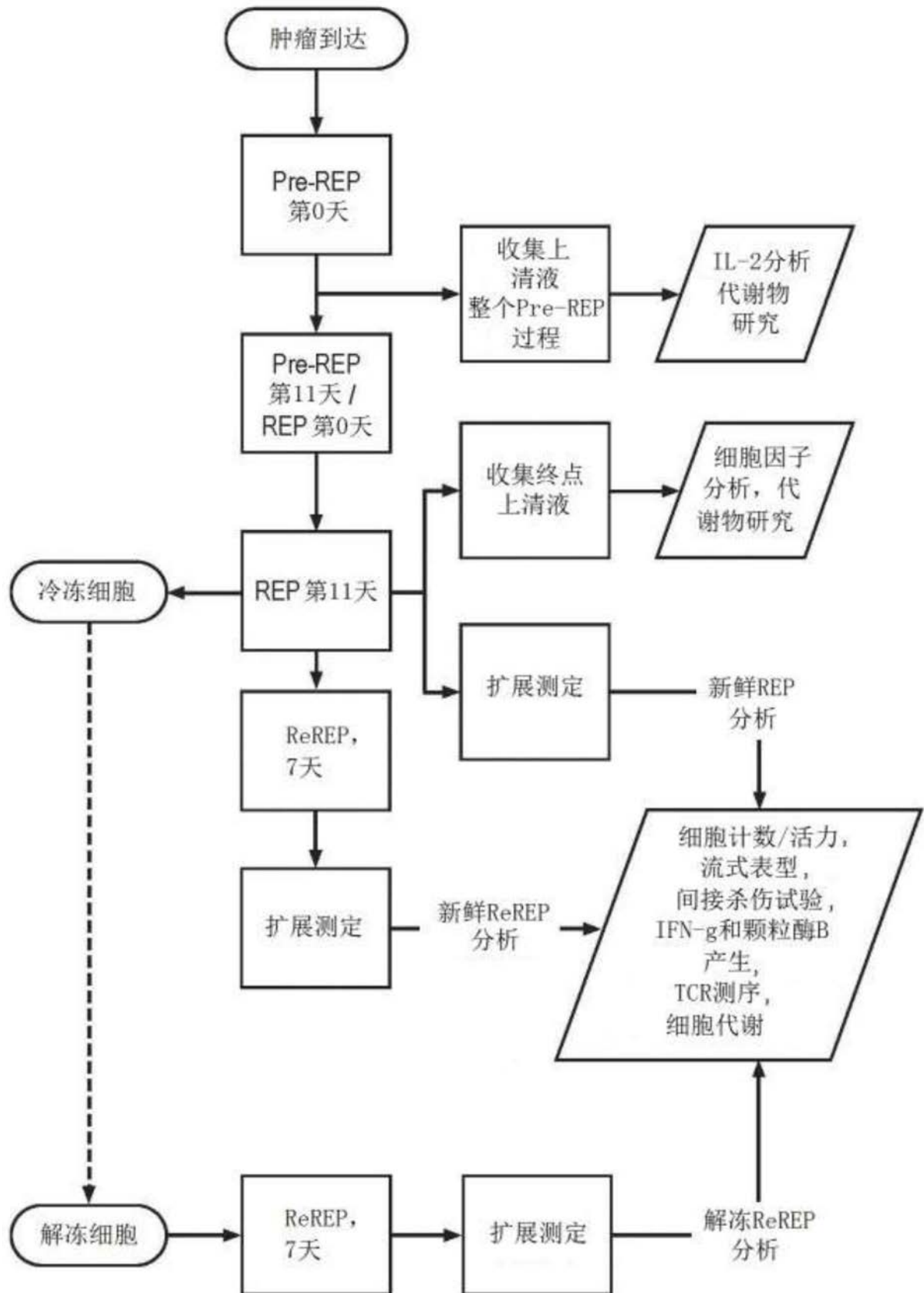


图10

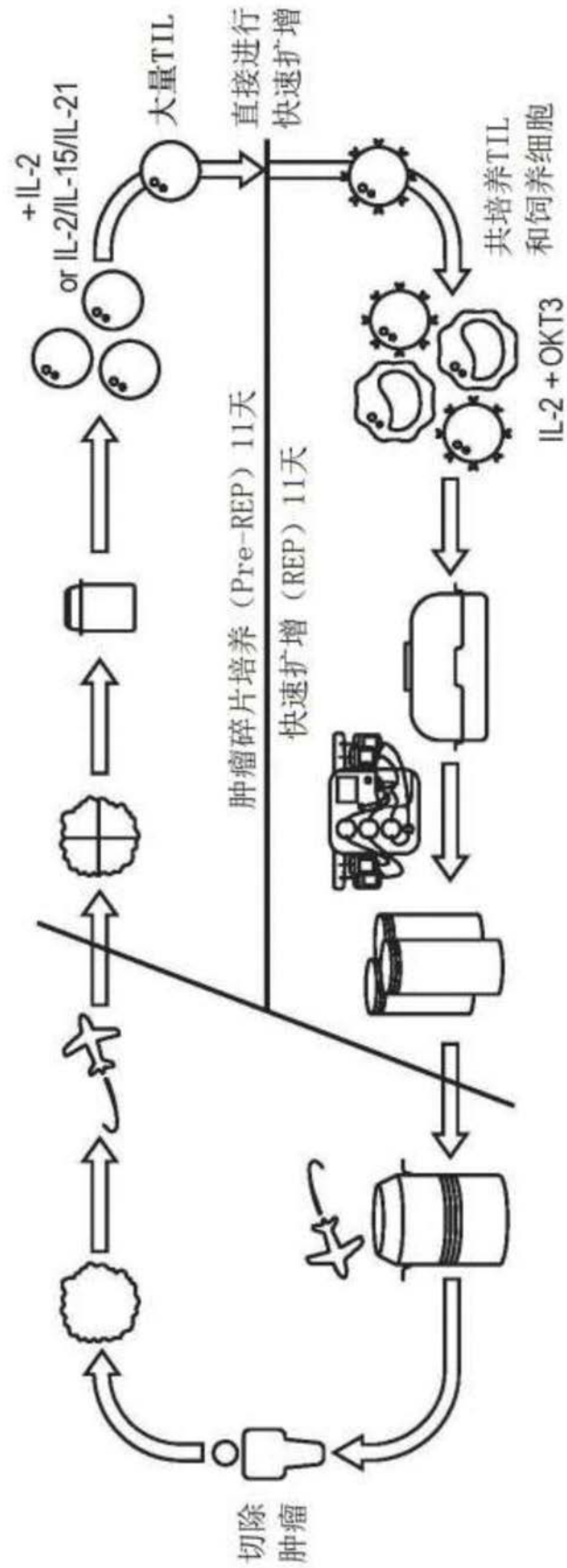


图11

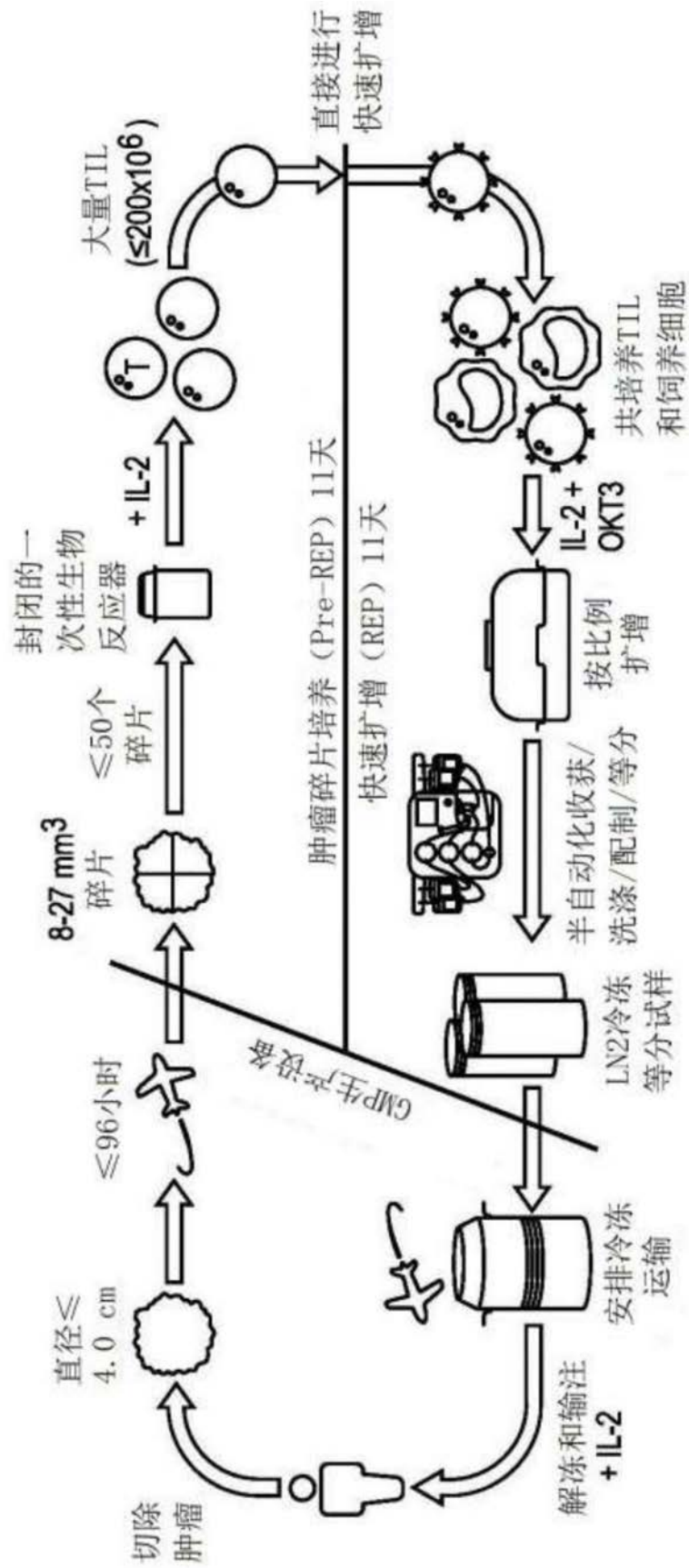


图12

过程1C：步骤A-E，43-55天	过程2A：步骤A-E，约22天
1. 步骤A 获得患者肿瘤样品	2. 步骤A 获得患者肿瘤样品
3. 步骤B 碎片化和第一次扩增 11天至21天	3. 步骤B 碎片化和第一次扩增 3天至14天
3. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 可选地储存，直至筛选	4. 步骤C 第一次扩增向第二次扩增过渡 不储存，且为封闭系统
5. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 可选地重复一次或多次	5. 步骤D 第二次扩增 IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞 封闭的系统
6. 步骤E 收获步骤D的TIL	7. 步骤E 收获步骤D的TIL 封闭的系统
6. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋	8. 步骤F 最终制剂和/或转移至输液袋 (可选地冷冻保存)

图13

过程步骤	过程1C实施方式	过程2A实施方式	优势
Pre-REP	4个碎片/10个 GREX-10烧瓶 11-21天持续时间	40个碎片/1个 GREX-100M烧瓶 11天持续时间	- 每个烧瓶的肿瘤碎片增加 - 培养时间缩短 - 步骤数目减少 - 适合封闭的系统
Pre-REP 向 REP过渡	- 冷冻Pre-REP TIL, 直到进行表型筛选, 然后解冻进行REP (~ 第30天) - REP需要 $>40 \times 10^6$ TIL	- 在第11天, Pre-REP TIL 直接进行REP - REP需要 25-200 $\times 10^6$ TIL	- Pre-REP至REP过程缩短 - 步骤数目减少 - 不用进行表型筛选 - 适合封闭的系统
REP	- 在REP第0天, 6个 GREX-100M烧瓶 - 在REP第0天, 5×10^6 TIL和5×10^8 PBMC 饲养细胞/烧瓶 - 在REP第7天分到 18-36个烧瓶中 14天持续时间	- 在第11天, 1个 GREX-500M烧瓶 - 在第11天, 25-200 $\times 10^6$ TIL和5×10^9 PBMC 饲养细胞 - 在第16天分到 ≤ 6个 GREX-500M烧瓶中 11天持续时间	- 步骤数目减少 - REP持续时间减短 - 烧瓶之间通过封闭系统转移TIL - 封闭系统更换培养基
收获	通过离心收获TIL	通过LOVO自动化细胞洗涤系统收获TIL	- 步骤数目减少 - 自动化洗涤细胞 - 封闭的系统 - 洗涤期间的产物损失减少
最终制剂	- 新鲜产品, 在 Hypothermosol中 - 单个输液袋 - 运输稳定性有限	- 冷冻保存的产品, 在Plasmalyte-A+ 1%HSA和CS10 中, 储存于LN2中 - 多个等分试样 - 运输稳定性更长	- 运输灵活性 - 患者安排灵活 - 发行检测更及时
总体估计过程时间	43-55 天	22 天	患者周转更快

图14

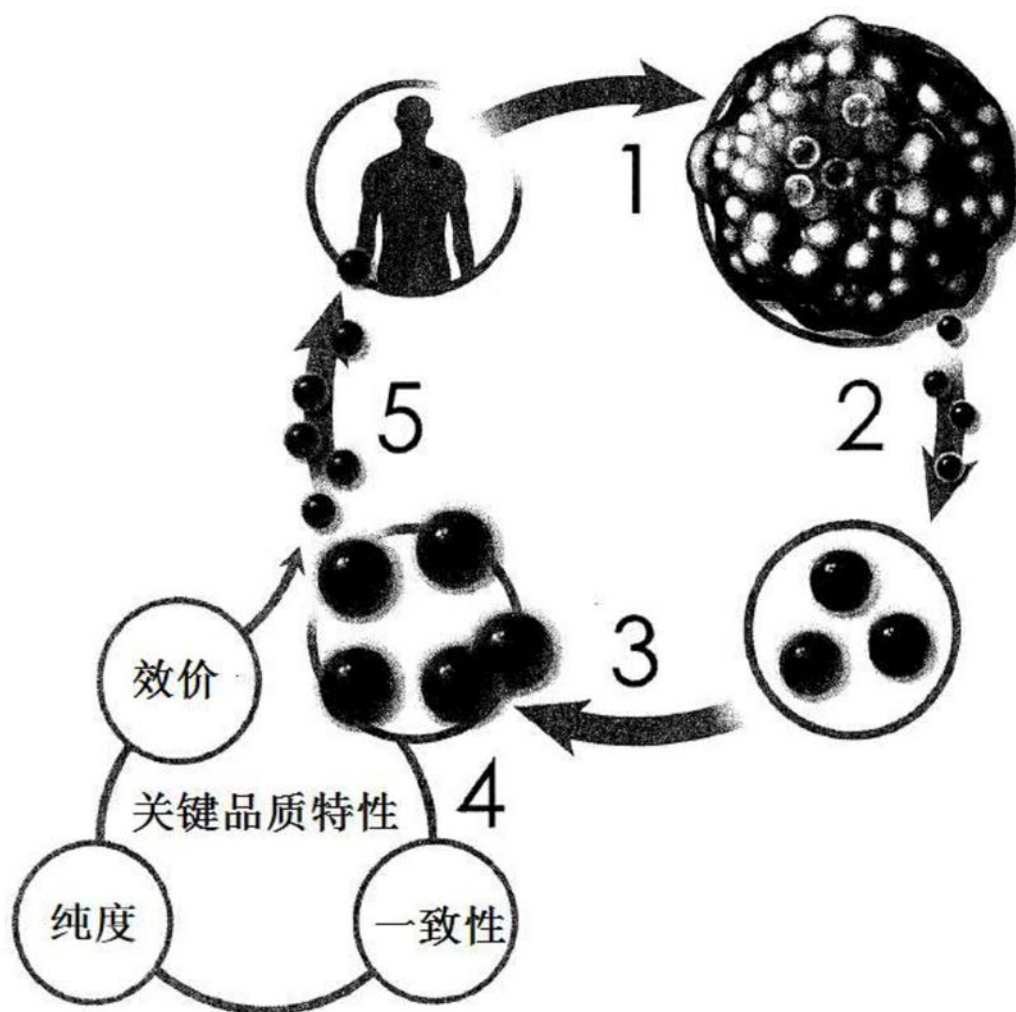


图15

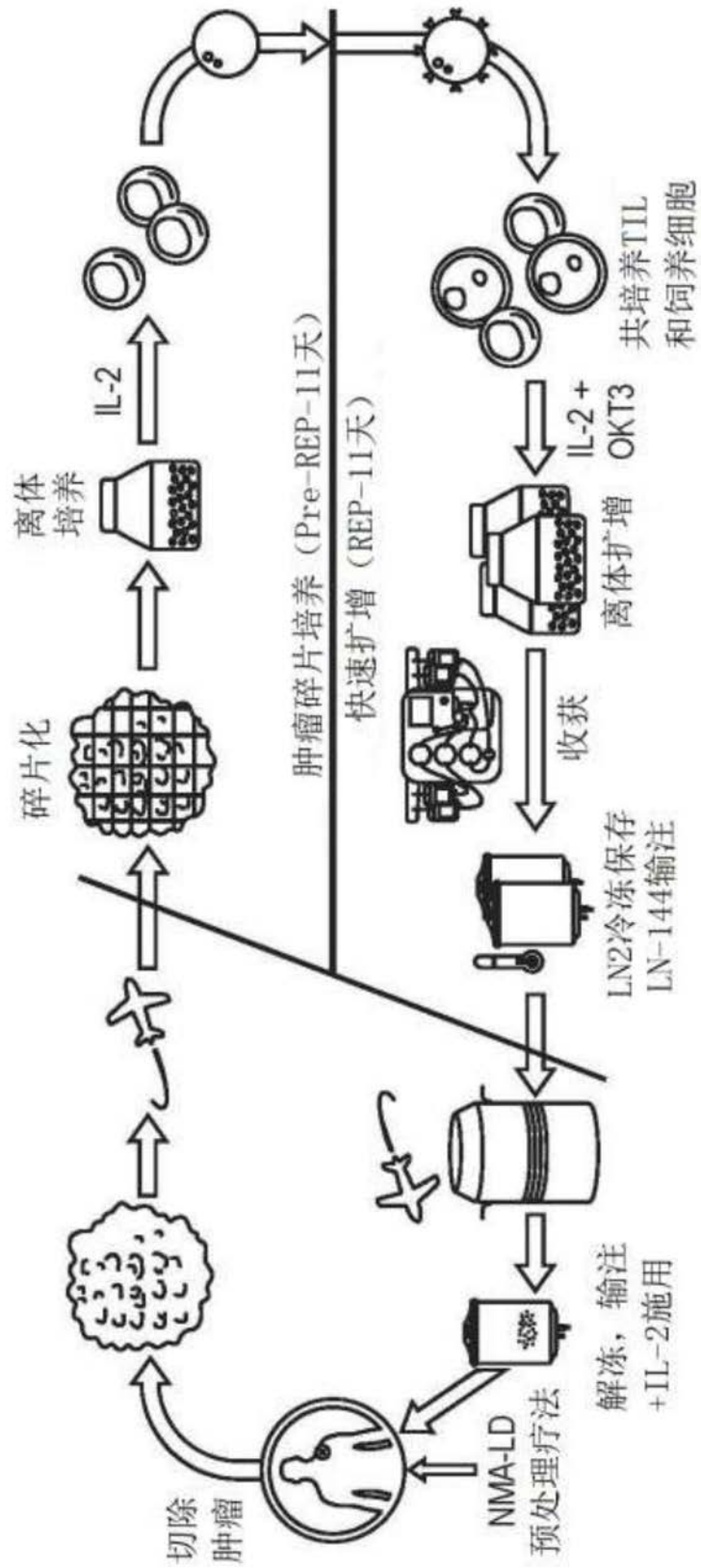


图16

过程步骤	GEN 1	GEN 2	影响
碎片培养	≤21天，多个生物反应器，多个操作员干预	≤11天，单个封闭的生物反应器，无干预	缩短培养，减少干预
TIL筛选	IL-2扩增的TIL 冷冻保存，检测，基于表型进行筛选，解冻，静息，共培养	大量TIL直接进行共培养	减少步骤，消除检测，增加克隆多样性
收获/洗涤	手动减少体积和收获 手动洗涤和浓缩	封闭的半自动化减少体积和收获， 自动洗涤和浓缩	减少操作员干预，减少处理时间，维持功能封闭的系统
制剂	新鲜的低温产品 (2- 8°C)	冷冻保存的产品 (≤ -150°C)	通过提高运输和患者安排的灵活性，实现全球性试验
生产时间	38天的过程时间	22天的过程时间	患者周转，洁净室吞吐量，降低商品成本

图17

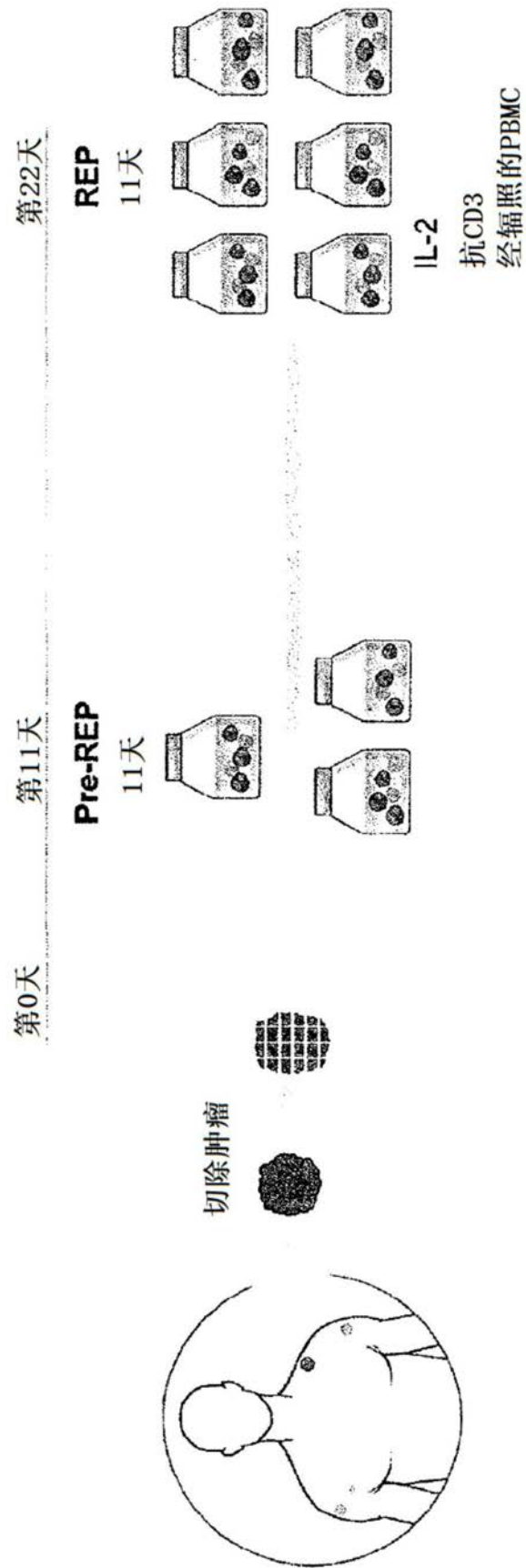


图18

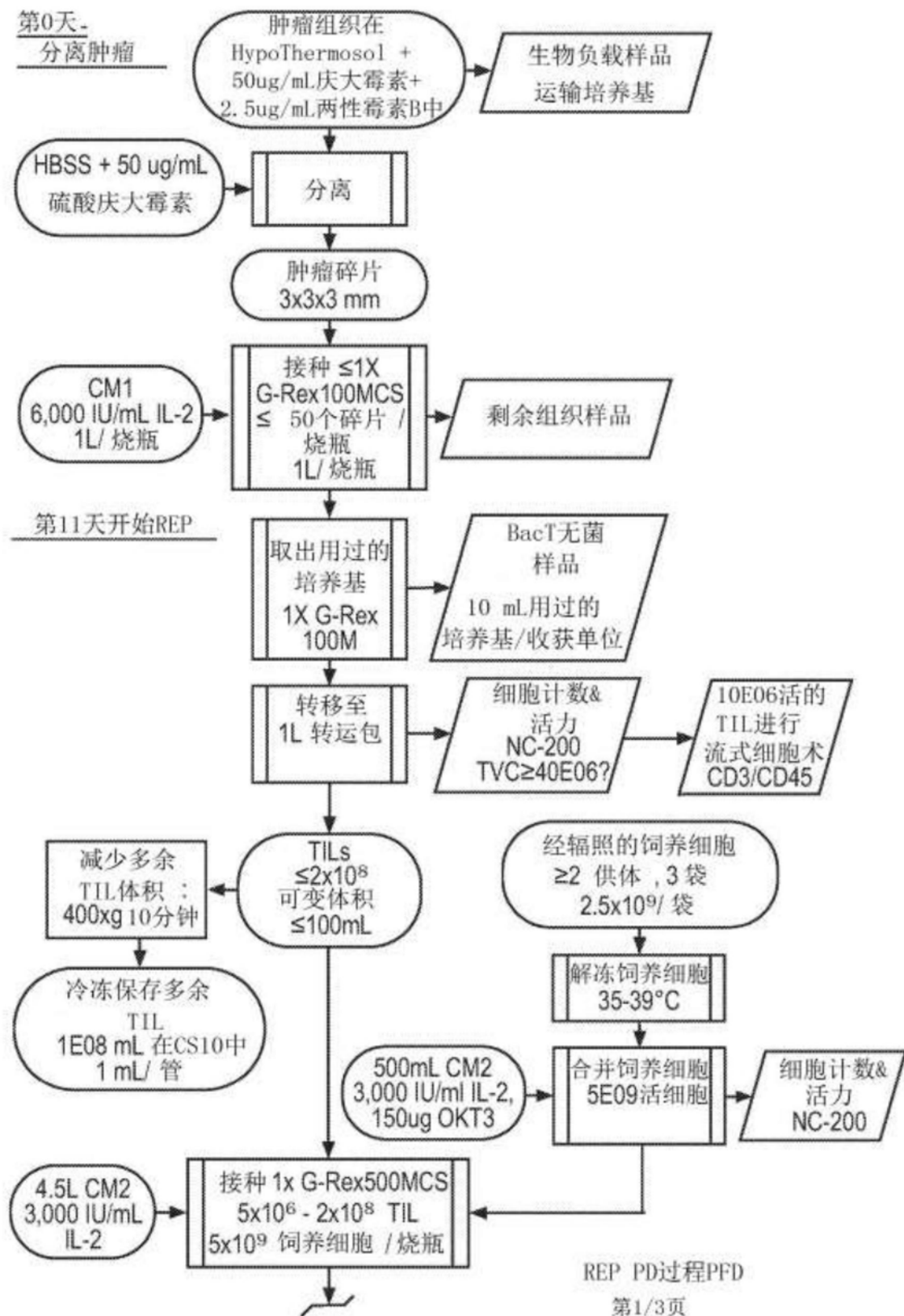


图19A

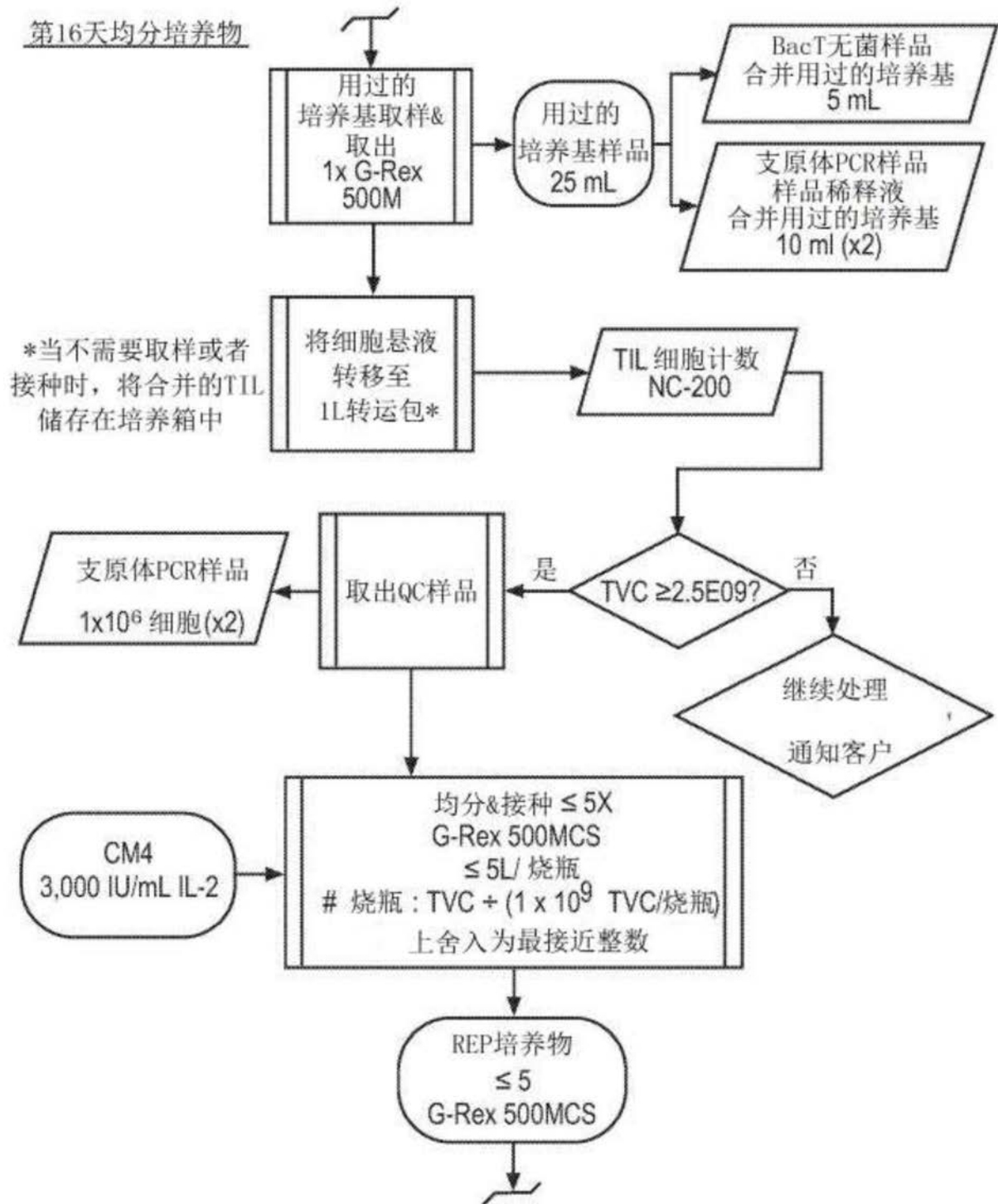


图19B

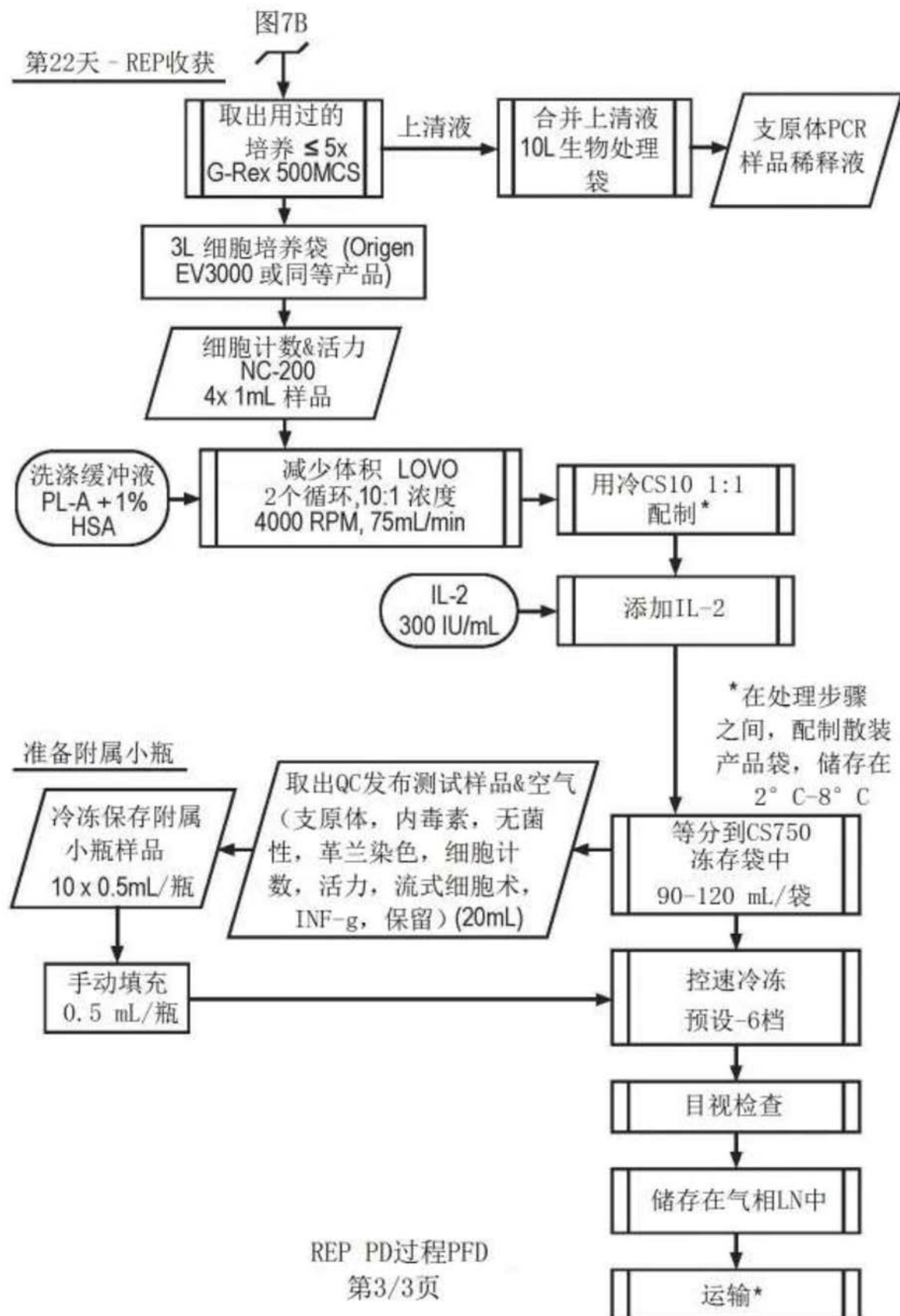


图19C

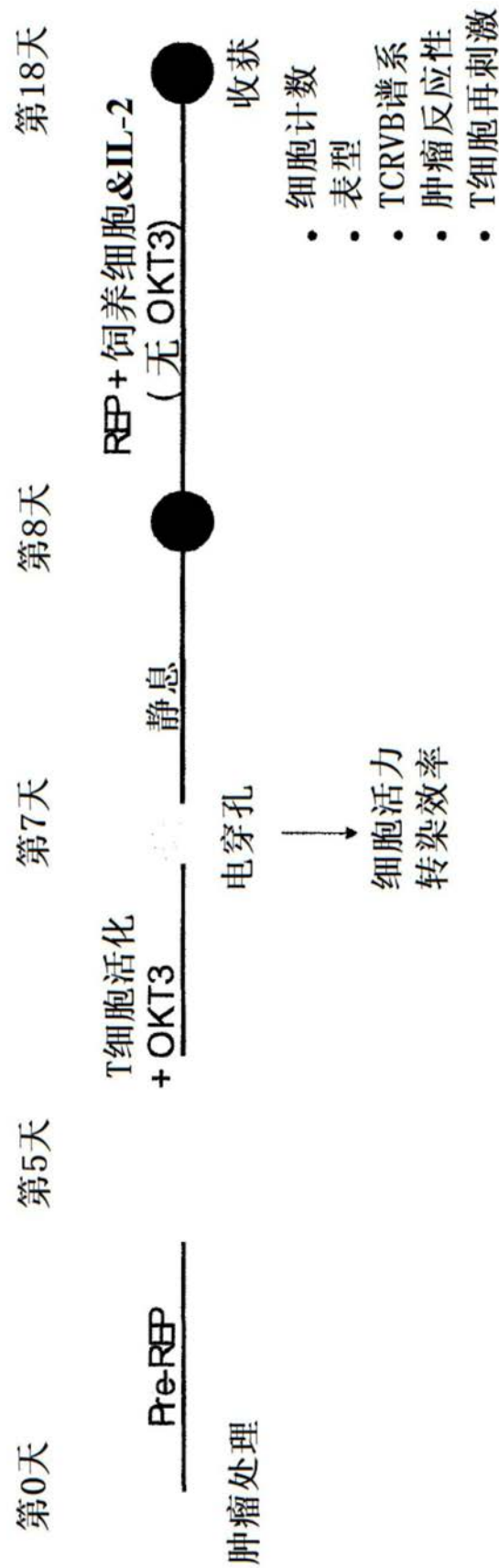


图20

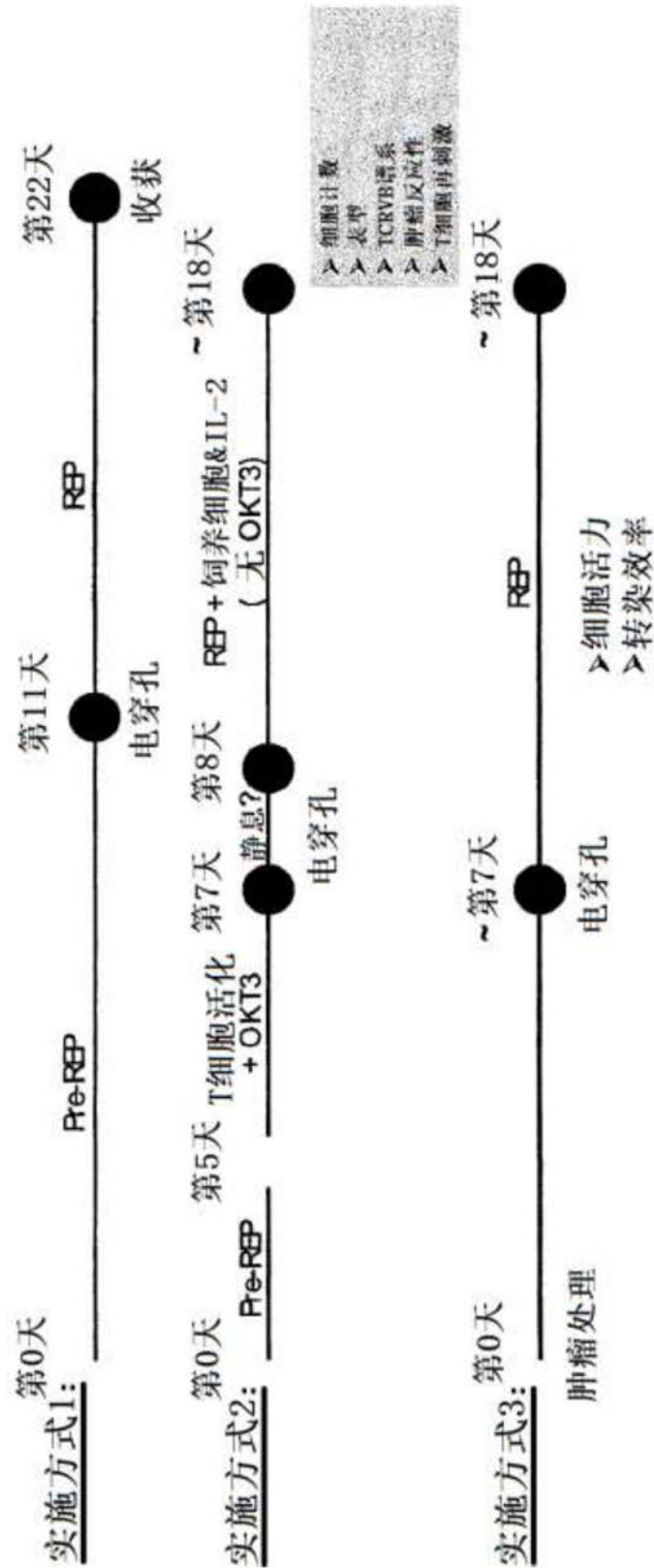


图21

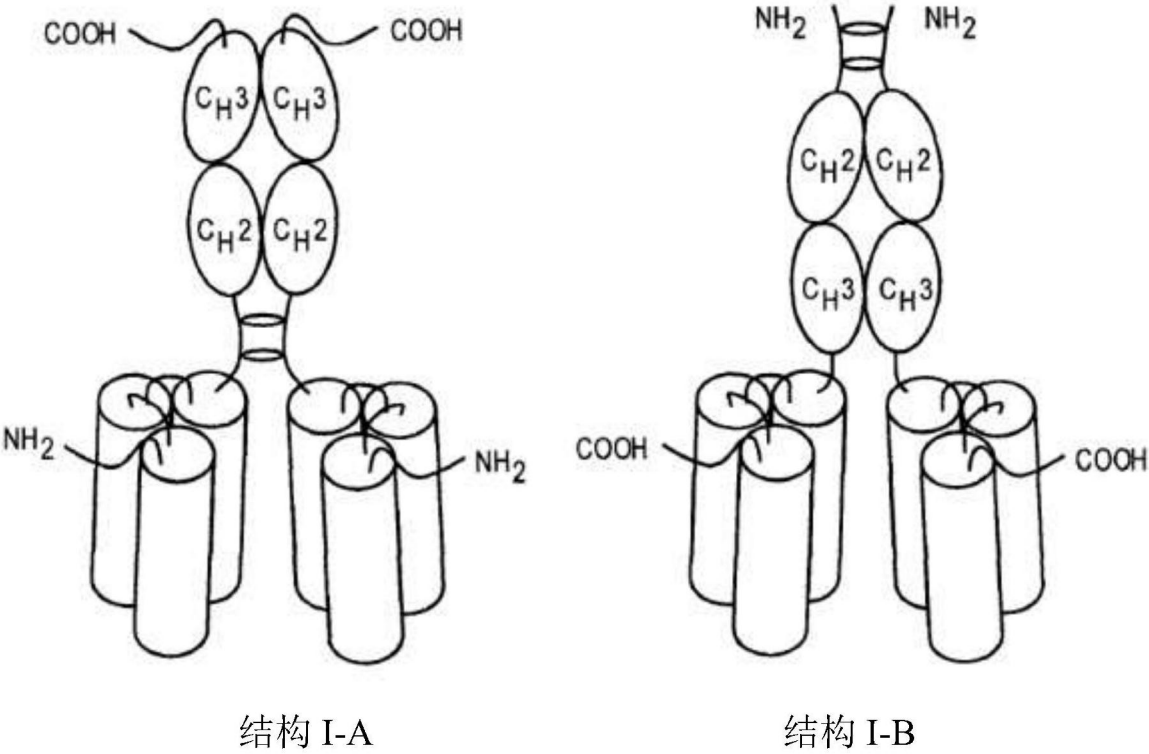


图22

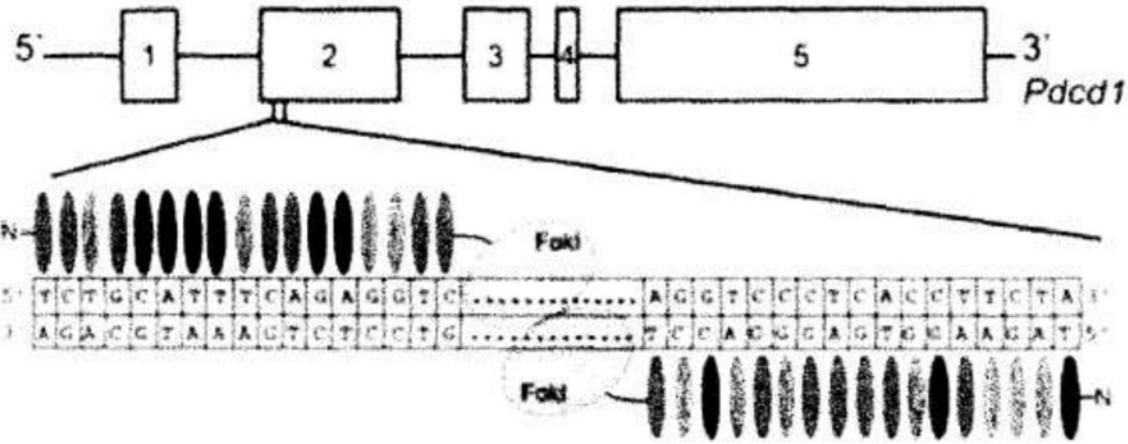


图23