(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113272420 A
(43)申请公布日 2021.08.17

(21)申请号 201980087609.8

(22)申请日 2019.11.04

(30)优先权数据
62/756,006 2018.11.05 US
62/826,831 2019.03.29 US
62/903,629 2019.09.20 US
62/924,602 2019.10.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/059716 2019.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/096986 EN 2020.05.14

(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 M·辛普森-埃布尔森
A·纳塔拉扬 C·沙尔捷-库尔托
M·保尔森

(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.
C12N 5/0783(2006.01)
A61K 35/17(2006.01)

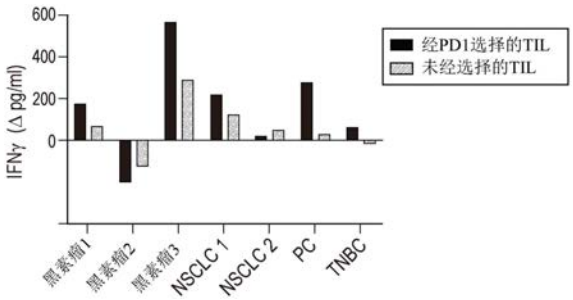
权利要求书14页 说明书281页
序列表67页 附图219页

(54)发明名称

经改进的肿瘤反应性T细胞的选择

(57)摘要

本发明提供了用于基于PD-1表达预选择TIL的方法以及用于扩增那些预选择的PD-1阳性TIL以产生具有增强的肿瘤特异性杀伤能力(例如，增强的细胞毒性)的治疗性TIL群体的方法。



CN 113272420 A

1.一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

(a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体;

(b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL,以获得富含PD-1的TIL群体;

(c)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增,以产生第二TIL群体,其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

(d)通过用另外的IL-2、OKT-3和APC补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中在所述快速第二扩增中添加的APC的数量是在步骤(b)中添加的APC的数量的至少两倍,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体,其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行;

(e)采集从步骤(d)获得的所述治疗性TIL群体;以及

(f)将来自步骤(e)的所采集的TIL群体转移到输注袋。

2.一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体;

b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL,以获得富含PD-1的TIL群体;

c)通过在包括IL-2、OKT-3以及任选地包括抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增,以产生第二TIL群体,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

d)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和APC的细胞培养基接触进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体;以及

e)采集从步骤(d)获得的所述治疗性TIL群体。

3.根据权利要求2所述的方法,其中在步骤(b)中,所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC),并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量大于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

4.根据权利要求2所述的方法,其中在步骤(b)中,所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC),并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量等于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

5.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

6.一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

(a)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养已经被选择为PD-1阳性的第一TIL群体来进行引发第一扩增,以产生第二TIL群体,所述第一TIL群体可通过肿瘤消化处理来自受试者的肿瘤样品并且选择PD-1阳性TIL而获得,其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8

天的第一时间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

(b)通过使所述第二TIL群体与具有另外的IL-2、OKT-3和APC的所述第二TIL群体的细胞培养基接触来进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中在所述快速第二扩增中APC的数量是在步骤(a)中APC的数量的至少两倍,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体,其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行;以及

(c)采集从步骤(b)获得的所述治疗性TIL群体。

7.一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

(a)通过在包括IL-2、OKT-3以及任选地包括抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群体来进行已经被选择为PD-1阳性的TIL的引发第一扩增,以产生第二TIL群体,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

(b)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和APC的细胞培养基接触进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体;以及

(c)采集从步骤(b)获得的所述治疗性TIL群体。

8.根据权利要求6所述的方法,其中在步骤(b)中,所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC),并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量大于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

9.根据权利要求6所述的方法,其中在步骤(b)中,所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC),并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量等于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

10.根据权利要求6或7所述的方法,其中所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

11.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(b)的选择包括以下步骤:(i)将所述第一TIL群体暴露于过量的单克隆抗PD-1IgG4抗体,所述单克隆抗PD-1IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合;(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体;以及(iii)基于所述荧光团进行基于流动的细胞分选,以获得富含PD-1的TIL群体。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述单克隆抗PD-1IgG4抗体是纳武单抗(nivolumab)或其变体、片段或缀合物。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述抗IgG4抗体是克隆抗人IgG4,克隆HP6023。

14.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中在所述快速第二扩增中APC的数量与在所述引发第一扩增中APC的数量的比率选自约1.5:1到约20:1的范围。

15.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述比率选自约1.5:1到约10:1的范围。

16.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述比率选自约2:1到约5:1的范围。

17.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述比率选自约2:1到约3:1的范围。

18.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述比率为约2:1。

19.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中在所述引发第一扩增中APC的数量选自

约1×10^8个APC到约3.5×10^8个APC的范围，并且其中在所述快速第二扩增中APC的数量选自约3.5×10^8个APC到约1×10^9个APC的范围。

20.根据权利要求1或2或6或7所述的方法，其中在所述引发第一扩增中APC的数量选自约1.5×10^8个APC到约3×10^8个APC的范围，并且其中在所述快速第二扩增中APC的数量选自约4×10^8个APC到约7.5×10^8个APC的范围。

21.根据权利要求1或2或6或7所述的方法，其中在所述引发第一扩增中APC的数量选自约2×10^8个APC到约2.5×10^8个APC的范围，并且其中在所述快速第二扩增中APC的数量选自约4.5×10^8个APC到约5.5×10^8个APC的范围。

22.根据权利要求1或2或6或7所述的方法，其中将约2.5×10^8个APC添加到所述引发第一扩增，并且将5×10^8个APC添加到所述快速第二扩增。

23.根据权利要求1到22中任一项所述的方法，其中所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约1.5:1到约100:1。

24.根据权利要求1到22中任一项所述的方法，其中所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约50:1。

25.根据权利要求1到22中任一项所述的方法，其中所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约25:1。

26.根据权利要求1到22中任一项所述的方法，其中所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约20:1。

27.根据权利要求1到22中任一项所述的方法，其中所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约10:1。

28.根据权利要求1到22中任一项所述的方法，其中所述第二TIL群体在数量上比所述第一TIL群体多至少50倍。

29.根据权利要求2到28中任一项所述的方法，其中所述方法包括在采集所述治疗性TIL群体的步骤之后执行以下另外的步骤：

将所采集的治疗性TIL群体转移到输注袋。

30.根据权利要求1到28中任一项所述的方法，其中所述多个肿瘤碎片被分配到多个单独容器中，在所述单独容器中的每个单独容器中，所述第二TIL群体是在所述引发第一扩增的步骤中从所述第一TIL群体获得的，并且所述第三TIL群体是在所述快速第二扩增的步骤中从所述第二TIL群体获得的，并且其中从所述第三TIL群体获得的所述治疗性TIL群体从所述多个容器中的每个容器收集并且组合以产生所采集的TIL群体。

31.根据权利要求30所述的方法，其中所述多个单独容器包括至少两个单独容器。

32.根据权利要求30所述的方法，其中所述多个单独容器包括两个到二十个单独容器。

33.根据权利要求30所述的方法，其中所述多个单独容器包括两个到十个单独容器。

34.根据权利要求30所述的方法，其中所述多个单独容器包括两个到五个单独容器。

35.根据权利要求30到34中任一项所述的方法，其中所述单独容器中的每个单独容器包括第一可透气表面区域。

36.根据权利要求1到29中任一项所述的方法，其中所述多个肿瘤碎片被分配在单个容器中。

37.根据权利要求36所述的方法，其中所述单个容器包括第一可透气表面区域。

38.根据权利要求33或37所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC),并且所述APC以约一个细胞层到约三个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

39.根据权利要求36所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约1.5个细胞层到约2.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

40.根据权利要求38所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约2个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

41.根据权利要求38到40中任一项所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3个细胞层到约5个细胞层的厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

42.根据权利要求41所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3.5个细胞层到约4.5个细胞层的厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

43.根据权利要求42所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约4个细胞层的厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

44.根据权利要求2到29中任一项所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的第一容器中进行,并且在所述快速第二扩增的步骤中,所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的第二容器中进行。

45.根据权利要求44所述的方法,其中所述第二容器大于所述第一容器。

46.根据权利要求42或43所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC),并且所述APC以约一个细胞层到约三个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

47.根据权利要求46所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约1.5个细胞层到约2.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

48.根据权利要求48所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约2个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

49.根据权利要求44到48中任一项所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3个细胞层到约5个细胞层的平均厚度层叠到所述第二可透气表面区域上。

50.根据权利要求49所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3.5个细胞层到约4.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第二可透气表面区域上。

51.根据权利要求49所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约4个细胞层的平均厚度层叠到所述第二可透气表面区域上。

52.根据权利要求2到43中任一项所述的方法,其中对于其中对第一TIL群体进行所述引发第一扩增的每个容器,在同一容器中对由这种第一TIL群体产生的所述第二TIL群体进行所述快速第二扩增。

53.根据权利要求52所述的方法,其中每个容器包括第一可透气表面区域。

54.根据权利要求53所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC),并且所述APC以约一个细胞层到约三个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

55.根据权利要求54所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约1.5个细胞层到约2.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

56.根据权利要求55所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中，所述APC以约2个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

57.根据权利要求53到56中任一项所述的方法，其中在所述快速第二扩增的步骤中，所述APC以约3个细胞层到约5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

58.根据权利要求57所述的方法，其中在所述快速第二扩增的步骤中，所述APC以约3.5个细胞层到约4.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

59.根据权利要求58所述的方法，其中在所述快速第二扩增的步骤中，所述APC以约4个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

60.根据权利要求2到36、44、46和52中任一项所述的方法，其中对于其中在所述引发第一扩增的步骤中对第一TIL群体进行所述引发第一扩增的每个容器，所述第一容器包括第一表面区域，所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC)，并且所述APC层叠到所述第一可透气表面区域上，并且其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.1到约1:10的范围。

61.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.2到约1:8的范围。

62.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.3到约1:7的范围。

63.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.4到约1:6的范围。

64.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.5到约1:5的范围。

65.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.6到约1:4的范围。

66.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.7到约1:3.5的范围。

67.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.8到约1:3的范围。

68.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.9到约1:2.5的范围。

69.根据权利要求60所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率为约1:2。

70.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中2到3天之后,用另外的IL-2补充所述细胞培养基。

71.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其进一步包括在采集所述治疗性TIL群体的步骤中,使用低温保存方法低温保存所采集的TIL群体。

72.根据权利要求1或29所述的方法,其进一步包括低温保存所述输注袋的步骤。

73.根据权利要求71或72所述的方法,其中使用比率为1:1的所述所采集的TIL群体与低温保存培养基进行所述低温保存过程。

74.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

75.根据权利要求74所述的方法,其中所述PBMC是经辐照的且同种异体的。

76.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括外周血单核细胞(PBMC),并且其中在所述引发第一扩增的步骤中所述细胞培养基中的PBMC的总数为2.5×10^8。

77.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述快速第二扩增的步骤中,所述细胞培养基中的所述抗原呈递细胞(APC)是外周血单核细胞(PBMC),并且其中在所述快速第二扩增的步骤中添加到所述细胞培养基的PBMC的总数为5×10^8。

78.根据权利要求1到70中任一项所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

79.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在采集所述治疗性TIL群体的步骤中的采集是使用基于膜的细胞处理系统进行的。

80.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(d)中的采集是使用LOVO细胞处理系统进行的。

81.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在所述引发第一扩增的步骤中,所述多个碎片包括约60个碎片每容器,其中每个碎片的体积为约27mm^3。

82.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多个碎片包括约30个到约60个碎片,其中总体积为约1300mm^3到约1500mm^3。

83.根据权利要求82所述的方法,其中所述多个碎片包括约50个碎片,其中总体积为约1350mm^3。

84.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多个碎片包括约50个碎片,其中总质量为约1克到约1.5克。

85.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述细胞培养基被提供在选自由G容器和Xuri细胞袋组成的组的容器中。

86.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤(d)中2到3天之后,用另外的IL-2补充所述细胞培养基。

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

88.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中IL-2浓度为约6,000IU/mL。

89.根据权利要求1或29所述的方法,其中在将所采集的治疗性TIL群体转移到输注袋的步骤中,所述输注袋是含HypoThermosol的输注袋。

90.根据权利要求71到73中任一项所述的方法，其中所述低温保存培养基包括二甲基亚砜(DMSO)。

91.根据权利要求90所述的方法，其中所述低温保存培养基包括7％到10％的DMSO。

92.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中的第一时间段和在所述快速第二扩增的步骤中的第二时间段各自单独地在5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间段内执行。

93.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中的第一时间段在5天、6天或7天的时间段内执行。

94.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中在所述快速第二扩增的步骤中的第二时间段在7天、8天或9天的时间段内执行。

95.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中在所述引发第一扩增的步骤中的第一时间段和在所述快速第二扩增的步骤中的第二时间段各自单独地在7天的时间段内执行。

96.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约14天到约16天的时间段内执行。

97.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约15天到约16天的时间段内执行。

98.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约14天的时间段内执行。

99.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约15天的时间段内执行。

100.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其中通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约16天的时间段内执行。

101.根据权利要求1到92中任一项所述的方法，其进一步包括使用低温保存过程低温保存所述所采集的治疗性TIL群体的步骤，其中通过采集所述治疗性TIL群体和低温保存，所述引发第一扩增的步骤在16天或更短时间内进行。

102.根据权利要求1到101中任一项所述的方法，其中在采集所述治疗性TIL群体的步骤中采集的所述治疗性TIL群体包括用于治疗有效剂量的TIL的足够的TIL。

103.根据权利要求102所述的方法，其中足以用于治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。

104.根据权利要求1到103中任一项所述的方法，其中在所述快速第二扩增的步骤中的所述第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素γ产生和/或增加的多克隆性。

105.根据权利要求1到103中任一项所述的方法，其中与通过长于16天的过程制备的TIL相比，在所述快速第二扩增的步骤中的所述第三TIL群体提供至少一倍到五倍或更多倍的干扰素γ产生。

106.根据权利要求1到103中任一项所述的方法，其中相对于在所述引发第一扩增的步骤中从所述第二TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞，在所述快速第二扩增的步骤中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

107.根据权利要求1到106中任一项所述的方法,其中将来自所述采集所述治疗性TIL群体的步骤的所述治疗性TIL群体输注到患者体内。

108.根据权利要求1或2或5或6所述的方法,其进一步包括使用低温保存过程低温保存步骤(f)中的包括所述所采集的TIL群体的所述输注袋的步骤。

109.根据权利要求1或2或5或6所述的方法,其中使用比率为1:1的所述所采集的TIL群体与低温保存培养基进行所述低温保存过程。

110.根据权利要求1或2或5或6所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

111.根据权利要求110所述的方法,其中所述PBMC是经辐照的且同种异体的。

112.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

113.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(e)中的采集是使用基于膜的细胞处理系统进行的。

114.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(e)中的采集是使用LOVO细胞处理系统进行的。

115.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中在步骤(c)中,所述多个碎片包括约60个碎片每第一可透气表面区域,其中每个碎片的体积为约27mm^3。

116.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述多个碎片包括约30个到约60个碎片,其中总体积为约1300mm^3到约1500mm^3。

117.根据权利要求116所述的方法,其中所述多个碎片包括约50个碎片,其中总体积为约1350mm^3。

118.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述多个碎片包括约50个碎片,其中总质量为约1克到约1.5克。

119.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中所述细胞培养基被提供在选自由G容器和Xuri细胞袋组成的组的容器中。

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

121.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中IL-2浓度为约6,000IU/mL。

122.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(d)中的所述输注袋是含HypoThermosol的输注袋。

123.根据权利要求122所述的方法,其中所述低温保存培养基包括二甲基亚砜(DMSO)。

124.根据权利要求123所述的方法,其中所述低温保存培养基包括7%到10%的DMSO。

125.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中在步骤(c)中的第一时间段和在步骤(c)中的第二时间段各自单独地在5天、6天或7天的时间段内执行。

126.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中在步骤(c)中的第一时间段在5天、6天或7天的时间段内执行。

127.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(d)中的第二时间段在7天、8天或9天的时间段内执行。

128.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中在步骤(c)中的第一时间段和在步骤

(c)中的第二时间段各自单独地在7天的时间段内执行。

129.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(a)到(f)在约14天到约16天的时间段内执行。

130.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(a)到(f)在约15天到约16天的时间段内执行。

131.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(a)到(f)在约14天的时间段内执行。

132.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(a)到(f)在约15天的时间段内执行。

133.根据权利要求1或2或6或7所述的方法,其中步骤(a)到(f)在约16天的时间段内执行。

134.根据权利要求133所述的方法,其中步骤(a)到(f)和低温保存在16天或更短时间内执行。

135.根据权利要求1到134中任一项所述的方法,其中在步骤(f)中采集的所述治疗性TIL群体包括用于治疗有效剂量的TIL的足够的TIL。

136.根据权利要求135所述的方法,其中足以用于治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。

137.根据权利要求1到136中任一项所述的方法,步骤(c)中的所述容器大于步骤(b)中的所述容器。

138.根据权利要求1到137中任一项所述的方法,其中在步骤(d)中的所述第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素γ产生和/或增加的多克隆性。

139.根据权利要求1到138中任一项所述的方法,其中与通过长于16天的过程制备的TIL相比,在步骤(d)中的所述第三TIL群体提供至少一倍到五倍或更多倍的干扰素γ产生。

140.根据权利要求1到139中任一项所述的方法,其中相对于在步骤(c)中从所述第二细胞群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞,在步骤(d)中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

141.根据权利要求1到140中任一项所述的方法,其中将来自步骤(f)的所述TIL输注到患者体内。

142.一种用于治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括施用经扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),所述方法包括:

(a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体;

(b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL,以获得富含PD-1的TIL群体;

(c)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增,以产生第二TIL群体,其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7天以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上比所述第一TIL群体多至少50倍;

(d)通过用另外的IL-2、OKT-3和APC补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中添加到所述快速第二扩增的APC的数量是在步骤(b)中

添加的APC的数量的至少两倍，其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天以获得所述第三TIL群体，其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体，其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行；

(e)采集从步骤(c)获得的所述治疗性TIL群体；

(f)将来自步骤(d)的所采集的TIL群体转移到输注袋；以及

(g)向所述受试者施用治疗有效剂量的来自步骤(e)的TIL。

143.根据权利要求142所述的方法，其中足以在步骤(g)中施用治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。

144.根据权利要求142或143所述的方法，其中所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

145.根据权利要求142到144中任一项所述的方法，其中步骤(b)的选择包括以下步骤：(i)将所述第一TIL群体暴露于过量的单克隆抗PD-1IgG4抗体，所述单克隆抗PD-1IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合；(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体；以及(iii)基于所述荧光团进行基于流动的细胞分选，以获得富含PD-1的TIL群体。

146.根据权利要求145所述的方法，其中所述单克隆抗PD-1IgG4抗体是纳武单抗或其变体、片段或缀合物。

147.根据权利要求146所述的方法，其中所述抗IgG4抗体是克隆抗人IgG4，克隆HP6023。

148.根据权利要求147所述的方法，其中所述抗原呈递细胞(APC)是PBMC。

149.根据权利要求145到148中任一项所述的方法，其中在步骤(g)中施用治疗有效剂量的TIL细胞之前，已经向所述患者施用非清髓性淋巴细胞耗减方案。

150.根据权利要求151所述的方法，其中所述非清髓性淋巴细胞耗减方案包括以下步骤：以60毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天，随后以25毫克/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天。

151.根据权利要求145到150中任一项所述的方法，其进一步包括在步骤(g)中向所述患者施用所述TIL细胞之后的那天开始，用高剂量IL-2方案治疗所述患者的步骤。

152.根据权利要求151所述的方法，其中所述高剂量IL-2方案包括每八小时以15分钟团注静脉内输注施用600,000或720,000IU/kg，直到耐受为止。

153.根据权利要求145到152中任一项所述的方法，其中在步骤(c)中的所述第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素γ产生和/或增加的多克隆性。

154.根据权利要求145到153中任一项所述的方法，其中与通过长于16天的过程制备的TIL相比，在步骤(d)中的所述第三TIL群体提供至少一倍到五倍或更多倍的干扰素γ产生。

155.根据权利要求145到154中任一项所述的方法，其中相对于在步骤(c)中从所述第二细胞群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞，在步骤(d)中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

156.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述癌症选自由以下组成的组：黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。

157.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述癌症选自由以下组成的组：黑

素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包含GBM)和胃肠癌。

158.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是黑素瘤。

159.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是HNSCC。

160.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是宫颈癌。

161.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是NSCLC。

162.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是成胶质细胞瘤(包含GBM)。

163.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是胃肠癌。

164.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是高突变癌症。

165.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是儿科高突变癌症。

166.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述容器是GREX-10。

167.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中密闭容器包括GREX-100。

168.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中密闭容器包括GREX-500。

169.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经用抗PD-1抗体治疗。

170.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述受试者先前尚未用抗PD-1抗体治疗。

171.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤(b)中,通过执行以下步骤从所述第一TIL群体中选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与抗PD-1抗体接触以在所述第一TIL群体中形成所述抗PD-1抗体和所述TIL细胞的第一复合物的步骤;以及然后执行分离所述第一复合物以获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤。

172.根据权利要求165所述的方法,其中所述抗PD-1抗体包括Fc区,其中在形成所述第一复合物的步骤之后并且在分离所述第一复合物的步骤之前,所述方法进一步包括使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物的步骤,所述抗Fc抗体与所述抗PD-1抗体的所述Fc区结合,并且其中所述分离所述第一复合物的步骤是通过分离所述第二复合物执行的。

173.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体选自由以下组成的组:EH12.2H7、PD1.3.1、M1H4、纳武单抗(BMS-936558,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb);Opdivo®)、派姆单抗(pembrolizumab)(兰伯丽珠单抗(lambrolizumab),MK03475或MK-3475,默克公司(Merck);Keytruda®)、H12.1、PD1.3.1、NAT105、人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司(ShangHai JunShi))、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司(Tesaro,Inc.))、皮地利珠单抗(Pidilizumab)(抗PD-1mAb CT-011,麦迪韦逊医疗公司(Medivation))、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司(BeiGene))和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司(ShangHai HengRui))、人单克隆抗体REGN2810(再生元公司(Regeneron))、人单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)、人源化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(诺华公司(Novartis))和RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。

174.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体是EH12.2H7。

175.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-

1抗体与不同于纳武单抗或派姆单抗的表位结合。

176.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体与EH12.2H7或纳武单抗结合同一表位。

177.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体是纳武单抗。

178.根据权利要求1到177中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触来选择所述PD-1阳性TIL,并且其中所述第二抗PD-1抗体不被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合。

179.根据权利要求1到177所述的方法,其中所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触来选择所述PD-1阳性TIL,并且其中所述第二抗PD-1抗体被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合。

180.根据权利要求1到177中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过执行以下步骤来选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触以形成所述第二抗PD-1抗体和所述第一TIL群体的第一复合物的步骤,其中所述第二抗PD-1抗体不被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合;以及然后执行分离所述第一复合物以获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤。

181.根据权利要求1到177所述的方法,其中所述第一抗PD-1抗体和所述第二抗PD-1抗体包括Fc区,其中在形成所述第一复合物的步骤之后并且在分离所述第一复合物的步骤之前,所述方法进一步包括使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物的步骤,所述抗Fc抗体与所述第一抗PD-1抗体的所述Fc区和所述第二抗PD-1抗体的所述Fc区结合,并且其中所述分离所述第一复合物的步骤是通过分离所述第二复合物执行的。

182.根据权利要求1到177中任一项所述的方法,其中所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过执行以下步骤来选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触以形成所述第二抗PD-1抗体和所述第一TIL群体的第一复合物的步骤,其中所述第二抗PD-1抗体被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述PD-1阳性TIL结合,其中所述第一抗PD-1抗体和所述第二抗PD-1抗体包括Fc区,其中在形成所述第一复合物的步骤之后并且在获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤之前,所述方法进一步包括以下步骤:使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物,所述抗Fc抗体与所述第二抗PD-1抗体的所述Fc区结合;以及使不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体与所述抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体的第三复合物,以及执行分离所述第二复合物和所述第三复合物以获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤。

183.一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中所述治疗性TIL群体提供增加的功效和/或增加的干扰素γ产生。

184.根据权利要求183所述的治疗性TIL群体,其提供增加的干扰素γ产生。

185.根据权利要求183或权利要求184所述的治疗性TIL群体，其提供增加的功效。

186.根据权利要求183到185中任一项所述的治疗性TIL群体，其中与通过长于16天的过程制备的TIL相比，所述治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素γ产生。

187.根据权利要求183到186中任一项所述的治疗性TIL群体，其中与通过长于16到22天的过程制备的TIL相比，所述治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素γ产生。

188.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中从所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL以获得富含PD-1的TIL群体包括从第一TIL群体中选择为PD-1阳性TIL的至少11.27％到74.4％的TIL群体。

189.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中步骤的选择包括以下步骤：

(i)将所述第一TIL群体和PBMC群体暴露于过量的单克隆抗PD-1IgG4抗体，所述单克隆抗PD-1IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合；

(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体；

(iii)如通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的，相比于所述PBMC群体中的强度，基于所述第一TIL群体中的所述PD-1阳性TIL的荧光团的强度获得所述富含PD-1的TIL群体。

190.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述第一群体和所述PBMC群体两者中的荧光团的强度用于建立FACS门，以确立分别对应于PD-1阴性TIL、PD-1中间体TIL和PD-1阳性TIL的低水平、中间水平和高水平的强度。

191.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述FACS门是在步骤(a)之后建立的。

192.根据权利要求1到4中任一项所述的方法，其中所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

193.根据权利要求1到5中任一项所述的方法，其中至少80％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。

194.一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法，所述方法包括：

(a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体；

(b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL，以获得富含PD-1的TIL群体，其中至少范围为10％到80％的所述第一TIL群体是PD-1阳性TIL；

(c)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增，以产生第二TIL群体，其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行，其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体，其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体；

(d)通过用另外的IL-2、OKT-3和APC补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行快速第二扩增，以产生第三TIL群体，其中在所述快速第二扩增中添加的APC的数量是在步骤(b)中添加的APC的数量的至少两倍，其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体，其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体，其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行；

(e)采集从步骤(d)获得的所述治疗性TIL群体；以及

(f)将来自步骤(e)的所采集的TIL群体转移到输注袋。

195.根据权利要求194所述的方法，其中步骤(b)的选择包括以下步骤：

(i)将所述第一TIL群体和PBMC群体暴露于过量的单克隆抗PD-1IgG4抗体，所述单克隆抗PD-1IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合；

(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体；

(iii)如通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的，相比于所述PBMC群体中的强度，基于所述第一TIL群体中的所述PD-1阳性TIL的荧光团的强度获得所述富含PD-1的TIL群体。

196.根据权利要求194到195中任一项所述的方法，其中所述第一群体和所述PBMC群体两者中的荧光团的强度用于建立FACS门，以确立分别对应于PD-1阴性TIL、PD-1中间体TIL和PD-1阳性TIL的低水平、中间水平和高水平的强度。

197.根据权利要求194到196中任一项所述的方法，其中所述FACS门是在步骤(a)之后建立的。

198.根据权利要求194到197中任一项所述的方法，其中所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

199.根据权利要求194到198中任一项所述的方法，其中至少80％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。

200.根据权利要求194到199中任一项所述的方法，其中所述第三TIL群体在所述容器中包括至少约1×10^{8}个TIL。

201.根据权利要求194到200中任一项所述的方法，其中所述第三TIL群体在所述容器中包括至少约1×10^{9}个TIL。

202.根据权利要求194到201中任一项所述的方法，其中在所述引发第一扩增中富含PD-1的TIL的数量为约1×10^{4}到约1×10^{6}。

203.根据权利要求194到202中任一项所述的方法，其中在所述引发第一扩增中富含PD-1的TIL的数量为约5×10^{4}到约1×10^{6}。

204.根据权利要求194到203中任一项所述的方法，其中在所述引发第一扩增中富含PD-1的TIL的数量为约2×10^{5}到约1×10^{6}。

205.根据权利要求194到204中任一项所述的方法，其进一步包括在执行步骤(a)之前，对来自从所述受试者切除的肿瘤的所述第一TIL群体执行低温保存的步骤。

经改进的肿瘤反应性T细胞的选择

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年11月5日提交的美国临时专利申请第62/756,006号、于2019年3月29日提交的美国临时专利申请第62/826,831号、于2019年9月20日提交的美国临时专利申请第62/903,629号以及于2019年10月22日提交的美国临时专利申请第62/924,602号的优先权,所述美国临时专利申请特此通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 使用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的过继性转移治疗庞大的难治性癌症代表治疗具有不良预后的患者的有效治疗途径。Gattinoni等人,《自然免疫学综述(Nat.Rev.Immunol.)》2006,6,383-393。成功的免疫疗法需要大量的TIL,并且商业化需要稳健且可靠的工艺。由于细胞扩增的技术问题、物流问题和调节问题,这一直是难以实现的挑战。由于其速度和效率,基于IL-2的TIL扩增随后是“快速扩增过程”(REP)已经成为TIL扩增的优选方法。Dudley等人,《科学(Science)》2002,298,850-54;Dudley等人,《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)》2005,23,2346-57;Dudley等人,《临床肿瘤学杂志》2008,26,5233-39;Riddell等人,《科学》1992,257,238-41;Dudley等人,《免疫治疗学杂志(J.Immunother.)》2003,26,332-42。REP可以在14天时间段内产生TIL的1,000倍扩增,但是其需要大大过量(例如,200倍)的通常来自多个供体的呈饲养细胞形式的经辐照的同种异体外周血单核细胞(PBMC,又称为单核细胞(MNC)),以及抗CD3抗体(OKT3)和高剂量的IL-2。Dudley等人,《免疫治疗学杂志》2003,26,332-42。经历REP程序的TIL在患有黑素瘤的患者中进行宿主免疫抑止后产生成功的过继性细胞疗法。当前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数(例如,CD28、CD8或CD4阳性)并且依赖于REP产物的倍数扩增及活力。

[0004] 当前的TIL制造工艺受到长度、成本、无菌问题和本文所述的其它因素的限制,使得使此类工艺商业化的可能性受到严重限制。尽管已经对TIL进行表征,例如,已经显示TIL表达各种受体,包含抑制性受体程序性细胞死亡1(PD-1;也称为CD279)(参见,Gros,A.等人,《临床研究杂志(Clin Invest.)》124(5):2246-2259(2014)),但是此信息在开发治疗性TIL群体中的有用性尚未完全实现。迫切需要提供基于此类工艺的TIL制造工艺和疗法,所述工艺和疗法适合于商业规模制造和监管批准,用于在多个临床中心的人类患者中使用。本发明通过提供用于基于PD-1表达预选择TIL的方法满足这种需要,以便获得具有增强的肿瘤特异性杀伤能力(例如,增强的细胞毒性)的TIL。

发明内容

[0005] 本发明提供了用于扩增TIL并且产生治疗性TIL群体的方法,所述方法包含PD-1状态预选择步骤。

[0006] 在一些实施例中,本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

[0007] (a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的

肿瘤获得和/或接收第一TIL群体；

[0008] (b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL，以获得富含PD-1的TIL群体；

[0009] (c)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增，以产生第二TIL群体，其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行，其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体，其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体；

[0010] (d)通过用另外的IL-2、OKT-3和APC补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行快速第二扩增，以产生第三TIL群体，其中在所述快速第二扩增中添加的APC的数量是在步骤(b)中添加的APC的数量的至少两倍，其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体，其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体，其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行；

[0011] (e)采集从步骤(d)获得的所述治疗性TIL群体；以及

[0012] (f)将来自步骤(e)的所采集的TIL群体转移到输注袋。

[0013] 在一些实施例中，本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法，所述方法包括：

[0014] a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体；

[0015] b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL，以获得富含PD-1的TIL群体；

[0016] c)通过在包括IL-2、OKT-3以及任选地包括抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增，以产生第二TIL群体，其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体，其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体；

[0017] d)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和APC的细胞培养基接触进行快速第二扩增，以产生第三TIL群体，其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体，其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体；以及

[0018] e)采集从步骤(d)获得的所述治疗性TIL群体。

[0019] 在一些实施例中，“获得”指示在方法和/或过程中采用的TIL可以作为方法和/或过程步骤的一部分直接源自样品(包含源自外科手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或其它样品)。在一些实施例中，“接收”指示在方法和/或过程中采用的TIL可以间接地源自样品(包含源自外科手术切除、穿刺活检、核心活检、小型活检或其它样品)并且然后在方法和/或过程中采用，(例如，在步骤(a)开始时，将已经通过未包含在部分(a)中的分离过程从样品获得的TIL，此类TIL可以被称为“接收的”)。

[0020] 在一些实施例中，在步骤(b)中，所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC)，并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量大于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

[0021] 在一些实施例中，在步骤(b)中，所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC)，并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量等于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

[0022] 在一些实施例中，所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0023] 在一些实施例中,本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

[0024] (a)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养已经被选择为PD-1阳性的第一TIL群体来进行引发第一扩增,以产生第二TIL群体,所述第一TIL群体可通过肿瘤消化处理来自受试者的肿瘤样品并且选择PD-1阳性TIL而获得,其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

[0025] (b)通过使所述第二TIL群体与具有另外的IL-2、OKT-3和APC的所述第二TIL群体的细胞培养基接触来进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中在所述快速第二扩增中APC的数量是在步骤(a)中APC的数量的至少两倍,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体,其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行;以及

[0026] (c)采集从步骤(b)获得的所述治疗性TIL群体。

[0027] 在一些实施例中,本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

[0028] (a)通过在包括IL-2、OKT-3以及任选地包括抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群体来进行已经被选择为PD-1阳性的TIL的引发第一扩增,以产生第二TIL群体,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

[0029] (b)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和APC的细胞培养基接触进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体;以及

[0030] c)采集从步骤(c)获得的所述治疗性TIL群体。

[0031] 在一些实施例中,在步骤(b)中,所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC),并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量大于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

[0032] 在一些实施例中,在步骤(b)中,所述细胞培养基进一步包括抗原呈递细胞(APC),并且其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量等于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

[0033] 在一些实施例中,所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0034] 在一些实施例中,步骤(b)的选择包括以下步骤:(i)将所述第一TIL群体暴露于过量的单克隆抗PD-1 IgG4抗体,所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合;(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体;以及(iii)基于所述荧光团进行基于流动的细胞分选,以获得富含PD-1的TIL群体。

[0035] 在一些实施例中,所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体是纳武单抗或其变体、片段或缀合物。在一些实施例中,所述抗IgG4抗体是克隆抗人IgG4,克隆HP6023。

[0036] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增中APC的数量与在所述引发第一扩增中APC的数量的比率选自约1.5:1到约20:1的范围。

[0037] 在一些实施例中,所述比率选自约1.5:1到约10:1的范围。

[0038] 在一些实施例中,所述比率选自约2:1到约5:1的范围。

[0039] 在一些实施例中,所述比率选自约2:1到约3:1的范围。

[0040] 在一些实施例中,所述比率为约2:1。

[0041] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增中APC的数量选自约1×10^8个APC到约3.5×10^8个APC的范围,并且其中在所述快速第二扩增中APC的数量选自约3.5×10^8个APC到约1×10^9个APC的范围。

[0042] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增中APC的数量选自约1.5×10^8个APC到约3×10^8个APC的范围,并且其中在所述快速第二扩增中APC的数量选自约4×10^8个APC到约7.5×10^8个APC的范围。

[0043] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增中APC的数量选自约2×10^8个APC到约2.5×10^8个APC的范围,并且其中在所述快速第二扩增中APC的数量选自约4.5×10^8个APC到约5.5×10^8个APC的范围。

[0044] 在一些实施例中,将约2.5×10^8个APC添加到所述引发第一扩增,并且将5×10^8个APC添加到所述快速第二扩增。

[0045] 在一些实施例中,所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约1.5:1到约100:1。

[0046] 在一些实施例中,所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约50:1。

[0047] 在一些实施例中,所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约25:1。

[0048] 在一些实施例中,所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约20:1。

[0049] 在一些实施例中,所述第二TIL群体中的TIL的数量与所述第一TIL群体中的TIL的数量的比率为约10:1。

[0050] 在一些实施例中,所述第二TIL群体在数量上比所述第一TIL群体多至少50倍。

[0051] 在一些实施例中,所述方法包括在采集所述治疗性TIL群体的步骤之后执行以下另外的步骤:将所采集的治疗性TIL群体转移到输注袋。

[0052] 在一些实施例中,所述多个肿瘤碎片被分配到多个单独容器中,在所述单独容器中的每个单独容器中,所述第二TIL群体是在所述引发第一扩增的步骤中从所述第一TIL群体获得的,并且所述第三TIL群体是在所述快速第二扩增的步骤中从所述第二TIL群体获得的,并且其中从所述第三TIL群体获得的所述治疗性TIL群体从所述多个容器中的每个容器收集并且组合以产生所采集的TIL群体。

[0053] 在一些实施例中,所述多个单独容器包括至少两个单独容器。

[0054] 在一些实施例中,所述多个单独容器包括两个到二十个单独容器。

[0055] 在一些实施例中,所述多个单独容器包括两个到十个单独容器。

[0056] 在一些实施例中,所述多个单独容器包括两个到五个单独容器。

[0057] 在一些实施例中,所述单独容器中的每个单独容器包括第一可透气表面区域。

[0058] 在一些实施例中,所述多个肿瘤碎片被分配在单个容器中。

[0059] 在一些实施例中,所述单个容器包括第一可透气表面区域。

[0060] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC),并且所述APC以约一个细胞层到约三个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0061] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约1.5个细胞层到约2.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0062] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约2个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0063] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3个细胞层到约5个细胞层的厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0064] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3.5个细胞层到约4.5个细胞层的厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0065] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约4个细胞层的厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0066] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的第一容器中进行,并且在所述快速第二扩增的步骤中,所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的第二容器中进行。

[0067] 在一些实施例中,所述第二容器大于所述第一容器。

[0068] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC),并且所述APC以约一个细胞层到约三个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0069] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约1.5个细胞层到约2.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0070] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约2个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0071] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3个细胞层到约5个细胞层的平均厚度层叠到所述第二可透气表面区域上。

[0072] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约3.5个细胞层到约4.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第二可透气表面区域上。

[0073] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述APC以约4个细胞层的平均厚度层叠到所述第二可透气表面区域上。

[0074] 在一些实施例中,对于其中对第一TIL群体进行所述引发第一扩增的每个容器,在同一容器中对由这种第一TIL群体产生的所述第二TIL群体进行所述快速第二扩增。

[0075] 在一些实施例中,每个容器包括第一可透气表面区域。

[0076] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC),并且所述APC以约一个细胞层到约三个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0077] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述APC以约1.5个细胞层到约2.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0078] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中，所述APC以约2个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0079] 在一些实施例中，在所述快速第二扩增的步骤中，所述APC以约3个细胞层到约5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0080] 在一些实施例中，在所述快速第二扩增的步骤中，所述APC以约3.5个细胞层到约4.5个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0081] 在一些实施例中，在所述快速第二扩增的步骤中，所述APC以约4个细胞层的平均厚度层叠到所述第一可透气表面区域上。

[0082] 在一些实施例中，对于其中在所述引发第一扩增的步骤中对第一TIL群体进行所述引发第一扩增的每个容器，所述第一容器包括第一表面区域，所述细胞培养基包括抗原呈递细胞(APC)，并且所述APC层叠到所述第一可透气表面区域上，并且其中在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.1到约1:10的范围。

[0083] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.2到约1:8的范围。

[0084] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.3到约1:7的范围。

[0085] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.4到约1:6的范围。

[0086] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.5到约1:5的范围。

[0087] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.6到约1:4的范围。

[0088] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.7到约1:3.5的范围。

[0089] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.8到约1:3的范围。

[0090] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率选自约1:1.9到约1:2.5的范围。

[0091] 在一些实施例中，在所述引发第一扩增的步骤中层叠的APC的平均层数与在所述快速第二扩增的步骤中层叠的APC的平均层数的比率为约1:2。

[0092] 在一些实施例中，在所述快速第二扩增的步骤中2到3天之后，用另外的IL-2补充所述细胞培养基。

[0093] 在一些实施例中，所述方法进一步包括在采集所述治疗性TIL群体的步骤中，使用低温保存方法低温保存所采集的TIL群体。

[0094] 在一些实施例中，所述方法进一步包括低温保存所述输注袋的步骤。

[0095] 在一些实施例中，使用比率为1:1的所述所采集的TIL群体与低温保存培养基进行所述低温保存过程。

[0096] 在一些实施例中，所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[0097] 在一些实施例中,所述PBMC是经辐照的且同种异体的。

[0098] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述细胞培养基包括外周血单核细胞(PBMC),并且其中在所述引发第一扩增的步骤中所述细胞培养基中的PBMC的总数为2.5×10^8。

[0099] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中,所述细胞培养基中的所述抗原呈递细胞(APC)是外周血单核细胞(PBMC),并且其中在所述快速第二扩增的步骤中添加到所述细胞培养基的PBMC的总数为5×10^8。

[0100] 在一些实施例中,所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

[0101] 在一些实施例中,在采集所述治疗性TIL群体的步骤中的采集是使用基于膜的细胞处理系统进行的。

[0102] 在一些实施例中,步骤(d)中的采集是使用LOVO细胞处理系统进行的。

[0103] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中,所述多个碎片包括约60个碎片每容器,其中每个碎片的体积为约27mm^3。

[0104] 在一些实施例中,所述多个碎片包括约30个到约60个碎片,其中总体积为约1300mm^3到约1500mm^3。

[0105] 在一些实施例中,所述多个碎片包括约50个碎片,其中总体积为约1350mm^3。

[0106] 在一些实施例中,所述多个碎片包括约50个碎片,其中总质量为约1克到约1.5克。

[0107] 在一些实施例中,所述细胞培养基被提供在选自由G容器和Xuri细胞袋组成的组的容器中。

[0108] 在一些实施例中,在步骤(d)中2到3天之后,用另外的IL-2补充所述细胞培养基。

[0109] 在一些实施例中,IL-2浓度为约10,000IU/mL到约5,000IU/mL。

[0110] 在一些实施例中,IL-2浓度为约6,000IU/mL。

[0111] 在一些实施例中,在将所采集的治疗性TIL群体转移到输注袋的步骤中,所述输注袋是含HypoThermosol的输注袋。

[0112] 在一些实施例中,所述低温保存培养基包括二甲基亚砜(DMSO)。

[0113] 在一些实施例中,所述低温保存培养基包括7%到10%的DMSO。

[0114] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中的第一时间段和在所述快速第二扩增的步骤中的第二时间段各自单独地在5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间段内执行。

[0115] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中的第一时间段在5天、6天或7天的时间段内执行。

[0116] 在一些实施例中,在所述快速第二扩增的步骤中的第二时间段在7天、8天或9天的时间段内执行。

[0117] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增的步骤中的第一时间段和在所述快速第二扩增的步骤中的第二时间段各自单独地在7天的时间段内执行。

[0118] 在一些实施例中,通过采集所述治疗性TIL群体,所述引发第一扩增的步骤在约14天到约16天的时间段内执行。

[0119] 在一些实施例中,通过采集所述治疗性TIL群体,所述引发第一扩增的步骤在约15天到约16天的时间段内执行。

[0120] 在一些实施例中，通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约14天的时间段内执行。

[0121] 在一些实施例中，通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约15天的时间段内执行。

[0122] 在一些实施例中，通过采集所述治疗性TIL群体，所述引发第一扩增的步骤在约16天的时间段内执行。

[0123] 在一些实施例中，所述方法进一步包括使用低温保存过程低温保存所述所采集的治疗性TIL群体的步骤，其中通过采集所述治疗性TIL群体和低温保存，所述引发第一扩增的步骤在16天或更短时间内进行。

[0124] 在一些实施例中，在采集所述治疗性TIL群体的步骤中采集的所述治疗性TIL群体包括用于治疗有效剂量的TIL的足够的TIL。

[0125] 在一些实施例中，足以用于治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。

[0126] 在一些实施例中，在所述快速第二扩增的步骤中的所述第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素γ产生和/或增加的多克隆性。

[0127] 在一些实施例中，与通过长于16天的过程制备的TIL相比，在所述快速第二扩增的步骤中的所述第三TIL群体提供至少一倍到五倍或更多倍的干扰素γ产生。

[0128] 在一些实施例中，相对于在所述引发第一扩增的步骤中从所述第二TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞，在所述快速第二扩增的步骤中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

[0129] 在一些实施例中，将来自所述采集所述治疗性TIL群体的步骤的所述治疗性TIL群体输注到患者体内。

[0130] 在一些实施例中，所述方法进一步包括使用低温保存过程低温保存步骤(f)中的包括所述所采集的TIL群体的所述输注袋的步骤。

[0131] 在一些实施例中，使用比率为1:1的所述所采集的TIL群体与低温保存培养基进行所述低温保存过程。

[0132] 在一些实施例中，所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[0133] 在一些实施例中，所述PBMC是经辐照的且同种异体的。

[0134] 在一些实施例中，所述抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

[0135] 在一些实施例中，步骤(e)中的采集是使用基于膜的细胞处理系统进行的。

[0136] 在一些实施例中，步骤(e)中的采集是使用LOVO细胞处理系统进行的。

[0137] 在一些实施例中，在步骤(c)中，所述多个碎片包括约60个碎片每第一可透气表面区域，其中每个碎片的体积为约$27mm^3$。

[0138] 在一些实施例中，所述多个碎片包括约30个到约60个碎片，其中总体积为约$1300mm^3$到约$1500mm^3$。

[0139] 在一些实施例中，所述多个碎片包括约50个碎片，其中总体积为约$1350mm^3$。

[0140] 在一些实施例中，所述多个碎片包括约50个碎片，其中总质量为约1克到约1.5克。

[0141] 在一些实施例中，所述细胞培养基被提供在选自由G容器和Xuri细胞袋组成的组的容器中。

[0142] 在一些实施例中，IL-2浓度为约10,000IU/mL到约5,000IU/mL。

[0143] 在一些实施例中，IL-2浓度为约6,000IU/mL。

[0144] 在一些实施例中，步骤(d)中的所述输注袋是含HypoThermosol的输注袋。

[0145] 在一些实施例中，所述低温保存培养基包括二甲基亚砜(DMSO)。

[0146] 在一些实施例中，所述低温保存培养基包括7％到10％的DMSO。

[0147] 在一些实施例中，在步骤(c)中的第一时间段和在步骤(c)中的第二时间段各自单独地在5天、6天或7天的时间段内执行。

[0148] 在一些实施例中，在步骤(c)中的第一时间段在5天、6天或7天的时间段内执行。

[0149] 在一些实施例中，在步骤(d)中的第二时间段在7天、8天或9天的时间段内执行。

[0150] 在一些实施例中，在步骤(c)中的第一时间段和在步骤(c)中的第二时间段各自单独地在7天的时间段内执行。

[0151] 在一些实施例中，步骤(a)到(f)在约14天到约16天的时间段内执行。

[0152] 在一些实施例中，步骤(a)到(f)在约15天到约16天的时间段内执行。

[0153] 在一些实施例中，步骤(a)到(f)在约14天的时间段内执行。

[0154] 在一些实施例中，步骤(a)到(f)在约15天的时间段内执行。

[0155] 在一些实施例中，步骤(a)到(f)在约16天的时间段内执行。

[0156] 在一些实施例中，步骤(a)到(f)和低温保存在16天或更短时间内执行。

[0157] 在一些实施例中，在步骤(f)中采集的所述治疗性TIL群体包括用于治疗有效剂量的TIL的足够的TIL。

[0158] 在一些实施例中，足以用于治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。

[0159] 在一些实施例中，步骤(c)中的容器大于步骤(b)中的容器。

[0160] 在一些实施例中，在步骤(d)中的所述第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素γ产生和/或增加的多克隆性。

[0161] 在一些实施例中，与通过长于16天的过程制备的TIL相比，在步骤(d)中的所述第三TIL群体提供至少一倍到五倍或更多倍的干扰素γ产生。

[0162] 在一些实施例中，相对于在步骤(c)中从所述第二细胞群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞，在步骤(d)中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

[0163] 在一些实施例中，将来自步骤(f)的所述TIL输注到患者体内。

[0164] 在一些实施例中，本发明提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括施用经扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，所述方法包括：

[0165] (a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体；

[0166] (b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL，以获得富含PD-1的TIL群体；

[0167] (c)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增，以产生第二TIL群体，其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行，其中所述引发第一扩增进行持续约1到7天以获得所述第二TIL群体，其中所述第二TIL群体在数量上比所述第一TIL群体多至少50倍；

[0168] (d)通过用另外的IL-2、OKT-3和APC补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中添加到所述快速第二扩增的APC的数量是在步骤(b)中添加的APC的数量的至少两倍,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体,其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行;

[0169] (e)采集从步骤(c)获得的所述治疗性TIL群体;

[0170] (f)将来自步骤(d)的所采集的TIL群体转移到输注袋;以及

[0171] (g)向所述受试者施用治疗有效剂量的来自步骤(e)的TIL。

[0172] 在一些实施例中,足以在步骤(g)中施用治疗有效剂量的TIL的数量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。

[0173] 在一些实施例中,所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0174] 在一些实施例中,步骤(b)的选择包括以下步骤:(i)将所述第一TIL群体暴露于过量的单克隆抗PD-1 IgG4抗体,所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合;(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体;以及(iii)基于所述荧光团进行基于流动的细胞分选,以获得富含PD-1的TIL群体。

[0175] 在一些实施例中,所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体是纳武单抗或其变体、片段或缀合物。

[0176] 在一些实施例中,所述抗IgG4抗体是克隆抗人IgG4,克隆HP6023。

[0177] 在一些实施例中,所述抗原呈递细胞(APC)是PBMC。

[0178] 在一些实施例中,在步骤(g)中施用治疗有效剂量的TIL细胞之前,已经向所述患者施用非清髓性淋巴细胞耗减方案。

[0179] 在一些实施例中,所述非清髓性淋巴细胞耗减方案包括以下步骤:以60毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天,随后以25毫克/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天。

[0180] 在一些实施例中,所述方法进一步包括在步骤(g)中向所述患者施用所述TIL细胞之后的那天开始,用高剂量IL-2方案治疗所述患者的步骤。

[0181] 在一些实施例中,所述高剂量IL-2方案包括每八小时以15分钟团注静脉内输注施用600,000或720,000IU/kg,直到耐受为止。

[0182] 在一些实施例中,在步骤(c)中的所述第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素γ产生和/或增加的多克隆性。

[0183] 在一些实施例中,与通过长于16天的过程制备的TIL相比,在步骤(d)中的所述第三TIL群体提供至少一倍到五倍或更多倍的干扰素γ产生。

[0184] 在一些实施例中,相对于在步骤(c)中从所述第二细胞群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞,在步骤(d)中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

[0185] 在一些实施例中,所述癌症选自由以下组成的组:黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。

[0186] 在一些实施例中,所述癌症选自由以下组成的组:黑素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包含GBM)和胃肠癌。

[0187] 在一些实施例中,所述癌症是黑素瘤。

[0188] 在一些实施例中,所述癌症是HNSCC。

[0189] 在一些实施例中,所述癌症是宫颈癌。

[0190] 在一些实施例中,所述癌症是NSCLC。

[0191] 在一些实施例中,所述癌症是成胶质细胞瘤(包含GBM)。

[0192] 在一些实施例中,所述癌症是胃肠癌。

[0193] 在一些实施例中,所述癌症是高突变癌症。

[0194] 在一些实施例中,所述癌症是儿科高突变癌症。

[0195] 在一些实施例中,所述容器是GREX-10。

[0196] 在一些实施例中,密闭容器包括GREX-100。

[0197] 在一些实施例中,密闭容器包括GREX-500。

[0198] 在一些实施例中,所述受试者先前已经用抗PD-1抗体治疗。

[0199] 在一些实施例中,所述受试者先前尚未用抗PD-1抗体治疗。

[0200] 在一些实施例中,在步骤(b)中,通过执行以下步骤从所述第一TIL群体中选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与抗PD-1抗体接触以在所述第一TIL群体中形成所述抗PD-1抗体和所述TIL细胞的第一复合物的步骤;以及然后执行分离所述第一复合物以获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤。

[0201] 在一些实施例中,所述抗PD-1抗体包括Fc区,其中在形成所述第一复合物的步骤之后并且在分离所述第一复合物的步骤之前,所述方法进一步包括使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物的步骤,所述抗Fc抗体与所述抗PD-1抗体的所述Fc区结合,并且其中所述分离所述第一复合物的步骤是通过分离所述第二复合物执行的。

[0202] 在一些实施例中,用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体选自由以下组成的组:EH12.2H7、PD1.3.1、M1H4、纳武单抗(BMS-936558,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb);Opdivo®)、派姆单抗(pembrolizumab)(兰伯丽珠单抗(lambrolizumab),MK03475或MK-3475,默克公司(Merck);Keytruda®)、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司(ShangHai JunShi))、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司(Tesaro,Inc.))、皮地利珠单抗(Pidilizumab)(抗PD-1 mAb CT-011,麦迪韦逊医疗公司(Medivation))、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司(BeiGene))和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司(ShangHai HengRui))、人单克隆抗体REGN2810(再生元公司(Regeneron))、人单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)、人源化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(诺华公司(Novartis))和RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。

[0203] 在一些实施例中,用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体是EH12.2H7。

[0204] 在一些实施例中,用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体与不同于纳武单抗或派姆单抗的表位结合。

[0205] 在一些实施例中,用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体与EH12.2H7或纳武单抗结合同一表位。

[0206] 在一些实施例中,用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体是纳武单抗。

[0207] 在一些实施例中,所述受试者先前已经用第一抗PD-1抗体治疗,其中在步骤(b)

中,通过使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触来选择所述PD-1阳性TIL,并且其中所述第二抗PD-1抗体不被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合。

[0208] 在一些实施例中,所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触来选择所述PD-1阳性TIL,并且其中所述第二抗PD-1抗体被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合。

[0209] 在一些实施例中,所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过执行以下步骤来选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触以形成所述第二抗PD-1抗体和所述第一TIL群体的第一复合物的步骤,其中所述第二抗PD-1抗体不被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合;以及然后执行分离所述第一复合物以获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤。

[0210] 在一些实施例中,所述第一抗PD-1抗体和所述第二抗PD-1抗体包括Fc区,其中在形成所述第一复合物的步骤之后并且在分离所述第一复合物的步骤之前,所述方法进一步包括使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物的步骤,所述抗Fc抗体与所述第一抗PD-1抗体的所述Fc区和所述第二抗PD-1抗体的所述Fc区结合,并且其中所述分离所述第一复合物的步骤是通过分离所述第二复合物执行的。

[0211] 在一些实施例中,所述第二抗PD-1抗体包括Fc区,所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过执行以下步骤来选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触以形成所述第二抗PD-1抗体和所述第一TIL群体的第一复合物的步骤,其中所述第二抗PD-1抗体不被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述第一TIL群体结合,并且其中在形成所述第一复合物的步骤之后,所述方法进一步包括以下步骤:使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物,所述抗Fc抗体与所述第二抗PD-1抗体的所述Fc区结合,以及然后执行分离所述第二复合物以获得富含PD-1的TIL群体的步骤。

[0212] 在一些实施例中,所述受试者先前已经用第一抗PD1抗体治疗,其中在步骤(b)中,通过执行以下步骤来选择所述PD-1阳性TIL:执行使所述第一TIL群体与第二抗PD-1抗体接触以形成所述第二抗PD-1抗体和所述第一TIL群体的第一复合物的步骤,其中所述第二抗PD-1抗体被不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体阻断与所述PD-1阳性TIL结合,其中所述第一抗PD-1抗体和所述第二抗PD-1抗体包括Fc区,其中在形成所述第一复合物的步骤之后并且在获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤之前,所述方法进一步包括以下步骤:使所述第一复合物与抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和所述第一复合物的第二复合物,所述抗Fc抗体与所述第二抗PD-1抗体的所述Fc区结合;以及使不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体与所述抗Fc抗体接触以形成所述抗Fc抗体和不溶于所述第一TIL群体的所述第一抗PD-1抗体的第三复合物,以及执行分离所述第二复合物和所述第三复合物以获得所述富含PD-1的TIL群体的步骤。

[0213] 在一些实施例中,所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0214] 在一些实施例中,本发明提供了一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备

的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中所述治疗性TIL群体提供增加的功效和/或增加的干扰素γ产生。

[0215] 在一些实施例中,本发明提供了一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中所述治疗性TIL群体提供增加的功效和/或增加的干扰素γ产生。

[0216] 在一些实施例中,本发明提供了一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中所述治疗性TIL群体提供增加的干扰素γ产生。

[0217] 在一些实施例中,本发明提供了一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中所述治疗性TIL群体提供增加的功效。

[0218] 在一些实施例中,本发明提供了一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中与通过长于16天的过程制备的TIL相比,所述治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素γ产生。

[0219] 在一些实施例中,本发明提供了一种由选自患者的肿瘤组织的PD-1阳性细胞制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体,其中与通过长于16到22天的过程制备的TIL相比,所述治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素γ产生。

[0220] 在一些实施例中,从所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL以获得富含PD-1的TIL群体包括从第一TIL群体中选择为PD-1阳性TIL的至少11.27%到74.4%的TIL群体。

[0221] 在一些实施例中,步骤的选择包括以下步骤:

[0222] (i)将所述第一TIL群体和PBMC群体暴露于过量的单克隆抗PD-1 IgG4抗体,所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合;

[0223] (ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体;

[0224] (iii)如通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的,相比于所述PBMC群体中的强度,基于所述第一TIL群体中的所述PD-1阳性TIL的荧光团的强度获得所述富含PD-1的TIL群体。

[0225] 在一些实施例中,所述第一群体和所述PBMC群体两者中的荧光团的强度用于建立FACS门,以确立分别对应于PD-1阴性TIL、PD-1中间体TIL和PD-1阳性TIL的低水平、中间水平和高水平的强度。

[0226] 在一些实施例中,所述FACS门是在步骤(a)之后建立的。

[0227] 在一些实施例中,所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0228] 在一些实施例中,至少80%的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。

[0229] 本发明还提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:

[0230] (a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体;

[0231] (b)从(a)中的所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL,以获得富含PD-1的TIL群体,其中至少范围为10%到80%的所述第一TIL群体是PD-1阳性TIL;

[0232] (c)通过在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养所述富含PD-1的TIL群体来进行引发第一扩增,以产生第二TIL群体,其中所述引发第一扩增在包括第一可透气表面区域的容器中进行,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7/8天的第一时

间段以获得所述第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;

[0233] (d)通过用另外的IL-2、OKT-3和APC补充所述第二TIL群体的所述细胞培养基进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中在所述快速第二扩增中添加的APC的数量是在步骤(b)中添加的APC的数量的至少两倍,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天的第二时间段以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体,其中所述快速第二扩增在包括第二可透气表面区域的容器中进行;

[0234] (e)采集从步骤(d)获得的所述治疗性TIL群体;以及

[0235] (f)将来自步骤(e)的所采集的TIL群体转移到输注袋。

[0236] 在一些实施例中,步骤(b)的选择包括以下步骤:

[0237] (i)将所述第一TIL群体和PBMC群体暴露于过量的单克隆抗PD-1 IgG4抗体,所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合;

[0238] (ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体;

[0239] (iii)如通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的,相比于所述PBMC群体中的强度,基于所述第一TIL群体中的所述PD-1阳性TIL的荧光团的强度获得所述富含PD-1的TIL群体。

[0240] 在一些实施例中,所述第一群体和所述PBMC群体两者中的荧光团的强度用于建立FACS门,以确立分别对应于PD-1阴性TIL、PD-1中间体TIL和PD-1阳性TIL的低水平、中间水平和高水平的强度。

[0241] 在一些实施例中,所述FACS门是在步骤(a)之后建立的。

[0242] 在一些实施例中,所述PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0243] 在一些实施例中,至少80%的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。

[0244] 在一些实施例中,所述第三TIL群体在所述容器中包括至少约1×10^{8}个TIL。

[0245] 在一些实施例中,所述第三TIL群体在所述容器中包括至少约1×10^{9}个TIL。

[0246] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增中富含PD-1的TIL的数量为约1×10^{4}到约1×10^{6}。

[0247] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增中富含PD-1的TIL的数量为约5×10^{4}到约1×10^{6}。

[0248] 在一些实施例中,在所述引发第一扩增中富含PD-1的TIL的数量为约2×10^{5}到约1×10^{6}。

[0249] 在一些实施例中,所述方法进一步包括在执行步骤(a)之前,对来自从所述受试者切除的肿瘤的所述第一TIL群体执行低温保存的步骤。

附图说明

[0250] 图1A-1B:A)示出了用于TIL制造的2A工艺(大约22天的工艺)与Gen 3工艺的实施例(大约14天到16天的工艺)之间的比较。B)提供步骤A到F的概述的示例性工艺PD-1 Gen 3图(大约14天到16天的工艺)。C)提供三个示例性Gen 3工艺及三个工艺变型中的每一个的步骤A到F(大约14天到16天的工艺)的概述的图。

[0251] 图2:提供GEN 2(工艺2A)与PD-1 GEN 3之间的可比性的实验流程图。

[0252] 图3A-3C:A)L4054—在Gen 2和Gen 3工艺中对TIL产物的表型表征。B)L4055—在Gen 2和Gen 3工艺中对TIL产物的表型表征。C)M1085T—在Gen 2和Gen 3工艺中对TIL产物

的表型表征。

[0253] 图4A-4C:A)L4054—对来自Gen 2和Gen 3工艺的TIL产物的记忆标志物分析。B)L4055—对来自Gen 2和Gen 3工艺的TIL产物的记忆标志物分析。C)M1085T—来自Gen 2和Gen 3工艺的TIL产物的记忆标志物分析。

[0254] 图5:(A)在CD4+上进行门控,(B)在CD8+上进行门控的L4054活化和耗尽标志物。

[0255] 图6:(A)在CD4+上进行门控,(B)在CD8+上进行门控的L4055活化和耗尽标志物。

[0256] 图7:IFNγ产生(pg/mL):Gen 2和Gen 3工艺的(A)L4054、(B)L4055和(C)M1085T:此处表示的每个条形图为经刺激、未经刺激和培养基对照的IFNγ水平的平均值+SEM。在450nm下测量光密度。

[0257] 图8:细胞培养物上清液中的IL-2浓度的ELISA分析:(A)L4054和(B)L4055。此处表示的每个条形图为用过的培养基上的IL-2水平的平均值+SEM。在450nm下测量光密度。

[0258] 图9:用过的培养基中的葡萄糖和乳酸的量化(g/L):(A)葡萄糖和(B)乳酸:在两个肿瘤株中,并且在两个工艺中,在整个REP扩增过程中观察到葡萄糖减少。相反地,正如预期,观察到乳酸增加。Gen 2与Gen 3工艺之间的葡萄糖减少和乳酸增加均相当。

[0259] 图10:A)对L4054和L4055的用过的培养基中的L-谷氨酰胺的量化。B)对L4054和L4055的用过的培养基中的Glutamax的量化。C)对L4054和L4055的用过的培养基中的氨的量化。

[0260] 图11:端粒长度分析:以上RTL值表明,Gen 2和Gen 3工艺中的每个染色体/基因组的平均端粒荧光与使用DAKO试剂盒的对照细胞系(1301白血病细胞系)中的每个染色体/基因组的端粒荧光相同。

[0261] 图12:在Gen 2和Gen 3工艺下,L4054和L4055上的TIL最终产物的独特CDR3序列分析。柱示出了从Gen 2工艺采集日(例如,第22天)和Gen 3工艺采集日(例如,第14-16天)收集的1×10^6个细胞中鉴定出的独特TCR B克隆型的数量。基于样品内独特肽CDR的数量,Gen 3示出与Gen 2相比更高的克隆多样性。

[0262] 图13:L4054 IL采集的最终细胞产物(Gen 2工艺(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第14-16天))上的独特CDR3序列的频率。

[0263] 图14:L4055 TIL采集的最终细胞产物(Gen 2(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第14-16天))上的独特CDR3序列的频率。

[0264] 图15:在Gen 2和Gen 3工艺下,L4054和L4055上的TIL最终产物的多样性指数。香农熵多样性指数(Shanon entropy diversity index)为用于比较的更可靠且常用的度量。Gen 3L4054和L4055示出了比Gen 2略微更高的多样性。

[0265] 图16:表22(参见以下实例5)中呈现的第7天-Gen 3REP起始时的细胞计数的原始数据。

[0266] 图17:表22(参见以下实例5)中呈现的第11天-Gen 2REP起始和Gen 3规模扩大时的细胞计数的原始数据。

[0267] 图18:表23(参见以下实例5)中呈现的第16天-Gen 2规模扩大和Gen 3采集(例如,第16天)时的细胞计数的原始数据。

[0268] 图19:表23(参见以下实例5)中呈现的第22天-Gen 2采集(例如,第22天)时的细胞计数的原始数据。对于L4054 Gen 2,因为研究的总数,将LOVO后计数外推到4个烧瓶。1个烧

瓶被污染,并且进行外推,得到总数=6.67E+10。

[0269] 图20:图3A、4A和4B中描绘的流式细胞术结果的原始数据。

[0270] 图21:图3C和4C中描绘的流式细胞术结果的原始数据。

[0271] 图22:图5和6中描绘的流式细胞术结果的原始数据。

[0272] 图23:图7中描绘的L4054样品的IFNγ产生测定结果的原始数据。

[0273] 图24:图7中描绘的L4055样品的IFNγ产生测定结果的原始数据。

[0274] 图25:图7中描绘的M1085T样品的IFNγ产生测定结果的原始数据。

[0275] 图26:图8中描绘的IL-2ELISA测定结果的原始数据。

[0276] 图27:图9和图10中呈现的代谢底物和代谢分析结果的原始数据。

[0277] 图28:图11中呈现的相对端粒长度分析结果的原始数据。

[0278] 图29:图12和15中呈现的独特CD3序列和克隆多样性分析结果的原始数据。

[0279] 图30:示出了各种Gen 2(2A工艺)与Gen 3.1工艺实施例之间的比较。

[0280] 图31:描述Gen 2、Gen 2.1和Gen 3.0工艺的实施例的各种特征的图表。

[0281] 图32:Gen 3工艺的实施例(称为Gen 3.1)的培养基条件的概述。

[0282] 图33:描述Gen 2、Gen 2.1和Gen 3.0工艺的实施例的各种特征的图表。

[0283] 图34:比较Gen 2和Gen 3.0工艺的实施例的各种特征的图表。

[0284] 图35:提供所描述的扩增工艺的各个实施例中的培养基用途的图表。

[0285] 图36:表型比较:所述工艺的Gen 3.0和Gen 3.1实施例示出相当的CD28、CD27和CD57表达。

[0286] 图37:Gen 3最终产物上的更高IFNγ产生。在培养冷冻上清液中评估IFNγ分析(通过ELISA)以比较两个工艺。对于每个肿瘤,在每个Gen 2(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第16天)中使用新鲜TIL产物刺激抗CD3涂布的培养板整夜。此处表示的每个条形图为经刺激、未经刺激和培养基对照的IFNγ水平。

[0287] 图38:上图:TIL最终产物的独特CDR3序列分析:柱示出了从Gen 2工艺(例如,第22天)和Gen 3工艺(例如,第14-16天)收集的1×10^6个细胞中鉴定出的独特TCR B克隆型的数量。基于样品内独特肽CDR的数量,Gen 3示出与Gen 2相比更高的克隆多样性。下图:TIL最终产物的多样性指数:香农熵多样性指数为用于比较的更可靠的常用度量。Gen 3示出比Gen 2略微更高的多样性。

[0288] 图39:Gen 3与Gen 2最终产物之间共享199个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的97.07%。

[0289] 图40:Gen 3与Gen 2最终产物之间共享1833个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的99.45%。

[0290] 图41:Gen 3工艺的示例性实施例(16天的工艺)的示意图。

[0291] 图42:扩增前PD-1选择的示意图。

[0292] 图43:纳武单抗(nivolumab)与PD-1的结合结构。参见,根据Tan,S.等人的图5(Tan,S.等人,《自然通讯(Nature Communications)》),8:14369|DOI:10.1038/ncomms14369(2017))。

[0293] 图44:派姆单抗与PD-1的结合结构。参见,根据Tan,S.等人的图5(Tan,S.等人,《自然通讯》),8:14369|DOI:10.1038/ncomms14369(2017))。

[0294] 图45:开发了流线型方案,以将PD1+TIL扩增到临床相关水平。将肿瘤从患者身上切除并且运送到研究实验室。到达后,消化肿瘤,并且对单细胞悬浮液进行CD3和PD1染色。使用FX500仪器(索尼(Sony))通过FACS对PD1+TIL进行分选。将PD1+细胞级分置于具有抗人CD3抗体(OKT3;30ng/ml)的烧瓶中,并且以1:100(TIL:饲养层细胞)比率辐照同种异体PBMC(饲养层细胞),并且快速扩增22天(REP)。

[0295] 图46:PD1+TIL的频率因肿瘤样品而异,但体外扩增过程可靠地产生超过10亿个TIL。从黑素瘤(n=6)、肺癌(n=7)、乳腺癌(n=6)和肉瘤(n=3)中扩增所选和本体TIL,(A)示出每个个体样品的新鲜肿瘤消化物中的PD1+细胞的频率。水平线和垂直线分别表示平均值和标准误差。(B)PD1+和PD1-分选的细胞和本体消化物如图1所述进行扩增。在REP结束时对细胞进行计数,并且计算出用于外推总细胞计数的倍数扩增(最终细胞计数/接种细胞计数)。对于本体TIL,使用肿瘤消化物中的T细胞的百分比估计接种细胞计数。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。

[0296] 图47:与PD1-TIL相比,PD1+TIL表现出不同的表型谱。在分选之前,通过流式细胞术对来自黑素瘤(n=2)、肺(n=2)和乳腺(n=2)的消化肿瘤进行表型评估。(A)来自消化黑素瘤肿瘤的TIL上的表面标志物表达的代表性绘图。首先将样本在CD3上进行门控并且绘制阳性和阴性PD1事件的双轴图。然后使两个级分经受无监督的viSNE聚类。顶行含有PD1肯定事件,并且底行含有PD1否定事件。(B-C)将活淋巴细胞在CD3+细胞上进行门控并且评估PD1+和PD1-。评估的PD1+和PD1-群体的细胞表面表达的(B)活化和(C)耗尽标志物。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试****P<0.0001,*p<0.05评估统计显著性。

[0297] 图48:在$PD1^{+}$TIL体外扩增时,PD1表达降低。通过流式细胞术评估来自黑素瘤(n=1)、肺(n=4)和乳腺(n=2)的PD1+预分选TIL和体外扩增的PD1+TIL(PD1+源性TIL)的细胞表面表达T细胞标志物。条形图表示在2种TIL制剂中每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。通过配对学生t检验***P<0.001,**p<0.01评估统计显著性。

[0298] 图49:体外扩增的PD1+TIL表型类似于本体TIL。通过流式细胞术对来自黑素瘤(n=5)、肺(n=7)、乳腺(n=6)和肉瘤(n=3)的PD1+源性TIL、PD1-源性TIL和本体TIL的T细胞标志物的细胞表面表达进行表型评估。(A)基于CD3+细胞上的(CD45RA和CCR7)水平鉴定了四个效应子/记忆亚群。TEM=效应记忆(CD45RA-,CCR7-),TCM=中央记忆(CD45RA-,CCR7+),TSCM=干细胞记忆(CD45RA+,CCR7+),TEMRA=效应T细胞(CD45RA+,CCR7-)。还评估了(B)分化标志物、(C)耗尽和(D)活化。条形图表示在所有3种TIL制剂中每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0299] 图50:经扩增的PD1+TIL是寡克隆的并且包括本体TIL中存在的克隆的一部分。通过RNA测序对来自黑素瘤(n=2)、乳腺(n=2)和肺(n=2)的所选PD1和本体TIL进行分析。(A)对独特的CDR3(uCDR3)肽序列进行编号并且使用阿纳康达有限公司(Anaconda,Inc)的Python 3.6.3的pandas和绘图数据库文库生成盒形图。(B)通过iRepertoire计算每个样品的香农多样性指数(Shannon Diversity index),并且使用阿纳康达有限公司的Python 3.6.3的pandas和绘图数据库文库生成盒形图。条形图表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。通过配对学生t测试***P<0.001,**p<0.01评估统计显著性。(C)对于所测序的样品中的每个样品,将uCDR3频率以降序排列并且以所指示的间隔(最高等级的

uCDR3、2-10、11-20等级的CDR3等)进行报告或求和。然后按组对频率取平均值,并且使用Excel v.1803进行绘制。(D)在互补性本体TIL和PD1+源性样品中鉴定共享的uCDR3克隆。在“共享%”列中报告每个共享的独特CDR3克隆的频率的总和。

[0300] 图51:如通过响应于非特异性刺激的IFNγ分泌和CD107a动员所确定的,经扩增的PD1+TIL是功能性的。A)用板结合的抗CD3刺激来自黑素瘤(n=5)、肺(n=6)和乳腺(n=6)的PD1+源性TIL、PD1-源性TIL和本体TIL,持续18小时。通过ELISA评估上清液的IFNγ分泌。绘制了单个样品的结果。(B)通过流式细胞术,响应于在CD4+和CD8+细胞上持续4小时的PMA刺激,评估来自黑素瘤(n=5)、肺(n=7)、乳腺(n=6)和肉瘤(n=1)的PD1+源性TIL、PD1-源性的TIL和本体TIL的CD107a细胞表面表达。绘制了单个样品的结果。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0301] 图52:相对于PD1-TIL,经扩增的PD1+TIL表现出自体黑素瘤细胞杀伤和肿瘤反应性增强。在来自一个黑素瘤样品的经PD1选择的TIL产物上评估肿瘤反应性。(A)使用死细胞去除试剂盒(美天旎(Miltenyi))清除全肿瘤消化物。将1e5活细胞铺板在96孔板的每个孔中,并且允许在37℃下在xCELLigence仪器(ACEA生物科学有限公司(ACEA Biosciences,Inc.))中粘附18小时。将1e5 PD1+源性和PD1-源性自体TIL添加到其相应的孔中,从而产生1:1(TIL:靶标)细胞比率,并且温育48小时。自体靶细胞的杀伤被记录为由细胞脱离引起的阻抗增加。使用公式细胞溶解%=[1-(NCIst)/(AvgNCIRt)]×100计算细胞杀伤(细胞溶解%)(最左边的图),其中NCIst是样品的归一化细胞指数,并且NCIRt是匹配的参考孔(单独消化)的归一化细胞指数的平均值。右图示出了样品的归一化细胞指数。(B)将来自全肿瘤消化物的1e5细胞与1e5 TIL(或单独的消化物和TIL)共培养18小时。通过ELISA(R&D系统公司(R&D systems))评估上清液的IFNγ释放。条形图表示重复孔的平均值,并且垂直线表示标准误差。

[0302] 图53:使用荧光活化细胞分选从肿瘤消化物中选择PD1+细胞。

[0303] 图54:肿瘤组织消化方法的鉴定。

[0304] 图55:使用GMP可用试剂鉴定肿瘤组织消化方法。

[0305] 图56:使用GMP可用试剂鉴定肿瘤组织消化方法。

[0306] 图57:使用GMP可用试剂鉴定肿瘤组织消化方法。

[0307] 图58:新鲜肿瘤消化物的分选产率高于冷冻肿瘤消化物。

[0308] 图59:PD1在新鲜和冷冻TIL中的类似表达。

[0309] 图60:PD1抗体滴定:使用可商购获得的克隆的可变表达PD1。

[0310] 图61:纳武单抗抑制5种可商购获得的PD1染色抗体的结合。

[0311] 图62:派姆单抗差异抑制5种可商购获得的PD1染色抗体的结合。

[0312] 图63:在用派姆单抗预温育细胞时,PD-1MFI显著降低。

[0313] 图64:在与EH12.2H7克隆相比时,与Pembro和Nivo共温育并且用IgG4二级染色的TIL表现出PD-1的类似表达。

[0314] 图65:将TIL与Pembro和Nivo温育不会改变检测表面PD1表达的能力。

[0315] 图66:PD1选择的分选和扩增结果。

[0316] 图67:PD1选择的分选和扩增结果。

[0317] 图68:PD1选择的分选和扩增结果。

[0318] 图69:PD1+源性TIL的最佳接种密度大于10,000个细胞。

[0319] 图70:与PD1-TIL相比,$PD1^{+}$TIL表现出不同的表型谱。

[0320] 图71:与PD1-TIL相比,$PD1^{+}$TIL表现出不同的表型谱。

[0321] 图72:PD1+TIL的频率因肿瘤样品而异,并且需要2个REP周期来克服低初始增殖速率。

[0322] 图73:PD1+TIL的频率因肿瘤样品而异,并且需要2个REP周期来克服初始增殖性缺陷。

[0323] 图74:体外扩增的PD1+TIL表型类似于本体TIL。

[0324] 图75:在PD1+TIL体外扩增时,PD1表达降低。

[0325] 图76:$PD1^{+}$选择的TIL是寡克隆的并且损害本体TIL中存在的克隆的一部分。

[0326] 图77:$PD1^{+}$选择的TIL是寡克隆的并且损害本体TIL中存在的克隆的一部分。

[0327] 图78:$PD1^{+}$选择的TIL是寡克隆的并且损害本体TIL中存在的克隆的一部分。

[0328] 图79:$PD1^{+}$选择的TIL是寡克隆的并且损害本体TIL中存在的克隆的一部分。

[0329] 图80:如通过响应于非特异性刺激的IFNγ分泌和CD107a动员所确定的,$PD1^{+}$源性TIL是功能性的。

[0330] 图81:$PD1^{+}$源性TIL在黑素瘤中表现出与$PD1^{-}$源性TIL和本体TIL相比增强的杀伤。

[0331] 图82:$PD1^{+}$源性TIL在黑素瘤中表现出与PD^{-}和本体源性TIL相比增强的肿瘤细胞杀伤。

[0332] 图83:用于使用Gen 3扩增平台从造血系统恶性肿瘤扩增TIL的方法的说明性实施例。

[0333] 图84:在若干体外测定中,离体扩增的PD1+TIL表现出效应子活性。数据表明PD1+选择的TIL是抗原特异性的并且具有更大的效应子功能。

[0334] 图85:用于肿瘤消化和PD-1+选择步骤(包含PD-1高选择)的示例性实施例的示意图。

[0335] 图86:PD-1选择的TIL数据和信息,包含uCDR号以及扩增数据。

[0336] 图87:使用EH12.2H7抗PD-1抗体而不是M1H4抗PD-1抗体的PD-1选择TIL分选策略和数据。

[0337] 图88:示出了在使用EH12.2H7抗PD-1抗体的PD-1高门控策略中的群体的PD-1选择的TIL分选数据。

[0338] 图89:示出了用于分选M1H4抗PD-1抗体和EH12.2H7抗PD-1抗体的抗PD1抗体的评估的PD1+分选策略数据。

[0339] 图90:用于TIL选择的PD-1染色。数据显示,EH12.2H7和M1H4表现出在PBMC和TIL中不同的PD1谱。

[0340] 图91:M1H4源性TIL相对于EH12.2H7源性TIL的比较分析。在EH12.2H7分选的TIL中PD1+的频率增加。

[0341] 图92:在使用M1H4克隆的REP1期间,PD1+源性TIL中的倍数扩增减少。

[0342] 图93:M1H4源性TIL和EH12.2H7源性TIL的比较分析。在M1H4分选的TIL中观察到更大的寡克隆性(多样性降低)。(香农熵是反映存在多少种不同类型的物种的标准量度。)

[0343] 图94:与具有M1H4克隆的本体TIL相比,与EH12.2H7克隆相比,在PD1+源性TIL中观

察到更大的寡克隆性(多样性降低)。(香农熵是反映存在多少种不同类型的物种的标准量度。)

[0344] 图95:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0345] 图96:开发用于经PD1选择的TIL的改进的Gen 2工艺的示例性实施例的示意图。

[0346] 图97:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:关于小(上图)和大(下图)标度,对不同肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0347] 图98:开发用于经PD1选择的TIL的改进的扩增工艺的示例性实施例的示意图。

[0348] 图99:示出了PD1+条件在第17天的早期REP采集产生55e9和37e9 TIL的数据。

[0349] 图100:示出了如图96和98中描述的,两个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的IFNγ分泌。

[0350] 图101:示出了如图96和98中描述的,两个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的颗粒酶B分泌。

[0351] 图102:示出了如图96和98中描述的,一个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的CD3+CD45+群体。PD1+Gen 2条件>90%CD3+CD45+。

[0352] 图103:示出了如图96和98中描述的,一个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的CD3+CD45+群体。PD1+Gen 2条件>90%CD3+CD45+。

[0353] 图104:示出了如图96和98中描述的,一个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的TIL谱特性。纯度:>90%TCR a/b+且没有可检测的NK或单核细胞或B细胞。

[0354] 图105:示出了如图96和98中描述的,一个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的TIL谱特性。纯度:>90%TCR a/b+且没有可检测的NK或单核细胞或B细胞。

[0355] 图106A-B:示出了如图96和98中描述的,两个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的TIL谱特性。分化:PD1+Gen 2分化状态相当。

[0356] 图107A-B:示出了如图96和98中描述的,两个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的TIL谱特性。记忆:PD1+Gen 2主要是效应记忆TIL。

[0357] 图108A-B:示出了如图96和98中描述的,两个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的TIL谱特性。CD4+上的活化和耗尽状态是类似的。

[0358] 图109:示出了如图96和98中描述的,两个肿瘤样品在多种扩增工艺条件下的TIL谱特性。CD8+上的活化和耗尽状态是类似的。

[0359] 图110:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对不同肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控,比较预分选和后分选。

[0360] 图111:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对L4097肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0361] 图112:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对L4089肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0362] 图113:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对H3035肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0363] 图114:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对M1139肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0364] 图115:示出了PD1$^+$选择的示例性数据:对L4100肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行

门控。

[0365] 图116:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对OV8030肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0366] 图117:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对L4104肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0367] 图118:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对M1132肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0368] 图119:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对M1136肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0369] 图120:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对H3037肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0370] 图121:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对L4106肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0371] 图122:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对L1141肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0372] 图123:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对L4096肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0373] 图124:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对H3038肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0374] 图125:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对L4101肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。(注意:第三小图中的CD8可能存在门控问题。)

[0375] 图126:示出了PD1^{+}选择的示例性数据:对L4097肿瘤样品的PD1+高(PD-1高)进行门控。

[0376] 图127:示出在各种PD-1选择的群体中的扩增的数据。PD-1高扩增细胞在REP1中的扩增可能减少。

[0377] 图128:PD-1选择的分选和扩增结果的汇总。使用EH12.2H7抗PD-1抗体对PD1^{高}细胞进行分选。

[0378] 图129:PD-1选择的分选和扩增结果的汇总。使用EH12.2H7抗PD-1抗体对PD1^{高}细胞进行分选。

[0379] 图130:来自图128和129的用于PD-1选择的分选和扩增结果的汇总数据的图形表示。使用EH12.2H7抗PD-1抗体对PD1^{高}细胞进行分选。

[0380] 图131:提供结构I-A和I-B,圆柱体是指单独的多肽结合结构域。结构I-A和I-B包括源自例如4-1BBL或与4-1BB结合的抗体的三个线性连接的TNFRSF结合结构域,所述结合结构域折叠以形成三价蛋白质,接着通过IgG1-Fc(包含CH3和CH2结构域)连接到第二三价蛋白质,接着用以通过二硫键(小细长卵形)将两个三价蛋白质连接在一起,使所述结构稳定并且提供能够将六个受体的胞内信号传导结构域和信号传导蛋白质聚集在一起以形成信号传导复合物的激动剂。以圆柱体形式表示的TNFRSF结合结构域可以是scFv结构域,其包括例如,由可以包括亲水性残基和具有灵活性的Gly及Ser序列以及具有溶解性的Glu及Lys的连接子连接的VH和VL链。

[0381] 图132:示出了对于以上看到的两个下拉菜单所选的100,000个细胞集合的数据。证实细胞群体被正确门控。通过使用PBMC、FMO对照和样品本身来区分三个群体,将门设置为高、中和低。

[0382] 图133:左上图:这是FMO对照。确保int门和高门小于0.5%。右上图:其中高和中部的分离不清楚的代表性绘图。这天的背景较高,从而导致负门较高。下图:高和中部的清楚表示。数据提供了可能有必要调整BSC或FSC设置。未调整任何其它通道的电压。根据需要调整PD1门。

[0383] 图134:经PD1选择的和未经选择的TIL的独特CDR3vβ组成。对来自2个HNSCC和5个NSCLC的经扩增的未经选择和经PD1选择的TIL的CDR3vβ的库进行分析。绘制每个单独样品的独特的CDR3β的数量,标注为uCDR3计数(A.)和以香农熵(B.)表示的多样性指数。配对的样品通过彩色线连接。通过配对t测试计算的P值在其相应的图表上进行标注。

[0384] 图135:示出了经PD1选择的与未经选择的TIL之间的克隆重叠的图。对来自2个HNSCC和5个NSCLC的经扩增的TIL的CDR3vβ的库进行分析。A.经PD1选择的(蓝色)与未经选择的(红色)的TIL样品之间共享的独特CDR3vβ的数量显示在每个单独肿瘤样品的维恩图的交叉点上(B.-D)。针对每个单独样品绘制未经选择的与经PD1选择的TIL中的共享TIL的百分比和部分(E.)。配对的样品通过彩色线连接。通过配对t测试计算的P值在其相应的图表上进行标注。

[0385] 图136:在未经选择的TIL产物中前10个经PD1选择的TIL克隆的频率。(A.-C.)对来自2个HNSCC和5个NSCLC的经扩增的经PD1选择和未经选择的TIL的CDR3vβ的库进行分析。将在经PD1选择的TIL产物中鉴定的独特CDR3vβ序列从最频繁到最不频繁进行排名。对每个配对产物中每个前10个经PD1选择的TIL克隆的频率进行绘制。配对的样品通过平直线连接。通过配对t测试计算的P值在其相应的图表上进行标注。

[0386] 图137:用于这些研究的肿瘤消化物的描述。

[0387] 图138:检测来自各种组织学的肿瘤消化物中的$PD1^+$细胞。图例:PD1在多种组织学中的表达。对于每种组织学内的单独样品,绘制$CD3^+$TIL群体中$PD1^+$TIL的百分比。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0388] 图139:用于这项研究的经PD1选择的和未经选择的TIL的描述。

[0389] 图140:在REP1而不是REP2期间经PD1选择的TIL中的扩增倍数降低。图例:通过两个11天REP扩增来自(A)黑素瘤、(B)NSCLC和(C)HNSCC的经PD1分选的和未经选择的。所有所测定的肿瘤的扩增倍数均示出于(D)中。使用REP1和REP2完成时的总细胞计数来计算TIL群体中的扩增倍数。绘制单独样品的结果,其中黑点表示经PD1选择的TIL并且灰色三角形表示未经选择的TIL。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。通过配对学生t测试评估统计显著性;*指定p值<0.05。

[0390] 图141:来自各种肿瘤样品的扩增结果。

[0391] 图142:用于这项研究的经PD1选择的和未经选择的TIL的描述。根据程序TMP-18-015,从4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC获得经PD1选择的和未经选择的TIL产物。简言之,使用DNA酶、透明质酸酶和胶原酶IV的混合物消化全肿瘤活检。将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD1进行染色,并且在FX500仪器(索尼,总部,纽约)上进行分选。使经PD1分选的细胞和未经选择的全肿瘤消化物经受两个11天快速扩增期(REP)以分别获得经PD1选择的TIL和

未经选择的TIL。

[0392] 图143:经PD1选择的TIL和未经选择的TIL响应于用活化珠粒的刺激而产生IFNγ和颗粒酶B。图例:评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的(A)IFNγ和(B)粒酶的分泌。绘制单独样品的结果,其中黑点表示未经刺激的条件并且灰色三角形表示经αCD3/αCD28/α41BB刺激的条件。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。通过配对学生t测试评估统计显著性;**指定p值<0.01。

[0393] 图144:经PD1选择的和未经选择的TIL响应于PMA/离子霉素刺激而动员CD107a。图例:通过流式细胞术评估来自4个黑素瘤、5个NSCLC和1个HNSCC的经PD1选择的和未经选择的TIL响应于PMA和离子霉素(BioLegend公司,加利福尼亚州)刺激的CD107a的细胞表面表达。绘制单独样品的结果,其中黑点表示未经刺激的条件并且灰色三角形表示经PMA/离子霉素刺激的条件。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0394] 图145:用于这项研究的经PD1选择的和未经选择的TIL的描述。

[0395] 图146:经PD1选择的和未经选择的TIL显示出体外自体肿瘤反应性。在经PD1选择的TIL和未经选择的TIL中评估肿瘤杀伤和反应性。示出了黑素瘤样品的(A)细胞指数和(B)肿瘤细胞杀伤(细胞溶解%)。通过ELISA评估来自2个NSCLC和3个黑素瘤的上清液的(C)IFNγ释放。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;**指定p值<0.01。

[0396] 图147:用于实例16的经PD1选择的和未经选择的TIL的描述。根据程序TMP-18-015,从4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC获得经PD1选择的和未经选择的TIL产物。简言之,使用DNA酶、透明质酸酶和胶原酶IV的混合物消化全肿瘤活检。将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD1进行染色,并且在FX500仪器(索尼,总部,纽约)上进行分选。使经PD1选择的和未经选择的TIL经受两个11天REP。

[0397] 图148:图1:比较经PD1选择的和未经选择的TIL中的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的水平。图例:使用流式细胞术评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的和未经选择的TIL的T细胞谱系(CD4和CD8)。结果表示为$CD3^+$细胞的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。

[0398] 图149:将经$PD1^-$选择的TIL的分化状态与未经选择的TIL的分化状态进行比较。图例:使用流式细胞术评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的CD27、CD28、CD56、CD57、和KLRG1的表达。结果表示为$CD3^+$细胞的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;*指定p值<0.05。

[0399] 图150:比较记忆T细胞亚群在经PD1选择的TIL和未经选择的TIL中的分配。图例:通过流式细胞术评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的记忆标志物CD45RA和CCR7的表达。如所指示,确定T细胞记忆亚群,并且将每个亚群的平均百分比绘制为对于经PD1选择的TIL呈黑色条以及对于未经选择的TIL呈灰色条。标准误差示出为垂直线。

[0400] 图151:将经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的活化状态进行比较。图例:评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的CD25、CD69、CD134和CD137的表达。将$CD3^+$ T细胞的平均百分比绘制为对于经PD1选择的TIL呈黑色条以及对

于未经选择的TIL呈灰色条。标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;*指定p值<0.05。

[0401] 图152:比较耗尽/抑制标志物在经PD1选择的TIL和未经选择的TIL中的表达。图例:通过流式细胞术评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的LAG3、PD1、TIM3和CD101的表达。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;***指示p值<0.001。

[0402] 图153:比较驻留记忆T细胞标志物在经PD1选择的和未经选择的TIL中的表达。通过流式细胞术评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的CD39、CD49a和CD103的表达。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;**指示p值<0.01。

[0403] 图154:用于PD1 TIL培养的全规模工艺的实施例。

[0404] 图155:小规模工艺概述:PD1-A是使用此方案中概述的纳武单抗染色程序的条件。PD1-B是使用抗PD1-PE(克隆号EH12.2H7)染色方法的条件。本体条件用作对照。

[0405] 图156:所有三个肿瘤分选后纯度(PD-1+%)均满足≥80%的标准(A.和B.)。相对于头颈肿瘤,观察到黑素瘤肿瘤的纯度略微更低,这很有可能是由于在分选时PD-1+细胞的表达较低。

[0406] 图157:检测来自各种组织学的肿瘤消化物中的PD-1^{+}细胞。PD-1在多种组织学中的表达。对于每种组织学内的单独样品,绘制CD3^{+}TIL群体中PD-1^{+}TIL的百分比。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0407] 图158A-158P:FACS数据图。

[0408] 图159:使用流式细胞术评估使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的PD-1+TIL的经PD-1选择的TIL的T细胞谱系(CD4和CD8)。结果表示为CD3+细胞的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。

[0409] 图160:通过流式细胞术评估来自使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定PD-1+TIL的1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC肿瘤样品的经PD-1选择的TIL的记忆标志物CD45RA和CCR7的表达。如所指示,确定T细胞记忆亚群(TN/TSCM),并且将每个亚群的平均百分比绘制为对于纳武单抗经PD-1选择的TIL呈黑色条以及对于EH12.2H7经PD-1选择的TIL呈灰色条。标准误差示出为垂直线。

[0410] 图161A:评估来自使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定PD-1^{+}TIL的1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的经PD-1分选的TIL在扩增前后的PD-1表达的表达。使用经PD-1分选的产物的分选后纯度来确定扩增前PD-1^{+}的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;**指示p值<0.01。

[0411] 图161B:评估来自使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定PD-1+TIL的1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的经PD-1选择的TIL的(A)IFNγ和(B)颗粒酶B的分泌。绘制单独样品的结果,其中黑点表示未经刺激的条件并且灰色三角形表示经αCD3/αCD28/α41BB刺激的条件。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0412] 图162:分选前纳武单抗和EH12.2H7染色的TIL中的PD-1水平。将全肿瘤消化物分开,并且用纳武单抗或EH12.2H7进行染色,并且通过流式细胞术进行评估。然后使用FX500细胞分选器(索尼,纽约)分选使用每种抗体鉴定的来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的

PD-1$^+$细胞。

[0413] 图163:分选后纳武单抗和EH12.2H7染色的TIL中的PD-1水平。

[0414] 图164:将全肿瘤消化物分开,并且用纳武单抗或EH12.2H7进行染色,并且通过流式细胞术进行评估。然后使用FX500细胞分选器(索尼,纽约)分选使用每种抗体鉴定的来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的PD-1$^+$细胞。

[0415] 图165:检测来自各种组织学的肿瘤消化物中的PD-1$^+$细胞。PD-1在多种组织学中的表达。对于每种组织学内的单独样品,绘制CD3+TIL群体中PD-1+TIL的百分比。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0416] 图166:在活化阶段而不是REP期间经PD-1选择的TIL中的扩增倍数降低。使用由11天活化步骤,随后是11天REP组成的两步过程扩增来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的经PD-1分选的TIL和全肿瘤消化物。示出了所有所测定的肿瘤的扩增倍数。使用活化步骤和REP步骤完成时的总细胞计数来计算TIL群体中的扩增倍数。绘制单独样品的结果,其中黑点表示经PD-1选择的TIL并且灰色三角形表示未经选择的TIL。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0417] 图167:在经PD-1选择的和未经选择的TIL中的CD4$^+$和CD8$^+$ T细胞的水平。使用流式细胞术评估来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的经PD-1选择的和未经选择的TIL的T细胞谱系(CD4和CD8)。结果表示为CD3$^+$细胞的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。

[0418] 图168:比较记忆T细胞亚群在经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL中的分配。通过流式细胞术评估来自4个黑素瘤、6个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL的记忆标志物CD45RA和CCR7的表达。如所指示,确定T细胞记忆亚群,并且将每个亚群的平均百分比绘制为对于经PD-1选择的TIL呈黑色条以及对于未经选择的TIL呈灰色条。标准误差示出为垂直线。

[0419] 图169:在扩增前后,在经PD-1$^+$分选的TIL和未经选择的TIL中的PD-1表达。评估来自3个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的经PD-1分选的TIL和全肿瘤消化物在扩增前后PD-1的表达。使用经PD1$^+$分选的产物的分选后纯度来确定扩增前PD-1$^+$TIL的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;***和****分别指示p值<0.001和<0.0001。

[0420] 图170:在未经选择的TIL中的前10个经PD-1选择的TCRvβ克隆的频率。图例:对来自2个HNSCC和5个NSCLC肿瘤样品的经扩增的经PD-1选择的和未经选择的TIL的CDR3vβ的库进行分析。将在经PD-1选择的TIL产物中鉴定的独特CDR3vβ序列从最频繁到最不频繁进行排名。绘制在每个配对产物中"前10个"(即,10个最频繁克隆)经PD-1选择的TIL克隆的频率。配对的样品通过平直线连接。通过配对t测试计算的P值在其相应的图表上进行标注。

[0421] 图171:经PD-1选择的TIL表明与匹配的未经选择的TIL相比优越的自体肿瘤反应性。响应于用自体肿瘤消化物温育18-24小时,通过ELISA测试从3个黑素瘤、2个NSCLC、1个PC和1个TNBC样品获得的经PD-1选择的和匹配的未经选择的TIL的IFNγ分泌。示出了每个单独样品在有和没有HLAI类阻断抗体的情况下测量的IFNγ浓度的差异。阳性值反映HLA特异性抗肿瘤应答,而无效或阴性值反映非特异性应答。

[0422] 图172:经PD-1选择的和未经选择的TIL证明自体肿瘤杀伤。使用xCELLigence实时

细胞分析系统在经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL中评估肿瘤杀伤和反应性。示出了黑素瘤样品的(A)细胞指数和(B)肿瘤细胞杀伤(细胞溶解%)。

[0423] 图172:纳武单抗和EH12.2H7染色的TIL中的PD-1水平。将全肿瘤消化物分开,并且用纳武单抗或EH12.2H7进行染色,并且通过流式细胞术进行评估。然后使用FX500细胞分选器(索尼,纽约)分选使用每种抗体鉴定的来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的PD-1^+细胞。

[0424] 图173:纳武单抗和EH12.2H7染色的经PD-1分选的TIL的最终产物产率。使用11天活化步骤,随后是11天REP扩增源自用来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的纳武单抗和EH12.2H7染色TIL的经PD-1分选的TIL。示出了所接种的$CD3^+$细胞的数量、扩增倍数和外推的/实际的细胞计数。由*指定的卵巢和黑素瘤肿瘤是小规模实验,并且由**指定的HNSCC以全规模进行的。

[0425] 图174:使用EH12.2H7和纳武单抗在经PD-1选择的TIL中表达CD4+和CD8+TIL。使用流式细胞术评估使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的PD-1^+TIL的经PD-1选择的TIL的T细胞谱系(CD4和CD8)。结果表示为$CD3^+$细胞的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。

[0426] 图175:EH12.2H7和纳武单抗分选的PD-1+TIL中的记忆群体。通过流式细胞术评估来自使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定PD-1^+TIL的1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC肿瘤样品的经PD-1选择的TIL的记忆标志物CD45RA和CCR7的表达。如所指示,确定T细胞记忆亚群,并且将每个亚群的平均百分比绘制为对于纳武单抗经PD-1选择的TIL呈黑色条以及对于EH12.2H7经PD-1选择的TIL呈灰色条。标准误差示出为垂直线。

[0427] 图176:扩增前后使用EH12.2H7和纳武单抗生成的经PD-1分选的TIL中PD-1表达的TIL表达。评估来自使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定PD-1^+TIL的1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的经PD-1分选的TIL在扩增前后的PD-1表达的表达。使用经PD-1分选的产物的分选后纯度来确定扩增前PD-1^+的百分比。平均值绘制为条形图,并且标准误差示出为垂直线。通过配对学生t测试评估统计显著性;**指示p值<0.01。

[0428] 图177:使用EH12.2H7和纳武单抗分选的PD-1^+TIL生成的经PD-1选择的TIL产生IFNγ并且颗粒酶B响应于非特异性刺激。评估来自使用纳武单抗或EH12.2H7分选以鉴定PD-1^+TIL的1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的经PD-1选择的TIL的(A)IFNγ和(B)颗粒酶B的分泌。绘制单独样品的结果,其中黑点表示未经刺激的条件并且灰色三角形表示经αCD3/αCD28/α41BB刺激的条件。水平线表示每个子集的平均百分比,并且垂直线表示标准误差。

[0429] 图178:PD-1+高Gen-2工艺的实施例的概述。

[0430] 图179:FACS绘图数据。

[0431] 序列表简要说明

[0432] SEQ ID NO:1是莫罗单抗(muromonab)的重链的氨基酸序列。

[0433] SEQ ID NO:2是莫罗单抗的轻链的氨基酸序列。

[0434] SEQ ID NO:3是重组人IL-2蛋白的氨基酸序列。

[0435] SEQ ID NO:4是阿地白介素(aldesleukin)的氨基酸序列。

[0436] SEQ ID NO:5是重组人IL-4蛋白的氨基酸序列。

[0437] SEQ ID NO:6是重组人IL-7蛋白的氨基酸序列。

[0438] SEQ ID NO:7是重组人IL-15蛋白的氨基酸序列。

[0439] SEQ ID NO:8是重组人IL-21蛋白的氨基酸序列。

[0440] SEQ ID NO:9是人4-1BB的氨基酸序列。

[0441] SEQ ID NO:10是鼠类4-1BB的氨基酸序列。

[0442] SEQ ID NO:11是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(utomilumab)(PF-05082566)的重链。

[0443] SEQ ID NO:12是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的轻链。

[0444] SEQ ID NO:13是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的重链可变区(VH)。

[0445] SEQ ID NO:14是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的轻链可变区(VL)。

[0446] SEQ ID NO:15是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的重链CDR1。

[0447] SEQ ID NO:16是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的重链CDR2。

[0448] SEQ ID NO:17是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的重链CDR3。

[0449] SEQ ID NO:18是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的轻链CDR1。

[0450] SEQ ID NO:19是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的轻链CDR2。

[0451] SEQ ID NO:20是4-1BB激动剂单克隆抗体乌托米卢单抗(PF-05082566)的轻链CDR3。

[0452] SEQ ID NO:21是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(urelumab)(BMS-663513)的重链。

[0453] SEQ ID NO:22是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链。

[0454] SEQ ID NO:23是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链可变区(VH)。

[0455] SEQ ID NO:24是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链可变区(VL)。

[0456] SEQ ID NO:25是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR1。

[0457] SEQ ID NO:26是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR2。

[0458] SEQ ID NO:27是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的重链CDR3。

[0459] SEQ ID NO:28是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR1。

[0460] SEQ ID NO:29是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR2。

[0461] SEQ ID NO:30是4-1BB激动剂单克隆抗体乌瑞鲁单抗(BMS-663513)的轻链CDR3。

[0462] SEQ ID NO:31是TNFRSF激动剂融合蛋白的Fc结构域。

[0463] SEQ ID NO:32是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0464] SEQ ID NO:33是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0465] SEQ ID NO:34是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0466] SEQ ID NO:35是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0467] SEQ ID NO:36是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0468] SEQ ID NO:37是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0469] SEQ ID NO:38是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0470] SEQ ID NO:39是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0471] SEQ ID NO:40是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0472] SEQ ID NO:41是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0473] SEQ ID NO:42是TNFRSF激动剂融合蛋白的Fc结构域。

[0474] SEQ ID NO:43是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0475] SEQ ID NO:44是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0476] SEQ ID NO:45是TNFRSF激动剂融合蛋白的连接子。

[0477] SEQ ID NO:46是4-1BB配体(4-1BBL)氨基酸序列。

[0478] SEQ ID NO:47是4-1BBL多肽的可溶性部分。

[0479] SEQ ID NO:48是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本1的重链可变区(VH)。

[0480] SEQ ID NO:49是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本1的轻链可变区(VL)。

[0481] SEQ ID NO:50是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本2的重链可变区(VH)。

[0482] SEQ ID NO:51是4-1BB激动剂抗体4B4-1-1版本2的轻链可变区(VL)。

[0483] SEQ ID NO:52是4-1BB激动剂抗体H39E3-2的重链可变区(VH)。

[0484] SEQ ID NO:53是4-1BB激动剂抗体H39E3-2的轻链可变区(VL)。

[0485] SEQ ID NO:54是人OX40的氨基酸序列。

[0486] SEQ ID NO:55是鼠类OX40的氨基酸序列。

[0487] SEQ ID NO:56是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)的重链。

[0488] SEQ ID NO:57是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的轻链。

[0489] SEQ ID NO:58是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的重链可变区(VH)。

[0490] SEQ ID NO:59是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的轻链可变区(VL)。

[0491] SEQ ID NO:60是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR1。

[0492] SEQ ID NO:61是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR2。

[0493] SEQ ID NO:62是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的重链CDR3。

[0494] SEQ ID NO:63是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR1。

[0495] SEQ ID NO:64是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR2。

[0496] SEQ ID NO:65是OX40激动剂单克隆抗体他伏利珠单抗(MEDI-0562)的轻链CDR3。

[0497] SEQ ID NO:66是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链。

[0498] SEQ ID NO:67是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链。

[0499] SEQ ID NO:68是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链可变区(VH)。

[0500] SEQ ID NO:69是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链可变区(VL)。

[0501] SEQ ID NO:70是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR1。

[0502] SEQ ID NO:71是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR2。

[0503] SEQ ID NO:72是OX40激动剂单克隆抗体11D4的重链CDR3。

[0504] SEQ ID NO:73是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR1。

[0505] SEQ ID NO:74是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR2。

[0506] SEQ ID NO:75是OX40激动剂单克隆抗体11D4的轻链CDR3。

[0507] SEQ ID NO:76是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链。

[0508] SEQ ID NO:77是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链。

[0509] SEQ ID NO:78是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链可变区(VH)。

[0510] SEQ ID NO:79是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链可变区(VL)。

[0511] SEQ ID NO:80是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR1。

[0512] SEQ ID NO:81是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR2。

[0513] SEQ ID NO:82是OX40激动剂单克隆抗体18D8的重链CDR3。

[0514] SEQ ID NO:83是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR1。

[0515] SEQ ID NO:84是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR2。

[0516] SEQ ID NO:85是OX40激动剂单克隆抗体18D8的轻链CDR3。

[0517] SEQ ID NO:86是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链可变区(VH)。

[0518] SEQ ID NO:87是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链可变区(VL)。

[0519] SEQ ID NO:88是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR1。

[0520] SEQ ID NO:89是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR2。

[0521] SEQ ID NO:90是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的重链CDR3。

[0522] SEQ ID NO:91是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR1。

[0523] SEQ ID NO:92是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR2。

[0524] SEQ ID NO:93是OX40激动剂单克隆抗体Hu119-122的轻链CDR3。

[0525] SEQ ID NO:94是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链可变区(VH)。

[0526] SEQ ID NO:95是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链可变区(VL)。

[0527] SEQ ID NO:96是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR1。

[0528] SEQ ID NO:97是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR2。

[0529] SEQ ID NO:98是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的重链CDR3。

[0530] SEQ ID NO:99是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR1。

[0531] SEQ ID NO:100是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR2。

[0532] SEQ ID NO:101是OX40激动剂单克隆抗体Hu106-222的轻链CDR3。

[0533] SEQ ID NO:102是OX40配体(OX40L)氨基酸序列。

[0534] SEQ ID NO:103是OX40L多肽的可溶性部分。

[0535] SEQ ID NO:104是OX40L多肽的替代性可溶部分。

[0536] SEQ ID NO:105是OX40激动剂单克隆抗体008的重链可变区(VH)。

[0537] SEQ ID NO:106是OX40激动剂单克隆抗体008的轻链可变区(VL)。

[0538] SEQ ID NO:107是OX40激动剂单克隆抗体011的重链可变区(VH)。

[0539] SEQ ID NO:108是OX40激动剂单克隆抗体011的轻链可变区(VL)。

[0540] SEQ ID NO:109是OX40激动剂单克隆抗体021的重链可变区(VH)。

[0541] SEQ ID NO:110是OX40激动剂单克隆抗体021的轻链可变区(VL)。

[0542] SEQ ID NO:111是OX40激动剂单克隆抗体023的重链可变区(VH)。

[0543] SEQ ID NO:112是OX40激动剂单克隆抗体023的轻链可变区(VL)。

[0544] SEQ ID NO:113是OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0545] SEQ ID NO:114是OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0546] SEQ ID NO:115是OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0547] SEQ ID NO:116是OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0548] SEQ ID NO:117是人源化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0549] SEQ ID NO:118是人源化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0550] SEQ ID NO:119是人源化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0551] SEQ ID NO:120是人源化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0552] SEQ ID NO:121是人源化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0553] SEQ ID NO:122是人源化OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0554] SEQ ID NO:123是人源化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0555] SEQ ID NO:124是人源化OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0556] SEQ ID NO:125是OX40激动剂单克隆抗体的重链可变区(VH)。

[0557] SEQ ID NO:126是OX40激动剂单克隆抗体的轻链可变区(VL)。

[0558] I.定义

[0559] 除非另外规定,否则本文中所使用的所有技术术语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相同的含义。本文提及的所有专利和出版物均通过引用整体并入。

[0560] 术语“体内”是指在受试者体内发生的事件。

[0561] 术语“体外”是指在受试者体外发生的事件。体外检定涵盖基于细胞的测定,其中采用存活或死亡的细胞;并且还可以涵盖无细胞测定,其中不采用完整的细胞。

[0562] 术语“离体”是指涉及在已经从受试者体内去除的细胞、组织和/或器官上治疗或执行程序的事件。适当地,细胞、组织和/或器官可以在外科手术或治疗方法中返回到受试者体内。

[0563] 术语“快速扩增”意指抗原特异性TIL的数量在一周的时间段内增加至少约3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍),更优选地在一周的时间段内增加至少约10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍)或者最优选地在一周的时间段内增加至少约100倍。下面概述许多快速扩增方案。

[0564] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”意指最初以白细胞形式获得的细胞群体,所述细胞已经离开受试者的血流并且迁移到肿瘤中。TIL包含但不限于$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1及Th17 $CD4^+$ T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包含初级和二级TIL两者。“初级TIL”是从如本文所概述的患者组织样品获得的那些TIL(有时称为“新鲜获得的”或“新鲜分离的”),并且“二级TIL”是如本文所讨论的已经扩增或增殖的任何TIL细胞群体,包含但不限于本体TIL和经扩增的TIL(“REP TIL”或“REP后TIL”)。TIL细胞群体可以包含经基因修饰的TIL。

[0565] 本文中“细胞群体”(包含TIL)意指共享共同特点的许多细胞。通常,群体的数量通常在1×10^{6}到1×10^{10}的范围内,其中不同的TIL群体包括不同的数量。例如,初级TIL在存在IL-2的情况下的初始生长会产生具有大致1×10^{8}个细胞的本体TIL群体。通常完成REP扩增以提供具有1.5×10^{9}到1.5×10^{10}个细胞的群体以供输注。

[0566] 本文中的“低温保存的TIL”意指在约-150℃到-60℃的范围内处理或存储的TIL(初级、本体或经扩增的(REP TIL))。用于低温保存的通用方法也在本文中的其它地方(包含在实例中)描述。为了清楚起见,“低温保存的TIL”可区别于可以用作初级TIL的来源的冷冻组织样品。

[0567] 本文中的“解冻的低温保存的TIL”意指先前被低温保存并且随后进行处理以恢复到室温或更高温度(包含但不限于细胞培养温度或其中可以向患者施用TIL的温度)的TIL群体。

[0568] TIL通常可以使用细胞表面标志物进行生物化学定义,或通过其浸渗肿瘤且实现治疗的能力进行功能定义。TIL通常可以通过表达以下生物标志物中的一个或多个来进行分类:CD4、CD8、TCRαβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外地且可替代地,TIL可以通过将其再引入到患者体内后浸润实体瘤的能力进行功能定义。

[0569] 术语“低温保存培养基(cryopreservation media/cryopreservation medium)”是指可以用于低温保存细胞的任何培养基。此类培养基可以包含7%到10%DMSO的培养基。示例性培养基包含CryoStor CS10、Hyperthermasol以及其组合。术语“CS10”是指获自干细胞技术有限公司(Stemcell Technologies)或生物生命解决方案公司(Biolife Solutions)的低温保存培养基。CS10培养基可以由商标名“CryoStor®CS10”指代。CS10培养基是包括DMSO的无血清无动物组分培养基。

[0570] 术语“中央记忆T细胞”是指人类中为CD45RO+且组成性表达CCR7(CCR7^{hi})和CD62L(CD62^{hi})的T细胞亚群。中央记忆T细胞的表面表型还包含TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中央记忆T细胞的转录因子包含BCL-6、BCL-6B、MBD2和BMI1。TCR触发之后,中央记忆T细胞主要分泌IL-2和CD40L作为效应分子。中央记忆T细胞主要存在于血液中的CD4区室中,并且在人体中按比例地富集于淋巴结和扁桃体中。

[0571] 术语“效应记忆T细胞”是指如中央记忆T细胞为CD45RO+,但已经失去CCR7的组成性表达(CCR7^{lo})并且对于CD62L表达而言为异质或较低(CD62L^{lo})的人类或哺乳动物T细胞的亚群。中央记忆T细胞的表面表型还包含TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中央记忆T细胞的转录因子包括BLIMP1。效应记忆T细胞在抗原刺激之后迅速地分泌高水平的发炎性细胞因子,包含干扰素γ、IL-4和IL-5。效应记忆T细胞主要存在于血液中的CD8区室中,并且在人体中按比例地富集于肺、肝脏和肠道中。CD8+效应记忆T细胞携带大量穿孔素。

[0572] 术语“密闭系统”是指对外部环境密闭的系统。本发明方法可以采用适合于细胞培养方法的任何密闭系统。密闭系统包含(例如)但不限于密闭的G容器。一旦将肿瘤区段添加到密闭系统中,所述系统就不会对外部环境开放直到准备向患者施用TIL。

[0573] 如本文中用于描述破坏肿瘤的工艺的术语“碎裂(fragmenting)”、“碎裂(fragment)”和“碎裂(fragmented)”包含机械碎裂方法,如压碎、切割、分裂和切碎肿瘤组织以及用于破坏肿瘤组织的物理结构的任何其它方法。

[0574] 术语“外周血单核细胞”和“PBMC”是指具有圆形细胞核的外周血细胞,包含淋巴细

胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞。当用作抗原呈递细胞(PBMC是一种类型的抗原呈递细胞)时,外周血单核细胞优选地是经辐照的同种异体的外周血单核细胞。

[0575] 术语“外周血淋巴细胞”和“PBL”是指从外周血扩增的T细胞。在一些实施例中,将PBL从来自供体的全血或单采术(apheresis)产物中分离。在一些实施例中,通过T细胞表型(例如,CD3+CD45+的T细胞表型)的阳性或阴性选择,将PBL从来自供体的全血或单采术产物中分离。

[0576] 术语“抗CD3抗体”是指针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的抗体或其变体,例如单克隆抗体,并且包含人类、人源化、嵌合或鼠类抗体。抗CD3抗体包含OKT-3,也称为莫罗单抗。抗CD3抗体还包含UHCT1克隆,也称为T3和CD3ε。其它抗CD3抗体包含例如,奥昔珠单抗(otelixizumab)、替利珠单抗(teplizumab)和维西珠单抗(visilizumab)。

[0577] 术语“OKT-3”(本文中也称为“OKT3”)是指针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的单克隆抗体或其生物类似物或变体,包含人类、人源化、嵌合或鼠类抗体,并且包含可商购获得的形式,如OKT-3(30ng/mL,纯MACS GMP CD3,美国加利福尼亚州圣地亚哥的美天旎生物技术有限公司(Miltenyi Biotech,Inc.,San Diego,CA,USA))和莫罗单抗或其变体、保守氨基酸取代、糖型或生物类似物。表1中给出了莫罗单抗的重链和轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:1and SEQ ID NO:2)。能够产生OKT-3的杂交瘤是由美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)保藏,并且指定ATCC登录号CRL 8001。能够产生OKT-3的杂交瘤也由欧洲认证的细胞培养物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures;ECACC)保藏,并且指定目录号86022706。

[0578] 表1:莫罗单抗的氨基酸序列。

[0579]

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

[0580] 术语“IL-2”(本文中也称为“IL2”)是指称为白介素-2的T细胞生长因子,并且包含所有形式的IL-2,包含其人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物和变体。IL-2描述于例如Nelson,《免疫学杂志(J.Immunol.)》2004,172,3983-88和Malek,《免疫学年鉴(Annu.Rev.Immunol.)》2008,26,453-79中,所述文献的公开内容通过引用并入本文。表2中给出了适用于本发明的重组人IL-2的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。例如,术语IL-2涵盖人重组形式的IL-2,如阿地白介素(PROLEUKIN,可从多个供应商购获得,每个一次性使用小瓶有2200万IU),以及由美国新罕布夏州朴茨茅斯小镇的CellGenix公司(CellGenix,Inc.,Portsmouth,NH,USA)(CELLGRO GMP)或美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.,East Brunswick,NJ,USA)(目录号CYT-209-b)市售的重组IL-2形式和来自其它供应商的其它商业等效物。阿地白介素(去-丙氨酰基-1、丝氨酸-125人IL-2)是分子量为大致15kDa的非糖基化人重组形式的IL-2。表2中

给出了适合用于本发明的阿地白介素的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。术语IL-2还涵盖如本文所述的聚乙二醇化形式的IL-2,包含聚乙二醇化IL2前药NKTR-214,购自美国加利福尼亚州南旧金山的内克塔治疗公司(Nektar Therapeutics,South San Francisco,CA,USA)。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第US 2014/0328791 A1号和国际专利申请公开第WO 2012/065086 A1号中,所述专利申请的公开内容通过引用并入本文。适用于本发明的替代形式的缀合IL-2描述于美国专利第4,766,106号、第5,206,344号、第5,089,261号和第4902,502号中,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。适用于本发明的IL-2调配物描述于美国专利第6,706,289号中,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[0581] 表2:白介素的氨基酸序列。

[0582]

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

[0583] 术语“IL-4”(本文中也称为“IL4”)是指称为白介素4的细胞因子,其由Th2 T细胞且由嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生。IL-4调节原初辅助T细胞(Th0细胞)分化成Th2 T细胞。Steinke和Borish,《呼吸研究(Respir.Res.)》2001,2,66-70。通过IL-4活化后,Th2 T细胞随后在正反馈回路中产生另外的IL-4。IL-4还刺激B细胞增殖和II类MHC表达,并且诱导类转换成B细胞的IgE和IgG_1表达。适用于本发明的重组人IL-4可从多个供应商商购获得,包含美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-211)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科技有限公司(ThermoFisher Scientific,Inc.,Waltham,MA,USA)(人IL-15重组蛋白,目录号Gibco CTP0043)。表2中给出了适用于本发明的重组人IL-4的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0584] 术语“IL-7”(本文中也称为“IL7”)是指称为白介素7的糖基化组织源性细胞因子,其可以从基质和上皮细胞,以及树突状细胞获得。Fry和Mackall,《血液(Blood)》2002,99,3892-904。IL-7可以刺激T细胞的发育。IL-7与IL-7受体结合(一种由IL-7受体α和共同γ链受体组成的杂二聚体,其在一系列对于T细胞在胸腺内的发育和在外周内的存活而言至关重要的信号中)。适用于本发明的重组人IL-7可从多个供应商商购获得,包含美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-254)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科学有限公司(人IL-15重组蛋白,目录号Gibco PHC0071)。表2中给出了适用于本发明的重组人IL-7的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。

[0585] 术语“IL-15”(本文中也称为“IL15”)是指称为白介素-15的T细胞生长因子,并且

包含所有形式的IL-2,包含其人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物和变体。IL-15描述于例如Fehniger和Caligiuri,《血液》2001,97,14-32中,所述文献的公开内容通过引用并入本文。IL-15与IL-2共享β及γ信号传导受体亚基。重组人IL-15是分子量为12.8kDa的含有114个氨基酸(和N端甲硫氨酸)的非糖基化多肽链。重组人IL-15可从多个供应商商购获得,包含美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-230-b)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科学有限公司(人IL-15重组蛋白,目录号34-8159-82)。表2中给出了适用于本发明的重组人IL-15的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0586] 术语“IL-21”(本文中也称为“IL21”)是指称为白介素-21的多效性细胞因子蛋白质,并且包含所有形式的IL-21,包含其人类及哺乳动物形式、保守氨基酸取代、糖型、生物类似物和变体。IL-21描述于例如Spolski和Leonard,《自然评论-药物研发(Nat.Rev.Drug.Disc.)》,2014,13,379-95中,所述文献的公开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是分子量为15.4kDa的含有132个氨基酸的非糖基化多肽链。重组人IL-21可从多个供应商商购获得,包含美国新泽西州东布朗斯维克的ProSpec-Tany TechnoGene有限公司(目录号CYT-408-b)和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的赛默飞世尔科学有限公司(人IL-21重组蛋白,目录号14-8219-80)。表2中给出了适用于本发明的重组人IL-21的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。

[0587] 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以由医师考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度方面的个体差异以及患者(受试者)的病状来确定。通常可以规定,包括本文所述的肿瘤浸润淋巴细胞(例如,二级TIL或经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞)的药物组合物可以以10^4到10^{11}个细胞/千克体重的剂量(例如,10^5到10^6、10^5到10^{10}、10^5到10^{11}、10^6到10^{10}、10^6到10^{11}、10^7到10^{11}、10^7到10^{10}、10^8到10^{11}、10^8到10^{10}、10^9到10^{11}或10^9到10^{10}个细胞/千克体重)(包含这些范围内的所有整数值)施用。肿瘤浸润淋巴细胞(在一些情况下包含经基因修饰的细胞毒性淋巴细胞)组合物也可以以这些剂量多次施用。肿瘤浸润淋巴细胞(在一些情况下包含基因地)可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用(参见例如,Rosenberg等人,《新英格兰医学期刊(New Eng.J.of Med.)》319:1676,1988)。特定患者的最佳剂量和治疗方案可以由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗容易地确定。

[0588] 术语“恶性血液病(hematological malignancy)”、“恶性血液病(hematologic malignancy)”或相关含义的术语是指造血和淋巴组织的哺乳动物癌症和肿瘤,包含但不限于血液、骨髓、淋巴结和淋巴系统的组织。恶性血液病也称为“液体肿瘤”。恶性血液病包含但不限于急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性单核细胞性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin’s lymphoma)和非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin’s lymphomas)。术语“B细胞恶性血液病”是指影响B细胞的恶性血液病。

[0589] 术语“实体瘤”是指通常不含有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”是指恶性、赘生性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包含但不限于肉瘤、癌和淋巴瘤,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含相互依赖的组织区室,包含薄壁组织(癌细胞)和其中分散有癌细胞且可以提供支持微环

境的支持基质细胞。

[0590] 术语“液体肿瘤”是指本质上为流体的异常细胞块。液体肿瘤癌症包含但不限于白血病、骨髓瘤和淋巴瘤，以及其它恶性血液病。获自液体肿瘤的TIL在本文中还可以称为骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。获自液体肿瘤(包含在外周血中循环的液体肿瘤)的TIL在本文中还可以称为PBL。术语MIL、TIL和PBL在本文中可互换地使用，并且仅基于细胞所源自的组织类型而不同。

[0591] 如本文所使用的术语“微环境”可以指代整体上的实体或血液肿瘤微环境或指代所述微环境内的个别细胞亚群。如本文所使用的肿瘤微环境是指“促进赘生性转变、支持肿瘤生长和侵袭、避免肿瘤宿主免疫、促进治疗抗性并且提供显性癌转移到成长的生态位的细胞、可溶性因子、信号传导分子、胞外基质和机械诱因”的复杂混合物，如Swartz等人，《癌症研究(Cancer Res.)》2012,72,2473中所描述。尽管肿瘤表达应由T细胞识别的抗原，但由于微环境的免疫抑制作用，通过免疫系统清除肿瘤很罕见。

[0592] 在实施例中，本发明包含用TIL群体治疗癌症的方法，其中在输注根据本发明的TIL之前，用非清髓性化学疗法对患者进行预治疗。在一些实施例中，可以提供TIL群体，其中在输注根据本发明的TIL之前，用非清髓性化学疗法对患者进行预治疗。在实施例中，非清髓性化学疗法是环磷酰胺60mg/kg/d持续2天(在TIL输注之前的第27天和第26天)和氟达拉宾25mg/m2/d持续5天(TIL输注之前的第27天到第23天)。在实施例中，在非清髓性化学疗法和根据本发明的TIL输注(第0天)之后，患者每8小时静脉内接受720,000IU/kg IL-2的静脉内输注达至生理耐受。

[0593] 实验结果表明，在过继性转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前，淋巴细胞耗减通过消除调节T细胞和免疫系统的竞争要素(“细胞因子库(cytokine sink)”)在增强治功效果中发挥关键作用。因此，在引入本发明的rTIL之前，本发明的一些实施例对患者使用淋巴细胞耗减步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

[0594] 如本文所使用的术语“共施用(co-administration)”、“共施用(co-administering)”、“与……组合施用(administered in combination with)”、“与……组合施用(administering in combination with)”、“同时(simultaneous)”和“同时(concurrent)”涵盖向受试者施用两种或更多种活性药物成分(在本发明的优选实施例中，例如至少一种钾通道激动剂与多个TIL组合)，使得两种活性药物成分和/或其代谢物同时存在于受试者体内。共同施用包含以独立组合物形式同时施用、以独立组合物形式在不同时间施用或以存在两种或更多种活性药物成分的组合物形式施用。以独立组合物形式同时施用和以存在两种药剂的组合物形式施用是优选的。

[0595] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指如本文所述的足以实现预期应用(包含但不限于疾病治疗)的化合物或化合物组合的量。治疗有效量可以根据预期应用(体外或体内)或待治疗的受试者和疾病病状(例如，受试者的体重、年龄和性别)、疾病病状的严重性或施用方式而发生变化。所述术语还适用于将在靶细胞中诱导特定应答(例如，血小板粘附和/或细胞迁移减少)的剂量。具体剂量将根据所选择的特定化合物、所遵循的给药方案、所述化合物是否与其它化合物组合施用、施用定时、施用化合物的组织和化合物被承载的物理递送系统而发生变化。

[0596] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等是指获得期望药

理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病或其症状而言，所述效果可以是预防性的，和/或就部分或完全治愈疾病和/或可归因于疾病的副作用而言可以是治疗性的。如本文所使用的，“治疗”涵盖哺乳动物，特别是人类的疾病的任何治疗，并且包含：(a)预防疾病在可能易患疾病但尚未诊断患有所述疾病的受试者中发生；(b)抑制疾病，即，遏止其发展或进展；和(c)减轻疾病，即，引起疾病消退和/或减轻一种或多种疾病症状。“治疗”还意图涵盖递送甚至在不存在疾病或病状的情况下以提供药理学效果的药剂。例如，“治疗”涵盖在不存在疾病病状的情况下(例如，在疫苗的情况下)可以引发免疫应答或赋予免疫性的组合物的递送。

[0597] 当关于核酸或蛋白质的部分使用时，术语“异源的”指示所述核酸或蛋白质包括在自然界中未发现彼此处于相同关系的两个或更多个子序列。例如，核酸通常是重组地产生的，具有来自不相关基因的布置成产生新的功能性核酸的两个或更多个序列，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来自不同来源的编码区。类似地，异源蛋白质指示蛋白质包括在自然界中未发现彼此处于相同关系的两个或更多个子序列(例如，融合蛋白)。

[0598] 在两个或更多个核酸或多肽的上下文中，术语“序列同一性”、“百分比同一性”和“序列百分比同一性”(或其同义词，例如“99％相同”)是指当针对最大对应性进行比较和比对(如果必要，引入空位)时，两个或更多个序列或子序列为相同的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。百分比同一性可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查测量。所属领域中已知可以用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对的各种算法和软件。确定序列百分比同一性的合适程序包含例如可从美国政府的国家生物技术信息中心BLAST网站(U.S.Government’s National Center for Biotechnology Information BLAST web site)获得的BLAST程序套件。两个序列之间的比较可以使用BLASTN或BLASTP算法来进行。BLASTN用于比较核酸序列，而BLASTP用于比较氨基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(基因泰克公司(Genentech)，南旧金山，加利福尼亚州)或可从DNASTAR获得的MegAlign是可以用于比对序列的其它可公开获得的软件程序。本领域的技术人员可以通过特定比对软件来确定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。

[0599] 如本文所使用，术语“变体”涵盖但不限于包括借助于在参考抗体的氨基酸序列内或邻近的某些位置的一个或多个取代、缺失和/或添加而与参考抗体的氨基酸序列不同的氨基酸序列的抗体或融合蛋白。与参考抗体的氨基酸序列相比，变体在其氨基酸序列中可以包括一个或多个保守取代。保守取代可以涉及例如类似带电或不带电氨基酸的取代。变体保留与参考抗体的抗原特异性结合的能力。术语变体还包含聚乙二醇化抗体或蛋白质。

[0600] 本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”意指最初以白细胞形式获得的细胞群体，所述细胞已经离开受试者的血流并且迁移到肿瘤中。TIL包含但不限于$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1及Th17 $CD4^+$ T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和M1巨噬细胞。TIL包含初级和二级TIL两者。“初级TIL”是从如本文所概述的患者组织样品获得的那些TIL(有时称为“新鲜获得的”或“新鲜分离的”)，并且“二级TIL”是如本文所讨论的已经扩增或增殖的任何TIL细胞群体，包含但不限于如本文所讨论的本体TIL、经扩增的TIL(“REP TIL”)以及“reREP TIL”。reREP TIL可以包含例如第二扩增TIL或第二另外扩增TIL(例如，在图27的步

骤D中描述的那些,包含称为reREP TIL的TIL)。

[0601] TIL通常可以使用细胞表面标志物进行生物化学定义,或通过其浸渗肿瘤且实现治疗的能力进行功能定义。TIL通常可以通过表达以下生物标志物中的一个或多个来进行分类:CD4、CD8、TCRαβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外地且可替代地,TIL可以通过将其再引入到患者体内后浸润实体瘤的能力进行功能定义。TIL可以进一步由效力表征—例如,如果例如干扰素(IFN)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可以被认为是有效的。

[0602] 术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”旨在包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂以及惰性成分。此类药学上可接受的载体或药学上可接受的赋形剂用于活性药物成分的用途是本领域熟知的。除了任何常规的药学上可接受的载体或药学上可接受的赋形剂与活性药物成分不相容的情况之外,设想了其在本发明的治疗组合物中的用途。另外的活性医药成分(如其它药物)也可以并入到所描述的组合物和方法中。

[0603] 术语“约”和“大约”意指在值的统计学上有意义的范围内。这类范围可以在一定数量级内,优选地在给定值或范围的50%内,更优选地在20%内,更优选地在10%内,并且甚至更优选地在5%内。术语“约”或“大约”涵盖的可允许的变型取决于研究下的特定系统,并且本领域的普通技术人员可以容易地理解。此外,如本文所使用,术语“约”和“大约”意指尺寸、大小、调配物、参数、形状和其它量和特性不是且不必需是精确的,但可以是近似的和/或更大或更小,视需要反映容差、转换因子、四舍五入、测量结果误差等,以及本领域的技术人员已知的其它因子。通常,尺寸、大小、调配物、参数、形状或其它量或特性为“约”或“大约”的,无论是否明确调配物陈述。应注意,非常不同的大小、形状和尺寸的实施例可以采用所描述的布置。

[0604] 过渡术语“包括(comprising)”、“基本上由……组成(consisting essentially of)”和“由……组成(consisting of)”以原始及修改的形式用于所附权利要求书时,其定义了相对于哪些未列出的另外的权利要求要素或步骤(如果存在的话)排除在一项或多项权利要求的范围之外的权利要求范围。术语“包括”旨在包含端点或为开放式的并且不排除任何另外的未列出的要素、方法、步骤或材料。术语“由……组成”排除权利要求书中指定的那些之外的任何要素、步骤或材料,并且在后一种情况下,排除与一种或多种指定材料普通相关的杂质。术语“基本上由……组成”将权利要求书的范围限制于一种或多种指定要素、步骤或材料和实质上不影响所要求保护的发明的一个或多个基本和新颖特性的要素、步骤或材料。在替代性实施例中,本文所述的体现本发明的所有组合物、方法和试剂盒可以由任何过渡术语“包括(comprising)”、“基本上由……组成(consisting essentially of)”和“由……组成(consisting of)”更具体地定义。

[0605] 术语“PD-1高”或“PD-1高”或“PD-1^{高}”是指相对于来自健康受试者的对照细胞,细胞(如但不限于肿瘤浸润淋巴细胞或T细胞)的高水平的PD-1蛋白表达。在一些实施例中,使用本领域的技术人员已知的用于测量细胞上存在的蛋白水平的标准方法(如流式细胞术、荧光活化细胞分选术(FACS)、免疫细胞化学等)来确定PD-1表达水平。在一些情况下,与来自健康受试者的免疫细胞相比,PD-1高TIL表达更高水平的PD-1。在一些情况下,与来自健康受试者或一组健康受试者的免疫细胞群体(例如,外周血单核细胞)相比,PD-1高TIL群体

表达更高水平的PD-1。PD-1高细胞可以被称为PD-1亮细胞。

[0606] 术语“PD-1中间体”或“PD-1中间体”或“PD-1中间体”是指相对于来自健康受试者的对照细胞，由细胞(如但不限于肿瘤浸润淋巴细胞或T细胞)进行的PD-1蛋白表达的中间或中等水平。例如，PD-1中间体T细胞以与由来自健康受试者的对照细胞(例如，外周血单核细胞)表达的PD-1蛋白的最高范围类似或基本上等效的水平或范围表达PD-1蛋白。换句话说，PD-1中间体TIL的PD-1表达水平与来自健康受试者的对照免疫细胞的PD-1表达的背景水平类似或基本上等效。PD-1中间体细胞可以被称为PD-1暗细胞。本领域的技术人员认识到PD-1阳性TIL可以是PD-1高TIL或PD-1中间体TIL。

[0607] 术语“PD-1阴性”或“PD-1阴性”或“PD-$1^{阴性}$”是指相对于来自健康受试者的对照细胞，由细胞(如但不限于肿瘤浸润淋巴细胞或T细胞)进行的阴性或低水平的PD-1蛋白表达。例如，PD-1阴性T细胞不表达PD-1蛋白。在一些情况下，PD-1阴性T细胞以与由来自健康受试者的对照细胞(例如，外周血单核细胞)表达的PD-1蛋白的最低水平类似或基本上等效的水平表达PD-1蛋白。PD-1阴性淋巴细胞可以以与对照群体中的大多数淋巴细胞相同的水平或范围表达PD-1。

[0608] PD-1高、PD-1中间体和PD-1阴性TIL是不同的并且根据本文所述的方法离体扩增的TIL的不同子集。在一些实施例中，离体扩增的TIL群体包括PD-1高TIL、PD-1中间体TIL和PD-1阴性TIL。

[0609] II.TIL制造工艺(GEN3工艺的实施例，任选地包含确定成分培养基)

[0610] 在不受任何特定理论限制的情况下，据信如本发明的方法中所描述的引发T细胞活化的引发第一扩增，接着促进T细胞活化的快速第二扩增，允许制备保留“较年轻”表型的经扩增的T细胞，并且如此相比于通过其它方法扩增的T细胞，预期本发明的经扩增T细胞对癌细胞表现出更大的细胞毒性。具体地，据信如通过本发明的方法教导的通过暴露于抗CD3抗体(例如，OKT-3)、IL-2和任选的抗原呈递细胞(APC)引发且接着通过随后暴露于另外的抗CD-3抗体(例如，OKT-3)、IL-2和APC促进的T细胞活化限制或避免了培养中的T细胞成熟，从而产生具有较不成熟表型的T细胞群体，所述T细胞因在培养中扩增而耗尽较少并且对癌细胞表现出更大的细胞毒性。在一些实施例中，将快速第二扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现规模扩大的培养物：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养T细胞来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将小规模培养物中的T细胞转移到比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器，并且将来自小规模培养的T细胞在第二容器中的较大规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在一些实施例中，将快速扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养T细胞来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自第一小规模培养的T细胞转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小与第一容器相等的第二容器中或之中，其中在每个第二容器中，将T细胞的从第一小规模培养转移到这个第二容器的部分在第二小规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在一些实施例中，将快速扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养T细胞来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小

规模培养的T细胞转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19或20个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中,其中在每个第二容器中,将T细胞的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养T细胞来进行快速第二扩增,持续约4天的时间段,以及然后(b)实现将来自小规模培养的T细胞转移并分配到至少2个、3个或4个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中,其中在每个第二容器中,将T细胞的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约5天的时间段。

[0611] 在一些实施例中,在由引发第一扩增实现的T细胞活化开始减少、减弱、衰退或消退之后进行快速第二扩增。

[0612] 在由引发第一扩增实现的T细胞的活化已经减少为或约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％之后进行快速第二扩增。

[0613] 在一些实施例中,在由引发第一扩增实现的T细胞的活化已经减少为或约为1％到100％的范围内的百分比之后进行快速第二扩增。

[0614] 在一些实施例中,在由引发第一扩增实现的T细胞的活化已经减少为或约为1％到10％、10％到20％、20％到30％、30％到40％、40％到50％、50％到60％、60％到70％、70％到80％、80％到90％或90％到100％的范围内的百分比之后进行快速第二扩增。

[0615] 在由引发第一扩增实现的T细胞的活化已经减少至少为或约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99％之后进行快速第二扩增。

[0616] 在由引发第一扩增实现的T细胞的活化已经减少至多为或约为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％之后进行快速第二扩增。

[0617] 在一些实施例中,由引发第一扩增实现的T细胞活化的降低是通过T细胞响应于用抗原刺激而释放的干扰素γ的量的减少确定。

[0618] 在一些实施例中,在至多为或约为7天或约为8天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增。

[0619] 在一些实施例中,在至多为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增。

[0620] 在一些实施例中,在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天的时间段期间进行T细

胞的引发第一扩增。

[0621] 在一些实施例中，在至多为或约为11天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0622] 在一些实施例中，在至多为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0623] 在一些实施例中，在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0624] 在一些实施例中，在为或约为1天到为或约为7天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增，并且在为或约为1天到为或约为11天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0625] 在一些实施例中，在至多为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增，并且在至多为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0626] 在一些实施例中，在为或约1天到为或约为8天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增，并且在为或约1天到为或约为9天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0627] 在一些实施例中，在8天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增，并且在9天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0628] 在一些实施例中，在为或约为1天到为或约为7天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增，并且在为或约为1天到为或约为9天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0629] 在一些实施例中，在7天的时间段期间进行T细胞的引发第一扩增，并且在9天的时间段期间进行T细胞的快速第二扩增。

[0630] 在一些实施例中，T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[0631] 在一些实施例中，T细胞是骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[0632] 在一些实施例中，T细胞是外周血淋巴细胞(PBL)。

[0633] 在一些实施例中，T细胞获自患有癌症的供体。

[0634] 在一些实施例中，T细胞是获自从患有癌症的患者切除的肿瘤的TIL。

[0635] 在一些实施例中，T细胞是获自患有恶性血液病的患者的骨髓的MIL。

[0636] 在一些实施例中，T细胞是获自供体的外周血单核细胞(PBMC)的PBL。在一些实施例中，供体患有癌症。在一些实施例中，供体患有恶性血液病。

[0637] 在本公开的某些方面，免疫效应细胞(例如，T细胞)可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术(如FICOLL分离)从受试者收集的血液单元获得。在一个优选的方面，来自个体的循环血液的细胞是通过单采术获得的。单采术产物通常含有淋巴细胞，包含T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。一方面，可以洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆级分，并且任选地，将细胞放置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。在一个实施例中，细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在替代性实施例中，洗涤溶液缺乏钙，并且可能缺乏镁，或者可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。一方面，通过裂解红细胞并耗尽单核细胞，例如通过PERCOLL梯度离心或通过逆流离心淘析，从外周血淋巴细胞分离T细胞。

[0638] 在一些实施例中，T细胞是从全血中分离的PBL或从供体中富集淋巴细胞的单采术产物。在一些实施例中，供体患有癌症。在一些实施例中，供体患有癌症。在一些实施例中，所述癌症是选自由以下组成的组的癌症：黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、

肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中,所述癌症选自由以下组成的组:黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中,供体患有肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是液体肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是实体瘤。在一些实施例中,供体患有恶性血液病。

[0639] 在本公开的某些方面,免疫效应细胞(例如,T细胞)可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术(如FICOLL分离)从受试者收集的血液单元获得。在一个优选的方面,来自个体的循环血液的细胞是通过单采术获得的。单采术产物通常含有淋巴细胞,包含T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核白细胞、红细胞和血小板。一方面,可以洗涤通过单采术收集的细胞以去除血浆级分,并且任选地,将细胞放置于适当的缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。在一个实施例中,细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在替代性实施例中,洗涤溶液缺乏钙,并且可能缺乏镁,或者可能缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。一方面,通过裂解红细胞并耗尽单核细胞,例如通过PERCOLL梯度离心或通过逆流离心淘析,从外周血淋巴细胞分离T细胞。

[0640] 在一些实施例中,T细胞是从全血中分离的PBL或从供体中富集淋巴细胞的单采术产物。在一些实施例中,供体患有癌症。在一些实施例中,所述癌症是选自由以下组成的组的癌症:黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中,所述癌症选自由以下组成的组:黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中,供体患有肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是液体肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是实体瘤。在一些实施例中,供体患有恶性血液病。在一些实施例中,通过使用阳性或阴性选择方法,即使用针对T细胞表型的一种或多种标志物(例如,CD3+CD45+)去除PBL,或去除非T细胞表型细胞,留下PBL,从富集淋巴细胞的全血或单采术产物中分离PBL。在其它实施例中,通过梯度离心分离PBL。在从供体组织分离PBL后,可以通过在根据本文所述的任何方法的引发第一扩增步骤,在引发第一扩增培养中接种合适数量的分离PBL(在一些实施例中,大约1×10^7个PBL)来启动PBL的引发第一扩增。

[0641] 图1(具体地,例如,图1B)中描绘了含有这些特征中的一些特征的被称为工艺3(在本文中也称为GEN3)的示例性TIL工艺,并且图1、2、30和31(具体地,例如,图1B)中描述了本发明的这一实施例相对于工艺2A的一些优点。在图1和30(具体地,例如,图1B)中示出了工艺3的两个实施例。工艺2A或Gen 2还描述于美国专利公开第2018/0280436号中,所述美国专利通过引用整体并入本文。Gen 3工艺还描述于2018年11月5日提交的USSN 62/755,954(116983-5045-PR)中。

[0642] 如本文所讨论和通常概述的,TIL取自患者样品且操控以在移植到患者中之前使用本文所述且称为Gen 3的TIL扩增工艺扩增其数量。在一些实施例中,如下文所讨论,可以任选地对TIL进行基因操控。在一些实施例中,可以在扩增之前或之后将TIL低温保存。解冻后,在输注到患者体内之前还可以对其进行再刺激以增加其代谢。

[0643] 在一些实施例中，将引发第一扩增(包含本文中称为预快速扩增(REP前)的工艺，以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤B的工艺)缩短为1到8天，并且将快速第二扩增(包含本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤D的工艺)缩短为1到9天，如下文以及在实例和附图中详细地讨论的。在一些实施例中，将引发第一扩增(包含本文中称为预快速扩增(REP前)的工艺，以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤B的工艺)缩短为1到8天，并且将快速第二扩增(包含本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤D的工艺)缩短为1到8天，如下文以及在实例和附图中详细地讨论的。在一些实施例中，将引发第一扩增(包含本文中称为预快速扩增(REP前)的工艺，以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤B的工艺)缩短为1到7天，并且将快速第二扩增(包含本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤D的工艺)缩短为1到9天，如下文以及在实例和附图中详细地讨论的。在一些实施例中，引发第一扩增(包含本文中称为预快速扩增(REP前)的工艺，以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤B的工艺)为1到7天，并且快速第二扩增(包含本文中称为快速扩增方案(REP)的工艺以及图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中示出为步骤D的工艺)为1到10天，如下文以及在实例和附图中详细地讨论的。在一些实施例中，将引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)缩短为8天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为7到9天。在一些实施例中，引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)为8天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为8到9天。在一些实施例中，将引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)缩短为7天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为7到8天。在一些实施例中，将引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)缩短为8天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为8天。在一些实施例中，引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)为8天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为9天。在一些实施例中，引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)为8天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为10天。在一些实施例中，引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)为7天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为7到10天。在一些实施例中，引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)为7天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为8到10天。在一些实施例中，引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)为7天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为9到10天。在一些实施例中，将引发第一扩增(例如，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B的扩增)缩短为7天，并且快速第二扩增(例如，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中的步骤D中描述的扩增)为7到9天。在一些实施例中，引发第一扩增和快速第二扩增(例如，在图1(具体

地，例如图1B和/或图1C)中描述为步骤B和步骤D的扩增)的组合为14-16天，如下文以及在实例和附图中详细地讨论的。具体地，认为本发明的某些实施例包括引发第一扩增步骤，其中通过在存在IL-2的情况下暴露于抗CD3抗体(例如，OKT-3)或在存在至少IL-2和抗CD3抗体(例如，OKT-3)的情况下暴露于抗原来活化TIL。在某些实施例中，在如上文所述的引发第一扩增步骤中活化的TIL是第一TIL群体，即其为初级细胞群体。

[0644] 下文“步骤”名称A、B、C等参考图1中的非限制性实例(具体地，例如，图1B和/或图1C)并且参考本文所述的某些非限制性实施例。下文和图1中的步骤(具体地，例如，图1B和/或图1C)的顺序是示例性的，并且本申请和本文公开的方法考虑了步骤的任何组合或顺序以及另外的步骤、重复步骤和/或省略步骤。

[0645] A.步骤A：获得患者肿瘤样品

[0646] 通常，TIL最初从患者肿瘤样品(“原发性TIL”)或从循环淋巴细胞(如外周血淋巴细胞，包含具有TIL样特性的外周血淋巴细胞)获得，并且然后将其扩增成更大群体用于如本文所述的进一步操控、任选地低温保存并且任选地评估表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

[0647] 可以使用本领域已知的方法，通常通过手术切除、穿刺活检或其它用于获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的方式来获得患者肿瘤样品。通常，肿瘤样品可以来自任何实体瘤，包含原发性肿瘤、浸润性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品还可以是液体肿瘤，如获自恶性血液病的肿瘤。实体肿瘤可以是任何癌症类型，包含但不限于乳腺癌、胰脏癌、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、基底细胞癌和黑素瘤)。在一些实施例中，癌症选自宫颈癌、头颈癌(包含例如头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(GBM)、胃肠癌、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。在一些实施例中，有用的TIL获自恶性黑素瘤肿瘤，因为据报道这些恶性黑素瘤肿瘤具有特别高水平的TIL。

[0648] 一旦获得，一般使用锐器切分将肿瘤样品碎裂成1到约8mm^{3}的小片，其中约2-3mm^{3}是特别有用的。使用酶促肿瘤消化从这些碎片培养TIL。这类肿瘤消化物可以通过在酶促介质(例如，罗斯威尔帕克纪念研究所(RPMI)1640缓冲液、2mM谷氨酸、10mcg/mL庆大霉素、30单位/毫升的DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中温育，接着进行机械解离(例如，使用组织解离器)来产生。肿瘤消化物可以通过将肿瘤放置于酶促介质中且将肿瘤机械地解离大约1分钟，接着在37℃/5％CO_2下温育30分钟，接着进行机械解离并且在前述条件下温育的重复循环直到仅存在小组织片而产生。在此工艺结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，则可以使用FICOLL分支链亲水性多糖进行密度梯度分离以去除这些细胞。可以使用本领域已知的替代性方法，如在美国专利申请公开第2012/0244133A1号中描述的那些方法，所述美国专利申请的公开内容通过引用并入本文。任一个前述方法可以用于任一个本文所述的用于扩增TIL的方法或治疗癌症的方法的实施例中。

[0649] 如上文所指示，在一些实施例中，TIL源自实体瘤。在一些实施例中，未使实体瘤碎裂。在一些实施例中，未使实体瘤碎裂并且使其作为完整肿瘤进行酶促消化。在一些实施例中，将肿瘤在包括胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中消化。在一些实施例中，将肿瘤在包括胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤在包括胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中在37℃、5％CO_2下消化1-2小时。

[0650] 在一些实施例中，将肿瘤在包括胶原蛋白酶、DNA酶和玻尿酸酶的酶混合物中在37℃、5％CO_2下旋转消化1-2小时。在一些实施例中，将肿瘤以恒定旋转消化过夜。在一些实施例中，将肿瘤在37℃、5％CO_2下以恒定旋转消化过夜。在一些实施例中，将完整肿瘤与酶组合以形成肿瘤消化反应混合物。

[0651] 在一些实施例中，在无菌缓冲液中用冻干的酶重构肿瘤。在一些实施例中，缓冲液为无菌HBSS。

[0652] 在一些实施例中，酶混合物包括胶原蛋白酶。在一些实施例中，胶原蛋白酶是胶原蛋白酶IV。在一些实施例中，胶原蛋白酶的工作储备液为100mg/ml 10X工作储备液。

[0653] 在一些实施例中，酶混合物包括DNA酶。在一些实施例中，DNA酶的工作储备液为10,000IU/ml 10X工作储备液。

[0654] 在一些实施例中，酶混合物包括玻尿酸酶。在一些实施例中，玻尿酸酶的工作储备液为10-mg/ml 10X工作储备液。

[0655] 在一些实施例中，酶混合物包括10mg/ml胶原蛋白酶、1000IU/ml DNA酶和1mg/ml玻尿酸酶。

[0656] 在一些实施例中，酶混合物包括10mg/ml胶原蛋白酶、500IU/ml DNA酶和1mg/ml玻尿酸酶。

[0657] 在一些实施例中，酶混合物包括约10mg/ml胶原蛋白酶、约1000IU/ml DNA酶和约1mg/ml玻尿酸酶。

[0658] 通常，获自肿瘤的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新鲜获得的”或“新鲜分离的”细胞群体。在某些实施例中，将新鲜获得的TIL细胞群体暴露于包括抗原呈递细胞IL-12和OKT-3的细胞培养基。

[0659] 在一些实施例中，碎裂包含物理碎裂，包含例如切分以及消化。在一些实施例中，碎裂是物理碎裂。在一些实施例中，碎裂是切分。在一些实施例中，通过消化进行碎裂。在一些实施例中，最初可以从酶促肿瘤消化物和获自患者的肿瘤碎片中培养TIL。在实施例中，最初可以从酶促肿瘤消化物和获自患者的肿瘤碎片中培养TIL。

[0660] 在一些实施例中，当肿瘤是实体瘤时，肿瘤在例如步骤A中获得肿瘤样品之后经历物理碎裂(如在图1中提供的(具体地，例如，图1B和/或图1C))。在一些实施例中，在低温保存之前进行碎裂。在一些实施例中，在低温保存之后进行碎裂。在一些实施例中，在获得肿瘤之后并且在不存在任何低温保存的情况下进行碎裂。在一些实施例中，碎裂的步骤是体外或离体工艺。在一些实施例中，使肿瘤碎裂并且将10个、20个、30个、40个或更多个碎片或片放置在用于引发第一扩增的每个容器中。在一些实施例中，使肿瘤碎裂并且将30个或40个碎片或片放置在用于引发第一扩增的每个容器中。在一些实施例中，使肿瘤碎裂并且将40个碎片或片放置在用于引发第一扩增的每个容器中。在一些实施例中，所述多个碎片包括约4个到约50个碎片，其中每个碎片的体积为约27mm^3。在一些实施例中，所述多个碎片包括约30个到约60个碎片，其中总体积为约1300mm^3到约1500mm^3。在一些实施例中，所述多个碎片包括约50个碎片，其中总体积为约1350mm^3。在一些实施例中，所述多个碎片包括约50个碎片，其中总质量为约1克到约1.5克。在一些实施例中，所述多个碎片包括约4个碎片。

[0661] 在一些实施例中，TIL获自肿瘤碎片。在一些实施例中，肿瘤碎片是通过锐器切分获得的。在一些实施例中，肿瘤碎片介于约1mm^3与10mm^3之间。在一些实施例中，肿瘤碎片介

于约1mm^{3}与8mm^{3}之间。在一些实施例中，肿瘤碎片为约1mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约2mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约3mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约4mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约5mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约6mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约7mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约8mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约9mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为约10mm^3。在一些实施例中，肿瘤碎片为1-4mm×1-4mm×1-4mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为1mm×1mm×1mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为2mm×2mm×2mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为3mm×3mm×3mm。在一些实施例中，肿瘤碎片为4mm×4mm×4mm。

[0662] 在一些实施例中，使肿瘤碎裂以便使每个碎片上的出血性、坏死和/或脂肪组织的量最小化。在一些实施例中，使肿瘤碎裂以便使每个碎片上的出血性组织的量最小化。在一些实施例中，使肿瘤碎裂以便使每个碎片上的坏死组织的量最小化。在一些实施例中，使肿瘤碎裂以便使每个碎片上的脂肪组织的量最小化。在某些实施例中，碎裂肿瘤的步骤是体外或离体方法。

[0663] 在一些实施例中，进行肿瘤碎裂以便维持肿瘤内部结构。在一些实施例中，在不用手术刀进行锯切动作的情况下进行肿瘤碎裂。在一些实施例中，TIL获自肿瘤消化物。在一些实施例中，通过在酶介质(例如但不限于RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中温育，接着进行机械解离(GentleMACS，加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司(GentleMACS,Miltenyi Biotec,Auburn,CA))来产生肿瘤消化物。将肿瘤放置于酶介质中之后，可以对肿瘤进行机械解离大约1分钟。接着可以将溶液在37℃的5％CO_2下温育30分钟并且对其再次进行机械破碎大约1分钟。在37℃/5％CO_2下再次温育30分钟之后，可以对肿瘤进行第三次机械破碎大约1分钟。在一些实施例中，在第三次机械破碎后，如果存在较大组织片，则可以在或不在37℃/5％CO_2下再次温育30分钟的情况下，对样品再施加1次或2次机械解离。在一些实施例中，在最终温育结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，则可以使用Ficoll进行密度梯度分离以去除这些细胞。

[0664] 在一些实施例中，在引发第一扩增步骤之前的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新鲜获得的”或“新鲜分离的”细胞群体。

[0665] 在一些实施例中，细胞可以任选地在样品分离之后(例如，在获得肿瘤样品之后和/或在从肿瘤样品获得细胞悬浮液之后)冷冻并且在进入步骤B中描述的扩增之前进行冷冻储存，所述步骤在下文进一步详细描述并且在图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中例示。

[0666] 1.核心/小型活检源性TIL

[0667] 在一些实施例中，最初从通过核心活检或类似程序获得的患者肿瘤样品(“初始TIL”)获得TIL且接着将其扩增为较大群体用于如本文所述进一步操控、任选地低温保存并且任选地评估表型和代谢参数。

[0668] 在一些实施例中，可以使用本领域已知的方法，通常通过小型活检、核心活检、穿刺活检或其它获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的方式来获得患者肿瘤样品。通常，肿瘤样品可以来自任何实体瘤，包含原发性肿瘤、浸润性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品还可以是液体肿瘤，如获自恶性血液病的肿瘤。在一些实施例中，样品可以来自多个小肿瘤样品或活检。在一些实施例中，样品可以包括来自同一患者的单个肿瘤的多个肿瘤样品。在一些

实施例中，样品可以包括来自同一患者的一个、两个、三个或四个肿瘤的多个肿瘤样品。在一些实施例中，样品可以包括来自同一患者的多个肿瘤的多个肿瘤样品。实体肿瘤可以是任何癌症类型，包含但不限于乳腺癌、胰脏癌、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、基底细胞癌和黑素瘤)。在一些实施例中，癌症选自宫颈癌、头颈癌(包含例如头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(GBM)、胃肠癌、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施例中，有用的TIL获自恶性黑素瘤肿瘤，因为据报道这些恶性黑素瘤肿瘤具有特别高水平的TIL。

[0669] 通常，获自肿瘤核心或碎片的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新鲜获得的”或“新鲜分离的”细胞群体。在某些实施例中，将新鲜获得的TIL细胞群体暴露于包括抗原呈递细胞IL-2和OKT-3的细胞培养基。

[0670] 在一些实施例中，如果肿瘤为转移性的且已在过去有效地治疗/去除原发性病灶，则可能需要去除转移性病灶中的一个。在一些实施例中，最小浸润性方法是在获得时去除皮肤病灶，或颈部或腋下区域上的淋巴结。在一些实施例中，去除皮肤病灶或去除其小型活检。在一些实施例中，去除其淋巴结或小型活检。在一些实施例中，可以采用肺或肝脏转移病灶，或其腹内或胸部淋巴结或小型活检。

[0671] 在一些实施例中，肿瘤是黑素瘤。在一些实施例中，黑素瘤的小型活检包括胎痣或其部分。

[0672] 在一些实施例中，小型活检是钻取活检。在一些实施例中，用按压到皮肤中的圆形刀片获得钻取活检。在一些实施例中，用按压到皮肤中的圆形刀片获得钻取活检。周围有可疑胎痣。在一些实施例中，用按压到皮肤中的圆形刀片获得钻取活检，并且去除皮肤的圆形片。在一些实施例中，小型活检是钻取活检，并且去除肿瘤的圆形部分。

[0673] 在一些实施例中，小型活检是切除活检。在一些实施例中，小型活检是切除活检，并且去除全部胎痣或生长。在一些实施例中，小型活检是切除活检，并且去除全部胎痣或生长以及正常出现的皮肤的小边界。

[0674] 在一些实施例中，小型活检是切取活检。在一些实施例中，小型活检是切取活检，并且仅获取胎痣或生长的最不规律部分。在一些实施例中，小型活检是切取活检，并且当其它技术无法完成时，例如在可疑胎痣非常大的情况下使用切取活检。

[0675] 在一些实施例中，小型活检是肺活检。在一些实施例中，通过支气管镜检查获得小型活检。通常，支气管镜检查是将患者置于麻醉下，并且小型工具经过鼻或口腔，沿喉部向下并进入支气管通道，其中小型工具用于去除一些组织。在一些实施例中，在无法通过支气管镜检查到达肿瘤或生长的情况下，可以采用经胸穿刺活检。一般来说，对于经胸穿刺活检，患者还处于麻醉下并且针通过皮肤直接插入到可疑部位中以去除小组织样品。在一些实施例中，经胸穿刺活检可能需要介入放射学(例如，使用x射线或CT扫描来引导针)。在一些实施例中，通过穿刺活检获得小型活检。在一些实施例中，小型活检是通过内窥镜超声波(例如，具有光且通过口腔放置到食道中的内窥镜)获得。在一些实施例中，以外科手术方式获得小型活检。

[0676] 在一些实施例中，小型活检是头颈部活检。在一些实施例中，小型活检是切取活检。在一些实施例中，小型活检是切取活检，其中从观察异常的区域切割一小块组织。在一

些实施例中，如果容易接近异常区域，则可取得样品而无需住院。在一些实施例中，如果肿瘤在口腔或咽喉内部更深，则可能需要在手术室中以全身麻醉进行活检。在一些实施例中，小型活检是切除活检。在一些实施例中，小型活检是切除活检，其中去除整个区域。在一些实施例中，小型活检是细针抽吸(FNA)。在一些实施例中，小型活检是细针抽吸(FNA)，其中连接到注射器的极薄的针用于从肿瘤或肿块提取(抽吸)细胞。在一些实施例中，小型活检是钻取活检。在一些实施例中，小型活检是钻取活检，其中使用穿孔镊子去除一块可疑区域。

[0677] 在一些实施例中，小型活检是宫颈活检。在一些实施例中，通过阴道镜检查获得小型活检。通常，阴道镜检查方法采用使用连接到放大双目镜(阴道镜)的照明放大仪器，接着将其用于活检子宫颈表面的小部分。在一些实施例中，小型活检是锥切/锥形活检。在一些实施例中，小型活检是锥切/锥形活检，其中可能需要门诊手术以从子宫颈去除较大块的组织。在一些实施例中，锥形活检是除了帮助确认诊断之外，锥形活检可以用作初始治疗。

[0678] 术语“实体瘤”是指通常不含有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”是指恶性、赘生性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包含但不限于肉瘤、癌和淋巴瘤，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。在一些实施例中，癌症选自宫颈癌、头颈癌、成胶质细胞瘤、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含相互依赖的组织区室，包含薄壁组织(癌细胞)和其中分散有癌细胞且可以提供支持微环境的支持基质细胞。

[0679] 在一些实施例中，来自肿瘤的样品是以细针抽吸(FNA)、核心活检、小型活检(包含例如钻取活检)形式获得。在一些实施例中，首先将样品放置到G-Rex 10中。在一些实施例中，当存在1个或2个核心活检和/或小型活检样品时，首先将样品放置到G-Rex 10中。在一些实施例中，当存在3个、4个、5个、6个、8个、9个或10个或更多个核心活检和/或小型活检样品时，首先将样品放置到G-Rex 100中。在一些实施例中，当存在3个、4个、5个、6个、8个、9个或10个或更多个核心活检和/或小型活检样品时，首先将样品放置到G-Rex 500中。

[0680] FNA可以获自选自由以下组成的组的肿瘤：肺、黑素瘤、头颈、宫颈、卵巢、胰腺、成胶质细胞瘤、结肠直肠和肉瘤。在一些实施例中，FNA获自肺肿瘤，如来自患有非小细胞肺癌(NSCLC)的患者的肺肿瘤。在一些情况下，患有NSCLC的患者先前已经历外科手术治疗。

[0681] 本文所述的TIL可以获自FNA样品。在一些情况下，使用范围为18号针到25号针的精细规格针从患者获得或分离FNA样品。精细规格针可以为18号、19号、20号、21号、22号、23号、24号或25号。在一些实施例中，来自患者的FNA样品可以含有至少400,000个TIL，例如，400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL、950,000个TIL或更多个。

[0682] 在一些情况下，本文所述的TIL获自核心活检样品。在一些情况下，使用范围为11号针到16号针的外科手术或医疗针从患者获得或分离核心活检样品。所述针可以为11号、12号、13号、14号、15号或16号。在一些实施例中，来自患者的核心活检样品可以含有至少400,000个TIL，例如，400,000个TIL、450,000个TIL、500,000个TIL、550,000个TIL、600,000个TIL、650,000个TIL、700,000个TIL、750,000个TIL、800,000个TIL、850,000个TIL、900,000个TIL、950,000个TIL或更多个。

[0683] 通常,采集的细胞悬浮液称作“初始细胞群体”或“新鲜采集的”细胞群体。

[0684] 在一些实施例中,TIL不是获自肿瘤消化物。在一些实施例中,未碎裂实体瘤核心。

[0685] 在一些实施例中,TIL获自肿瘤消化物。在一些实施例中,通过在酶介质(例如但不限于RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNA酶和1.0mg/mL胶原蛋白酶)中温育,接着进行机械解离(GentleMACS,加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司)来产生肿瘤消化物。将肿瘤放置于酶介质中之后,可以对肿瘤进行机械解离大约1分钟。接着可以将溶液在37℃的5%CO_2下温育30分钟并且对其再次进行机械破碎大约1分钟。在37℃/5%CO_2下再次温育30分钟之后,可以对肿瘤进行第三次机械破碎大约1分钟。在一些实施例中,在第三次机械破碎后,如果存在较大组织片,则可以在或不在37℃/5%CO_2下再次温育30分钟的情况下,对样品再施加1次或2次机械解离。在一些实施例中,在最终温育结束时,如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞,则可以使用Ficoll进行密度梯度分离以去除这些细胞。

[0686] 2.从外周血中扩增外周血淋巴细胞(PBL)的方法

[0687] PBL方法1:在本发明的实施例中,使用本文所述的方法扩增PBL。在本发明的实施例中,所述方法包括从全血获得PBMC样品。在实施例中,所述方法包括通过使用非CD19+级分的阴性选择从PBMC分离纯T细胞来富集T细胞。在实施例中,所述方法包括通过使用非CD19+级分的基于磁珠的阴性选择从PBMC分离纯T细胞来富集T细胞。

[0688] 在本发明的实施例中,如下进行PBL方法1:在第0天,解冻低温保存的PBMC样品并且对PBMC进行计数。使用人类Pan T细胞分离试剂盒和LS管柱(美天旎生物技术公司)分离T细胞。

[0689] PBL方法2:在本发明的实施例中,使用包括从全血获得PBMC样品的PBL方法2扩增PBL。通过在37℃下温育PBMC至少三个小时并且接着分离非粘附细胞来富集来自PBMC的T细胞。

[0690] 在本发明的实施例中,如下进行PBL方法2:在第0天,解冻低温保存的PMBC样品,并且将PBMC细胞以600万个细胞每孔接种于6孔板的CM-2培养基中并且在37摄氏度下温育3小时。3小时后,去除作为PBL的非粘附细胞并且对其进行计数。

[0691] PBL方法3:在本发明的实施例中,使用包括从外周血获得PBMC样品的PBL方法3扩增PBL。使用CD19+选择分离B细胞,并且使用PBMC样品的非CD19+级分的阴性选择来选择T细胞。

[0692] 在本发明的实施例中,如下进行PBL方法3:在第0天,解冻源自外周血的低温保存的PBMC样品并且对其进行计数。使用人类CD19 Multisort试剂盒(美天旎生物技术公司)分选CD19+B细胞。在非CD19+细胞级分中,使用人类Pan T细胞分离试剂盒和LS管柱(美天旎生物技术公司)纯化T细胞。

[0693] 在实施例中,从全血样品中分离PBMC。在实施例中,PBMC样品用作扩增PBL的起始材料。在实施例中,在扩增工艺之前低温保存样品。在另一个实施例中,新鲜样品用作扩增PBL的起始材料。在本发明的实施例中,使用本领域已知的方法从PBMC分离T细胞。在实施例中,使用人类Pan T细胞分离试剂盒和LS管柱分离T细胞。在本发明的实施例中,使用本领域已知的抗体选择方法,例如CD19阴性选择从PBMC分离T细胞。

[0694] 在本发明的实施例中,将PBMC样品在有效鉴定非粘附细胞的所需温度下温育持续

一定时间段。在本发明的实施例中，温育时间为约3小时。在本发明的实施例中，温度为约37℃。接着使用上文所述的工艺扩增非粘附细胞。

[0695] 在一些实施例中，PBMC样品来自已经任选地用包括激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗的受试者或患者。在一些实施例中，肿瘤样品来自已经用包括激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗的受试者或患者。在一些实施例中，PBMC样品来自已经用包括激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗，已经经历至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月或1年或更久的治疗的受试者或患者。在另一个实施例中，PBMC源自目前进行ITK抑制剂方案，如依鲁替尼(ibrutinib)的患者。

[0696] 在一些实施例中，PBMC样品来自已经用包括激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗且难以用激酶抑制剂或ITK抑制剂，例如依鲁替尼治疗的受试者或患者。

[0697] 在一些实施例中，PBMC样品来自已经用包括激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗但不再经历激酶抑制剂或ITK抑制剂的治疗的受试者或患者。在一些实施例中，PBMC样品来自已经用包括激酶抑制剂或ITK抑制剂的方案预治疗但不再经历激酶抑制剂或ITK抑制剂的治疗且尚未经历至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月或至少1年或更久的治疗的受试者或患者。在另一个实施例中，PBMC源自先前已经暴露于ITK抑制剂，但在至少3个月、至少6个月、至少9个月或至少1年内尚未治疗的患者。

[0698] 在本发明的实施例中，在第0天，针对CD19+而选择细胞且相应地进行分选。在本发明的实施例中，使用抗体结合珠进行选择。在本发明的实施例中，在第0天从PBMC中分离纯T细胞。

[0699] 在本发明的实施例中，对于未用依鲁替尼或其它ITK抑制剂预治疗的患者，10-15ml的血沉棕黄层(Buffy Coat)将产生约5×10^9个PBMC，其继而将产生约5.5×10^7个PBL。

[0700] 在本发明的实施例中，对于用依鲁替尼或其它ITK抑制剂预治疗的患者，扩增工艺将产生约20×10^9个PBL。在本发明的实施例中，40.3×10^6个PBMC将产生约4.7×10^5个PBL。

[0701] 在前述实施例中的任一个中，PBMC可以源自全血样品、通过单采术、血沉棕黄层或由本领域已知用于获得PBMC的任何其它方法。

[0702] 3.从源自骨髓的PBMC中扩增骨髓浸润淋巴细胞(MIL)的方法

[0703] MIL方法3：在本发明的实施例中，所述方法包括从骨髓获得PBMC。在第0天，针对CD3+/CD33+/CD20+/CD14+而选择PBMC并且进行分选，并且超声处理非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+细胞级分并且将超声处理的细胞级分的一部分添加回到所选细胞级分中。

[0704] 在本发明的实施例中，如下进行MIL方法3：在第0天，解冻低温保存的PBMC样品并且对PBMC进行计数。细胞用CD3、CD33、CD20和CD14抗体染色并且使用分选的S3e细胞(伯乐(Bio-Rad))进行分选。将细胞分选成两种级分：免疫细胞级分(或MIL级分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)和AML母细胞级分(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。

[0705] 在本发明的实施例中，PBMC获自骨髓。在实施例中，通过单采术、抽吸、穿刺活检或本领域已知的其它类似手段从骨髓获得PBMC。在实施例中，PBMC是新鲜的。在另一个实施例中，低温保存PBMC。

[0706] 在本发明的实施例中，从10-50ml的骨髓抽吸物中扩增MIL。在本发明的实施例中，从患者获得10ml的骨髓抽吸物。在另一个实施例中，从患者获得20ml的骨髓抽吸物。在另一个实施例中，从患者获得30ml的骨髓抽吸物。在另一个实施例中，从患者获得40ml的骨髓抽

吸物。在另一个实施例中，从患者获得50ml的骨髓抽吸物。

[0707] 在本发明的实施例中，从约10-50ml的骨髓抽吸物产生的PBMC的数量为约5×10^7到约10×10^7个PBMC。在另一个实施例中，产生的PMBC的数量为约7×10^7个PBMC。

[0708] 在本发明的实施例中，约5×10^7到约10×10^7个PBMC产生约0.5×10^6到约1.5×10^6个MIL。在本发明的实施例中，产生了约1×10^6个MIL。

[0709] 在本发明的实施例中，源自骨髓抽吸物的12×10^6个PBMC产生大约1.4×10^5个MIL。

[0710] 在前述实施例中的任一个中，PBMC可以源自全血样品、从骨髓、通过单采术、从血沉棕黄层或由本领域已知用于获得PBMC的任何其它方法。

[0711] 4.PD-1的预选择选择(如在图1的步骤A2中例示的)

[0712] 根据本发明的方法，TIL在引发第一扩增之前预选择为PD-1阳性(PD-1+)。

[0713] 在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少3,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少3,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少4,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少4,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少5,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少5,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少6,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少6,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少7,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少7,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少8,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少8,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少9,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少9,000个TIL。在一些实施例中，接种到第一扩增中需要最少10,000个TIL。在一些实施例中，预选择步骤产生最少10,000个TIL。在一些实施例中，使细胞生长或扩增到200,000的密度。在一些实施例中，使细胞生长或扩增到200,000的密度，以提供约2e8个TIL用于启动快速第二扩增。在一些实施例中，使细胞生长或扩增到150,000的密度。在一些实施例中，使细胞生长或扩增到150,000的密度，以提供约2e8个TIL用于启动快速第二扩增。在一些实施例中，使细胞生长或扩增到250,000的密度。在一些实施例中，使细胞生长或扩增到250,000的密度，以提供约2e8个TIL用于启动快速第二扩增。在一些实施例中，最小细胞密度为10,000个细胞，以提供10e6用于启动快速第二扩增。在一些实施例中，用于启动快速第二扩增的10e6接种密度可以产生大于1e9个TIL。

[0714] 在一些实施例中，用于引发第一扩增的TIL是PD-1阳性(PD-1+)(例如，在预选择之后并且在引发第一扩增之前)。在一些实施例中，用于引发第一扩增的TIL为至少75％PD-1阳性、至少80％PD-1阳性、至少85％PD-1阳性、至少90％PD-1阳性、至少95％PD-1阳性、至少98％PD-1阳性或至少99％PD-1阳性(例如，在预选择之后并且在引发第一扩增之前)。在一些实施例中，PD-1群体是PD-1高。在一些实施例中，用于引发第一扩增的TIL为至少25％PD-1高、至少30％PD-1高、至少35％PD-1高、至少40％PD-1高，至少45％PD-1高、至少50％PD-1高、至少55％PD-1高、至少60％PD-1高、至少65％PD-1高、至少70％PD-1高、至少75％PD-1高、至少80％PD-1高、至少85％PD-1高、至少90％PD-1高、至少95％PD-1高、至少98％PD-1高或至少99％PD-1高(例如，在预选择之后并且在引发第一扩增之前)。

[0715] 在一些实施例中，通过用抗PD-1抗体染色初始细胞群体、全肿瘤消化物和/或全肿瘤细胞悬浮液TIL来进行PD-1阳性TIL的预选择。在一些实施例中，抗PD-1抗体是多克隆抗体，例如小鼠抗人PD-1多克隆抗体、山羊抗人PD-1多克隆抗体等。在一些实施例中，抗PD-1

抗体是单克隆抗体。在一些实施例中，抗PD-1抗体包含例如但不限于EH12.2H7、PD1.3.1、M1H4、纳武单抗(BMS-936558，百时美施贵宝公司；Opdivo®)、派姆单抗(兰伯丽珠单抗，MK03475或MK-3475，默克公司；Keytruda®)、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司)、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司)、皮地利珠单抗(抗PD-1 mAb CT-011，麦迪韦逊医疗公司)、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司)和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司)、人单克隆抗体REGN2810(再生元公司)、人单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)和/或人源化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(诺华公司)。在一些实施例中，PD-1抗体来自克隆:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。用于根据本发明的方法预选择PD-1阳性TIL以用于扩增TIL的其它合适的抗体(如通过步骤A到F例示的，如本文所述的)是在美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体，所述美国专利通过引用并入本文。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于纳武单抗(BMS-936558，百时美施贵宝公司；Opdivo®)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于派姆单抗(兰伯丽珠单抗，MK03475或MK-3475，默克公司；Keytruda®)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于皮地利珠单抗(抗PD-1 mAb CT-011，麦迪韦逊医疗公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于人单克隆抗体REGN2810(再生元公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于人单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于人源化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(诺华公司)的表位结合。在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与不同于RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146的表位结合。纳武单抗和派姆单抗与PD-1结合的结构是已知的，并且已经在例如Tan,S.等人(Tan,S.等人，《自然通讯》),8:14369|DOI:10.1038/ncomms14369(2017)；所述文献出于所有目的通过引用整体并入本文)中进行描述。在一些实施例中，抗PD-1抗体是EH12.2H7。在一些实施例中，抗PD-1抗体是PD1.3.1。在一些实施例中，抗PD-1抗体不是PD1.3.1。在一些实施例中，抗PD-1抗体是M1H4。在一些实施例中，抗PD-1抗体不是M1H4。

[0716] 在一些实施例中，用于预选择的抗PD-1抗体与至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％、至少99％或至少100％的表达PD-1的细胞结合。

[0717] 在一些实施例中，患者已经用抗PD-1抗体进行治疗。在一些实施例中，受试者未接受过抗PD-1抗体治疗。在一些实施例中，受试者尚未用抗PD-1抗体进行治疗。在一些实施例中，受试者先前已经用化学剂进行治疗。在一些实施例中，受试者先前已经用化学剂进行治疗但是不再用化学剂进行治疗。在一些实施例中，受试者是化疗后治疗或抗PD-1抗体治疗后。在一些实施例中，受试者是化疗后治疗和抗PD-1抗体治疗后。在一些实施例中，患者未接受过抗PD-1抗体治疗。在一些实施例中，受试者患有未接受过治疗的癌症或接受过化疗后治疗但未接受过抗PD-1抗体治疗。在一些实施例中，受试者未接受过治疗和接受过化疗后治疗但未接受过抗PD-1抗体治疗。

[0718] 在一些实施例中，其中患者先前已经用第一抗PD-1抗体进行治疗，通过用第二抗PD-1抗体染色初始细胞群体、全肿瘤消化物和/或全肿瘤细胞悬浮液TIL进行预选择，所述第二抗PD-1抗体不被第一抗PD-1抗体阻断与初始细胞群体TIL的表面上的PD-1结合。

[0719] 在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1抗体进行治疗，通过用抗体(“抗Fc抗体”)染色初始细胞群体TIL进行预选择，所述抗体与不溶于初始细胞群体TIL的表面上的抗PD-1抗体的Fc区结合。在一些实施例中，抗Fc抗体是多克隆抗体，例如小鼠抗人Fc多克隆抗体、山羊抗人Fc多克隆抗体等。在一些实施例中，抗Fc抗体是单克隆抗体。在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1人或人源化IgG抗体进行治疗，并且初始细胞群体TIL用抗人IgG抗体进行染色。在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1人或人源化IgG1抗体进行治疗，初始细胞群体TIL用抗人IgG1抗体进行染色。在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1人或人源化IgG2抗体进行治疗，初始细胞群体TIL用抗人IgG2抗体进行染色。在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1人或人源化IgG3抗体进行治疗，初始细胞群体TIL用抗人IgG3抗体进行染色。在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1人或人源化IgG4抗体进行治疗，初始细胞群体TIL用抗人IgG4抗体进行染色。

[0720] 在一些实施例中，其中患者先前已经用抗PD-1抗体进行治疗，通过使初始细胞群体TIL与同一抗PD-1抗体接触以及然后用与不溶于初始细胞群体TIL的表面上的抗PD-1抗体的Fc区结合的抗Fc抗体对初始细胞群体TIL进行染色来进行预选择。

[0721] 在一些实施例中，使用细胞分选方法进行预选择。在一些实施例中，细胞分选方法是流式细胞术法，例如流式活化细胞分选(FACS)。在一些实施例中，所述第一群体和所述PBMC群体两者中的荧光团的强度用于建立FACS门，以确立分别对应于PD-1阴性TIL、PD-1中间体TIL和PD-1阳性TIL的低水平、中间水平和高水平的强度。在一些实施例中，进行细胞分选方法，使得使用PBMC、FMO对照和样品本身将门设置在高、中(也称为中间体)和低(也称为阴性)以区分这三个群体。在一些实施例中，PBMC用作门控对照。在一些实施例中，PD-1高群体被定义为在PBMC中观察到的以上对于PD-1是阳性的细胞群体。在一些实施例中，TIL中的中间体PD-1+群体涵盖PBMC中的PD-1+细胞。在一些实施例中，基于FMO对阴性进行门控。在一些实施例中，FACS门是在通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得和/或接收第一TIL群体的步骤之后建立的。在一些实施例中，对门进行每种建立。在一些实施例中，针对PBMC的每个样品建立门控。在一些实施例中，针对PBMC的每个样品建立门控。在一些实施例中，每隔10天、20天、30天、40天、50天或60天由PBMC建立门控模板。在一些实施例中，每60天由PBMC建立门控模板。在一些实施例中，每10天、20天、30天、40天、50天或60天针对PBMC的每个样品建立门控模板。在一些实施例中，每60天针对PBMC的每个样品建立门控模板。

[0722] 在一些实施例中，预选择涉及从所述第一TIL群体中选择PD-1阳性TIL以获得富含PD-1的TIL群体包括从第一TIL群体中选择为至少11.27％到74.4％的PD-1阳性TIL的TIL群体。在一些实施例中，第一TIL群体为至少20％到80％PD-1阳性TIL、至少20％到80％PD-1阳性TIL、至少30％到80％PD-1阳性TIL、至少40％到80％PD-1阳性TIL、至少50％到80％PD-1阳性TIL、至少10％到70％PD-1阳性TIL、至少20％到70％PD-1阳性TIL、至少30％到70％PD-1阳性TIL或至少40％到70％PD-1阳性TIL。

[0723] 在一些实施例中，选择步骤(例如，预选择和/或选择PD-1阳性细胞)包括以下步

骤：

[0724] (i)将所述第一TIL群体和PBMC群体暴露于过量的单克隆抗PD-1 IgG4抗体，所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合；

[0725] (ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体；

[0726] (iii)如通过荧光活化细胞分选(FACS)进行的，相比于所述PBMC群体中的强度，基于所述第一TIL群体中的所述PD-1阳性TIL的荧光团的强度获得所述富含PD-1的TIL群体。

[0727] 在一些实施例中，PD-1阳性TIL是PD-1高TIL。

[0728] 在一些实施例中，至少70％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。在一些实施例中，至少80％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。在一些实施例中，至少90％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。在一些实施例中，至少95％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。在一些实施例中，至少99％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。在一些实施例中，100％的所述富含PD-1的TIL群体是PD-1阳性TIL。

[0729] 不同的抗PD-1抗体对PD-1内的不同表位表现出不同的结合特性。在一些实施例中，抗PD-1抗体与不同于派姆单抗的表位结合。在一些实施例中，抗PD1抗体与PD-1的IgV结构域外部的N端环中的表位结合。在一些实施例中，抗PD1抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环结合。在一些实施例中，抗PD-1抗体是通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合的抗PD-1抗体。在一些实施例中，抗PD-1抗体是通过PD-1的IgV结构域外部的N末端环与PD-1结合的单克隆抗PD-1抗体。在一些实施例中，单克隆抗PD-1抗体是通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合的抗PD-1 IgG4抗体。参见例如，Tan,S.《自然通讯》第8卷，章节14369:1-10(2017)。

[0730] 在一些实施例中，如图1的步骤A2例示的选择步骤包括以下步骤：(i)将所述第一TIL群体暴露于过量的单克隆抗PD-1 IgG4抗体，所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体通过PD-1的IgV结构域外部的N端环与PD-1结合；(ii)添加过量的与荧光团缀合的抗IgG4抗体；以及(iii)基于所述荧光团进行基于流动的细胞分选，以获得富含PD-1的TIL群体。在一些实施例中，所述单克隆抗PD-1 IgG4抗体是纳武单抗或其变体、片段或缀合物。在一些实施例中，所述抗IgG4抗体是克隆抗人IgG4，克隆HP6023。在一些实施例中，用于步骤(b)中的选择的所述抗PD-1抗体与EH12.2H7或纳武单抗结合同一表位。

[0731] 在一些实施例中，采用WO2019156568的PD-1门控方法。为了确定源自肿瘤样品的TIL是否是PD-1高的，本领域的技术人员可以利用对应于从来自一个或多个健康人类受试者的血液样品获得的外周T细胞中的PD-1的表达水平的参考值。参考样品中的PD-1阳性细胞可以使用荧光减去一个对照并且匹配同种型对照来定义。在一些实施例中，在来自健康受试者的CD3+/PD-1+外周T细胞(例如，参考细胞)中测量PD-1的表达水平，用于确立获自肿瘤的TIL中的PD-1的免疫染色强度的阈值或截止值。阈值可以被定义为PD-1高T细胞的PD-1免疫染色的最小强度。因此，具有等于或高于阈值的PD-1表达的TIL可以被认为是PD-1高细胞。在一些情况下，PD-1高TIL表示具有对应于总CD3+细胞的最大1％或更少的最高强度PD-1免疫染色的那些。在其它情况下，PD-1高TIL表示具有对应于总CD3+细胞的最大0.75％或更少的最高强度PD-1免疫染色的那些。在一些情况下，PD-1高TIL表示具有对应于总CD3+细胞的最大0.50％或更少的最高强度PD-1免疫染色的那些。在一种情况下，PD-1高TIL表示具有对应于总CD3+细胞的最大0.25％或更少的最高强度PD-1免疫染色的那些。

[0732] a.荧光团

[0733] 在一些实施例中，用包含与荧光团连接的抗PD-1抗体和与荧光团连接的抗CD3抗体的混合物(cocktail)对初始细胞群体TIL进行染色。在一些实施例中，用包含与荧光团(例如，PE，活/死紫色)连接的抗PD-1抗体和抗CD3-FITC的混合物对初始细胞群体TIL进行染色。在一些实施例中，用包含抗PD-1-PE、抗CD3-FITC和活/死蓝色染色剂(赛默飞世尔(ThermoFisher)，马萨诸塞州，目录号L23105)的混合物对初始细胞群体TIL进行染色。在一些实施例中，在与抗PD1抗体一起温育之后，根据本文所述的引发第一扩增(例如，在步骤B中)，选择PD-1阳性细胞进行扩增。

[0734] 在一些实施例中，荧光团包含但不限于PE(藻红蛋白)、APC(别藻蓝蛋白)、PerCP(多甲藻素叶绿素蛋白)、DyLight 405、Alexa Fluor 405、太平洋蓝(Pacific Blue)、Alexa Fluor 488、FITC(异硫氰酸荧光素)、DyLight 550、Alexa Fluor 647、DyLight 650和Alexa Fluor 700。在一些实施例中，荧光团包含但不限于PE-Alexa Fluor® 647、PE-Cy5、PerCP-Cy5.5、PE-Cy5.5、PE-Alexa Fluor® 750、PE-Cy7和APC-Cy7。在一些实施例中，荧光团包含但不限于荧光素染料。荧光素染料的实例包含但不限于5-羧基荧光素、5-异硫氰酸荧光素和6-羧基荧光素、5,6-二羧基荧光素、5-(和6)-磺基荧光素、砜基荧光素、琥珀酰基荧光素、5-(和6)-羧基SNARF-1、羧基荧光素磺酸盐、羧基荧光素两性离子、碳氧荧光素季铵盐、羧基荧光素膦酸酯、羧基荧光素GABA、5'(6')-羧基荧光素、羧基荧光素-半胱氨酸-Cy5和荧光素谷胱甘肽。在一些实施例中，荧光部分是罗丹明染料。罗丹明染料的实例包含但不限于四甲基罗丹明-6-异硫氰酸酯、5-羧基四甲基罗丹明、5-羧基对甲氨基酚衍生物、羧基罗丹明110、四甲基和四乙基罗丹明、二苯基二甲基和二苯基二乙基罗丹明、二萘基罗丹明、罗丹明101磺酰氯(以TEXAS RED®的商品名出售)。在一些实施例中，荧光部分是花青染料。花青染料的实例包含但不限于Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5和Cy7。

[0735] B.步骤B：引发第一扩增

[0736] 在一些实施例中，本发明方法提供较年轻TIL，其可以提供相对于较老的TIL(即，在向受试者/患者施用之前已经进一步经历更多轮复制的TIL)的另外的治疗益处。在以下文献中已经描述了年轻TIL的特征：例如，Donia等人，《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scandinavian Journal of Immunology)》，75:157-167(2012)；Dudley等人，《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》，16:6122-6131(2010)；Huang等人，《免疫治疗学杂志(J Immunother)》，28(3):258-267(2005)；Besser等人，《临床癌症研究》，19(17):OF1-OF9(2013)；Besser等人，《免疫治疗学杂志》32:415-423(2009)；Robbins等人，《免疫学杂志(J Immunol)》2004;173:7125-7130;Shen等人，《免疫治疗学杂志》，30:123-129(2007)；Zhou等人，《免疫治疗学杂志》，28:53-62(2005)；和Tran等人，《免疫治疗学杂志》，31:742-751(2008)，所有所述文献均通过引用整体并入本文。

[0737] 在切分或消化(例如，以获得全肿瘤消化物和/或全肿瘤细胞悬浮液)肿瘤碎片和/或肿瘤碎片之后，例如，如在图1的步骤A(具体地，例如，图1B和/或图1C)中描述的，将所得细胞在含有IL-2、OKT-3和饲养细胞(例如，抗原呈递饲养细胞或同种异体辐照的PBMC)的血清中，在有利于TIL生长超过肿瘤和其它细胞的条件下培养。在一些实施例中，在培养起始时将IL-2、OKT-3和饲养细胞与肿瘤消化物和/或肿瘤碎片一起添加(例如，在第0天)。在一些实施例中，将肿瘤消化物和/或肿瘤碎片在容器中温育，其中每个容器具有至多60个碎片

并且具有6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，将这种初始细胞群体培养数天(通常1到8天)的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，将这种初始细胞群体培养数天(通常1到7天)的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，引发第一扩增进行1到8天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，引发第一扩增进行1到7天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行5到8天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行5到7天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行约6到8天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行约6到7天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行约7到8天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行约7天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。在一些实施例中，这种引发第一扩增进行约8天的时间段，产生本体TIL群体，通常约1×10^8个本体TIL细胞。

[0738] 在一些实施例中，

[0739] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施例中，施用约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}个TIL，其中平均约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中，施用约1.2×10^{10}到约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约3×10^{10}到约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约4×10^{10}到约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约5×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约6×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约7×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中，治疗有效剂量为约1.2×10^{10}到约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约3×10^{10}到约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约4×10^{10}到约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约5×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约6×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。

[0740] 在一些实施例中，在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}和9×10^{13}个。在实施例中，在本发明的药物组合物中提供的TIL的数量的范围为1×10^6到5×10^6、5×10^6到1×10^7、1×10^7到5×10^7、5×10^7到1×10^8、1×10^8到5×10^8、5×10^8到1×10^9、1×10^9到5×10^9、5×10^9到1×10^{10}、1×10^{10}到5×10^{10}、5×10^{10}到1×10^{11}、5×10^{11}到1×10^{12}、1×10^{12}到5×10^{12}和5×10^{12}到1×10^{13}。

[0741] 在优选的实施例中，可以使用如下文和本文所述的引发第一扩增步骤(例如，图1

(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些,其可以包含称为REP前或引发REP的工艺并且其含有来自第0天和/或培养起始的饲养细胞),接着如下文在步骤D和本文所述的快速第二扩增(步骤D,包含称为快速扩增方案(REP)步骤的工艺),接着任选的低温保存并且接着如下文和本文所述的第二个步骤D(包含称为再刺激REP步骤的工艺)进行TIL的扩增。从所述工艺获得的TIL可以任选地表征如本文所述的表型特性和代谢参数。在一些实施例中,肿瘤碎片介于约1mm^{3}与10mm^{3}之间。

[0742] 在一些实施例中,第一扩增培养基称为"CM",培养基的缩写。在一些实施例中,步骤B的CM由补充有10%人类AB血清、25mM Hepes和10mg/mL庆大霉素的RPMI 1640及GlutaMAX组成。

[0743] 在一些实施例中,存在少于或等于240个肿瘤碎片。在一些实施例中,存在少于或等于240个放置于少于或等于4个容器中的肿瘤碎片。在一些实施例中,容器是GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中,将少于或等于60个肿瘤碎片放置于1个容器中。在一些实施例中,每个容器包括每容器少于或等于500mL培养基。在一些实施例中,培养基包括IL-2。在一些实施例中,培养基包括6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,培养基包括抗原呈递饲养细胞(在本文中也称为"抗原呈递细胞")。在一些实施例中,培养基包括每容器2.5×10^{8}个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中,培养基包括OKT-3。在一些实施例中,培养基包括每容器30ng/mL的OKT-3。在一些实施例中,容器是GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中,培养基包括6000IU/mL的IL-2、30ng的OKT-3和2.5×10^{8}个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中,培养基包括每容器6000IU/mL的IL-2、30ng/mL的OKT-3和2.5×10^{8}个抗原呈递饲养细胞。

[0744] 在制备肿瘤碎片、全肿瘤消化物和/或全肿瘤细胞悬浮液之后,将所得细胞(即,为初始细胞群体的碎片和/或消化物)在含有IL-2、抗原呈递饲养细胞和OKT-3的培养基中,在有利于TIL生长超过肿瘤和其它细胞并且允许TIL引发和从第0天培养开始加速生长的条件下培养。在一些实施例中,将肿瘤消化物和/或肿瘤碎片与6000IU/mL的IL-2以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3一起温育。将这种初始细胞群体培养数天(通常1到8天)的时间段,产生本体TIL群体,通常约1×10^{8}个本体TIL细胞。在一些实施例中,引发第一扩增期间的生长培养基包括IL-2或其变体,以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3。在一些实施例中,将这种初始细胞群体培养数天(通常1到7天)的时间段,产生本体TIL群体,通常约1×10^{8}个本体TIL细胞。在一些实施例中,引发第一扩增期间的生长培养基包括IL-2或其变体,以及抗原呈递饲养细胞和OKT-3。在一些实施例中,IL-2是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液的比活性为20-30×10^{6}IU/mg。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液的比活性为20×10^{6}IU/mg。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液的比活性为25×10^{6}IU/mg。在一些实施例中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液的比活性为30×10^{6}IU/mg。在一些实施例中,IL-2储备溶液的最终浓度为4-8×10^{6}IU/mg的IL-2。在一些实施例中,IL-2储备溶液的最终浓度为5-7×10^{6}IU/mg的IL-2。在一些实施例中,IL-2储备溶液的最终浓度为6×10^{6}IU/mg的IL-2。在一些实施例中,如实例C中所述来制备IL-2储备溶液。在一些实施例中,引发第一扩增培养基包括约10,000IU/mL的IL-2、约9,000IU/mL的IL-2、约8,000IU/mL的IL-2、约7,000IU/mL的IL-2、约6000IU/mL的IL-2或约5,000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,引发第一扩增培养基包括约9,000IU/mL的IL-2到约5,000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,引发第一扩增培养基包括约8,000IU/mL的IL-2到约6,000IU/mL的IL-2。在一些实施例

中，引发第一扩增培养基包括约7,000IU/mL的IL-2到约6,000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约6,000IU/mL的IL-2。在实施例中，细胞培养基进一步包括IL-2。在一些实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约3000IU/mL的IL-2。在实施例中，引发第一扩增细胞培养基进一步包括IL-2。在优选的实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约3000IU/mL的IL-2。在实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约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。在实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括介于1000与2000IU/mL、介于2000与3000IU/mL之间、介于3000与4000IU/mL之间、介于4000与5000IU/mL之间、介于5000与6000IU/mL之间、介于6000与7000IU/mL之间、介于7000与8000IU/mL之间或约8000IU/mL的IL-2。

[0745] 在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约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或约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约500IU/mL的IL-15到约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约400IU/mL的IL-15到约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约300IU/mL的IL-15到约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约200IU/mL的IL-15。在一些实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约180IU/mL的IL-15。在一实施例中，引发第一扩增细胞培养基进一步包括IL-15。在优选的实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约180IU/mL的IL-15。

[0746] 在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约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或约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约20IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约15IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约12IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约10IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约5IU/mL的IL-21到约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增培养基包括约2IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约0.5IU/mL的IL-21。在实施例中，细胞培养基进一步包括IL-21。在优选的实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约1IU/mL的IL-21。

[0747] 在实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括OKT-3抗体。在一些实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约30ng/mL的OKT-3抗体。在实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括介于0.1ng/mL与1ng/mL之间、介于1ng/mL与5ng/mL之间、介于5ng/mL与10ng/mL之间、介于10ng/mL与20ng/mL之间、介于20ng/mL与30ng/mL之间、介于30ng/mL与40ng/mL之间、介于40ng/mL与50ng/mL之间和介于50ng/mL与100ng/mL

之间的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括15ng/ml与30ng/mL之间的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括30ng/mL的OKT-3抗体。在一些实施例中，OKT-3抗体是莫罗单抗。

[0748] 表3：莫罗单抗的氨基酸序列(示例性OKT-3抗体)

[0749]

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

[0750] 在一些实施例中，引发第一扩增细胞培养基包括含有一种或多种TNFRSF激动剂的细胞培养基。在一些实施例中，TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施例中，TNFRSF激动剂是4-1BB激动剂，并且4-1BB激动剂选自由以下组成的组：乌瑞鲁单抗、乌托米卢单抗、EU-101、融合蛋白，以及其片段、衍生物、变体、生物类似物及组合。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL与100μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到20μg/mL与40μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0751] 在一些实施例中，除了一种或多种TNFRSF激动剂之外，引发第一扩增细胞培养基进一步包括初始浓度为约3000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体，并且其中所述一种或多种TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施例中，除了一种或多种TNFRSF激动剂之外，引发第一扩增细胞培养基进一步包括初始浓度为约6000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体，并且其中所述一种或多种TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。

[0752] 在一些实施例中，引发第一扩增培养基称为“CM”，培养基的缩写。在一些实施例中，其称为CM1(培养基1)。在一些实施例中，CM由补充有10％人类AB血清、25mM Hepes和10mg/mL庆大霉素的RPMI 1640及GlutaMAX组成。在一些实施例中，CM是实例中描述的CM1，参见实例A。在一些实施例中，引发第一扩增在初始细胞培养基或第一细胞培养基中进行。在一些实施例中，引发第一扩增培养基或初始细胞培养基或第一细胞培养基包括IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(在本文中也称为饲养细胞)。

[0753] 在一些实施例中，本文公开的扩增工艺中使用的培养基是无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中，无血清或确定成分培养基包括基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中，无血清或确定成分培养基用于预防和/或减少部分由于含血清培养基的批次间变化而引起的实验变化。

[0754] 在一些实施例中，无血清或确定成分培养基包括基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中，基底细胞培养基包含但不限于CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™ AIM-V培养基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium,DMEM)、最小必需培养基(Minimal Essential Medium,MEM)、伊

格尔氏基底培养基(Basal Medium Eagle,BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(Glasgow's Minimal Essential Medium,G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。

[0755] 在一些实施例中,血清补充剂或血清替代物包含但不限于以下中的一种或多种:CTS™ OpTmizer T细胞扩增血清补充剂、CTS™免疫细胞血清替代物、一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种抗生素和一种或多种痕量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包括白蛋白和选自由以下组成的组的一种或多种成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以及含有痕量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包括L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或2-巯基乙醇。

[0756] 在一些实施例中,CTS™OpTmizer™ T细胞免疫细胞血清替代物用于常规生长培养基,包含但不限于CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™ AIM-V培养基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基底培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0757] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基中的总血清替代物浓度(体积%)为总无血清或确定成分培养基的约1体积%、2体积%、3体积%、4体积%、5体积%、6体积%、7体积%、8体积%、9体积%、10体积%、11体积%、12体积%、13体积%、14体积%、15体积%、16体积%、17体积%、18体积%、19体积%或20体积%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约3%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约5%。在一些实施例中,总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约10%。

[0758] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基是CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科技公司)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物可用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM是在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)以及55mM的2-巯基乙醇补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。

[0759] 在一些实施例中,确定成分培养基是CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科技公司)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物可用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM是在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基和26mL CTS™

OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)以及55mM的2-巯基乙醇补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约1000IU/mL到约8000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约3000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和55mM的2-巯基乙醇补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约1000IU/mL到约8000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和55mM的2-巯基乙醇补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约3000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和55mM的2-巯基乙醇补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约1000IU/mL到约6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和约2mM谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约1000IU/mL到约8000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和约2mM谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约3000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和约2mM谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3％的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。

[0760] 在一些实施例中，用浓度为约0.1mM到约10mM、0.5mM到约9mM、1mM到约8mM、2mM到约7mM、3mM到约6mM或4mM到约5mM的谷氨酰胺(即，GlutaMAX®)补充无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中，用浓度为约2mM的谷氨酰胺(即，GlutaMAX®)补充无血清培养基或确定成分培养基。

[0761] 在一些实施例中，用浓度为约5mM到约150mM、10mM到约140mM、15mM到约130mM、20mM到约120mM、25mM到约110mM、30mM到约100mM、35mM到约95mM、40mM到约90mM、45mM到约85mM、50mM到约80mM、55mM到约75mM、60mM到约70mM或约65mM的2-巯基乙醇补充无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中，用浓度为约55mM的2-巯基乙醇补充无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中，2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。

[0762] 在一些实施例中，国际PCT公开第WO/1998/030679号(其通过引用并入本文)中描述的确定成分培养基可用于本发明。在所述公开中，描述了无血清真核细胞培养基。无血清真核细胞培养基包含用能够支持细胞在无血清培养物中生长的无血清补充剂补充的基底细胞培养基。无血清真核细胞培养基补充剂包括或通过将选自由以下组成的组的一种或多

种成分组合来获得:一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种痕量元素和一种或多种抗生素。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包括L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或β-巯基乙醇。在一些实施例中,确定成分培养基包括白蛋白或白蛋白替代品以及选自由以下组成的组的一种或多种成分:一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体和一种或多种痕量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包括白蛋白和选自由以下组成的组的一种或多种成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以及含有痕量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中,基底细胞培养基选自以下组成的组:杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基底培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0763] 在一些实施例中,在确定成分培养基中甘氨酸的浓度在约5-200mg/L的范围内,L-组氨酸的浓度为约5-250mg/L,L-异亮氨酸的浓度为约5-300mg/L,L-甲硫氨酸的浓度为约5-200mg/L,L-苯丙氨酸的浓度为约5-400mg/L,L-脯氨酸的浓度为约1-1000mg/L,L-羟脯氨酸的浓度为约1-45mg/L,L-丝氨酸的浓度为约1-250mg/L,L-苏氨酸的浓度为约10-500mg/L,L-色氨酸的浓度为约2-110mg/L,L-酪氨酸的浓度为约3-175mg/L,L-缬氨酸的浓度为约5-500mg/L,硫胺素的浓度为约1-20mg/L,还原型谷胱甘肽的浓度为约1-20mg/L,L-抗坏血酸-2-磷酸的浓度为约1-200mg/L,铁饱和转铁蛋白的浓度为约1-50mg/L,胰岛素的浓度为约1-100mg/L,亚硒酸钠的浓度为约0.000001-0.0001mg/L,并且白蛋白(例如,AlbuMAX® I)的浓度为约5000-50,000mg/L。

[0764] 在一些实施例中,确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1X培养基中的浓度范围”下的列中所列出的浓度范围存在。在其它实施例中,确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1X培养基的优选实施例”下的列中所列出的最终浓度存在。在其它实施例中,确定成分培养基是包括无血清补充剂的基底细胞培养基。在这些实施例中的一些实施例中,无血清补充剂包括具有以下类型且呈下表A中标题“补充剂的优选实施例”下的列中所列出的浓度的非痕量元素部分成分。

[0765] 表A:非痕量元素部分成分的浓度

[0766]

成分	补充剂的优选实施例（mg/L）（约）	1X 培养基中的浓度范围（mg/L）（约）	1X 培养基中的优选实施例（mg/L）（约）
甘氨酸	150	5-200	53
L-组氨酸	940	5-250	183
L-异亮氨酸	3400	5-300	615
L-甲硫氨酸	90	5-200	44
L-苯丙氨酸	1800	5-400	336
L-脯氨酸	4000	1-1000	600
L-羟脯氨酸	100	1-45	15
L-丝氨酸	800	1-250	162
L-苏氨酸	2200	10-500	425
L-色氨酸	440	2-110	82
L-酪氨酸	77	3-175	84
L-缬氨酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
还原型谷胱甘肽	10	1-20	1.5
抗坏血酸-2-PO_4（Mg 盐）	330	1-200	50
转铁蛋白（铁饱和）	55	1-50	8
胰岛素	100	1-100	10
亚硒酸钠	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50,000	12,500

[0767] 在一些实施例中，所述确定成分培养基的同渗浓摩在约260与350mOsmol之间。在一些实施例中，同渗浓摩在约280与310mOsmol之间。在一些实施例中，用至多约3.7g/L或约2.2g/L碳酸氢钠补充确定成分培养基。可以进一步用L-谷氨酰胺(最终浓度为约2mM)、一种或多种抗生素、非必需氨基酸(NEAA;最终浓度为约100μM)、2-巯基乙醇(最终浓度为约100μM)补充确定成分培养基。

[0768] 在一些实施例中，在Smith等人，“使用新型无异种CTS免疫细胞血清替代物离体扩增用于过继性免疫治疗的人类T细胞(Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement)”，《临床转化免疫学(Clin Transl Immunology)》，4(1)2015(doi:10.1038/cti.2014.31)中描述的确定成分培养基可用于本发明。简单来说，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基底细胞培养基，并且用0、2%、5%或10%CTS™免疫细胞血清替代物补充。

[0769] 在实施例中，第一和/或第二可透气容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在实施例中，第一和/或第二可透气容器中的细胞培养基缺乏β-巯基乙醇(BME或βME;也称为2-巯基乙醇，CAS 60-24-2)。

[0770] 在一些实施例中，引发第一扩增(包含例如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺，其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为1到8天，如实例和附图中所讨论的。在一些实施例中，引发第一扩增(包含例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺，其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为2到8天。在一些实施例中，引发第一扩增(包含例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺，其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为3到8天。在一些实施例中，引发第一扩增(包含例如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺，其可以包含有时称为REP前或引发

REP的那些工艺)工艺为4到8天,如实例和附图中所讨论的。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为1到7天,如实例和附图中所讨论的。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为2到8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为2到7天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如在图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为3到8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如在图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为3到7天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为4到8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为4到7天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为5到8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为5到7天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为6到8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为6到7天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中提供的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为7到8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如在图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中提供的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为8天。在一些实施例中,引发第一扩增(包含例如在图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤B中提供的那些工艺的工艺,其可以包含有时称为REP前或引发REP的那些工艺)工艺为7天。

[0771] 在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行1天到8天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行1天到7天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行2天到8天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行2天到7天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行3天到8天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行3天到7天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行4天到8天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行4天到7天。在一些实施例中,引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或

启动第一引发扩增步骤时开始进行5天到8天。在一些实施例中，引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行5天到7天。在一些实施例中，引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行6天到8天。在一些实施例中，引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行6天到7天。在一些实施例中，引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行7到8天。在一些实施例中，引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行8天。在一些实施例中，引发第一TIL扩增可以从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时开始进行7天。

[0772] 在一些实施例中，TIL的引发第一扩增可以进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行1天到8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行1天到7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行2天到7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行3天到7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行4天到7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行5天到7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行6天到7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行2天到8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行3天到8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行4天到8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行5天到8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行6天到8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行2天到9天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行3天到9天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行4天到9天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行5天到9天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行6天到9天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行2天到10天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行3天到10天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行4天到10天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行5天到10天。

[0773] 在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行6天到10天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行2天到11天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行3天到11天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行4天到11天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行5天到11天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行6天到11天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行7天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行8天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行9天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行10天。在一些实施例中，第一TIL扩增可以进行11天。

[0774] 在一些实施例中，在引发第一扩增期间，以组合形式采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合。在一些实施例中，在引发第一扩增期间，包含例如在根据图1(具体地，例如图1B)的步骤B工艺期间，以及本文所述的期间，可以包含IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21及其任何组合。在一些实施例中，在引发第一扩增期间，以组合形式采用IL-2、IL-15和IL-21的组合。在一些实施例中，在根据图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤B工艺期间，以及如本文所述的期间，可以包含IL-2、IL-15和IL-21以及其任何组合。

[0775] 在一些实施例中，在密闭系统生物反应器中进行引发第一扩增，例如根据图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤B。在一些实施例中，如本文所述，采用密闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用生物反应器。在一些实施例中，生物反应器用作容器。在一些实施例中，采用的生物反应器为例如G-REX-10或G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反

应器为G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-10。

[0776] 1.饲养细胞和抗原呈递细胞

[0777] 在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增(引发REP)期间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第4-8天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第4-7天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第5-8天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第5-7天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第6-8天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第6-7天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第7天或第8天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第7天期间的任何时间添加。在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时不需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)，而是在引发第一扩增期间在第8天期间的任何时间添加。

[0778] 在实施例中，本文所述的引发第一扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤B中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP前或引发REP的那些扩增)在TIL扩增起始时并且在引发第一扩增期间需要饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细

胞”)。在许多实施例中,饲养细胞是获自同种异体健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法,如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。在一些实施例中,在引发第一扩增期间使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施例中,在引发第一扩增期间每个容器使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施例中,在引发第一扩增期间每个GREX-10使用2.5×10^8个饲养细胞。在一些实施例中,在引发第一扩增期间每个GREX-100使用2.5×10^8个饲养细胞。

[0779] 通常,通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC,并且将其用于REP程序中,如实例中所述,其提供用于评估辐照的同种异体PBMC的复制不胜任的示例性方案。

[0780] 在一些实施例中,如果第14天的活细胞总数小于在引发第一扩增第0天置于培养物中的初始活细胞数量,则认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所述的TIL扩增程序中。

[0781] 在一些实施例中,如果在存在OKT3和IL-2的情况下培养,第7天的活细胞总数相比于在引发第一扩增第0天置于培养物中的初始活细胞数量并未增加,则认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所述的TIL扩增程序中。在一些实施例中,在存在30ng/mL OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0782] 在一些实施例中,如果在存在OKT3和IL-2的情况下培养,第7天的活细胞总数相比于在引发第一扩增第0天置于培养物中的初始活细胞数量并未增加,则认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所述的TIL扩增程序中。在一些实施例中,在存在5-60ng/mL OKT3抗体和1000-6000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在10-50ng/ml OKT3抗体和2000-5000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在20-40ng/ml OKT3抗体和2000-4000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在25-35ng/ml OKT3抗体和2500-3500IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在30ng/ml OKT3抗体和6000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在15ng/ml OKT3抗体和3000IU/mL IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中,在存在15ng/mL OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0783] 在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在实施例中,第二扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1到25、约1到50、约1到100、约1到125、约1到150、约1到175、约1到200、约1到225、约1到250、约1到275、约1到300、约1到325、约1到350、约1到375、约1到400或约1到500。在实施例中,第二扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1:50与1:300之间。在实施例中,第二扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1:100与1:200之间。

[0784] 在实施例中,本文所述的引发第一扩增程序需要约2.5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中,本文所述的引发第一扩增程序需要约2.5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又另一个实施例中,本文所述的引发第一扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中,本文所述的引发第一扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中,引发第一扩增需要用于快速第二扩增的饲养细胞数量的四分之一、三分之一、十二分之五或二分之一。

[0785] 在一些实施例中,引发第一扩增中的培养基包括IL-2。在一些实施例中,引发第一

扩增中的培养基包括6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，引发第一扩增中的培养基包括抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，引发第一扩增中的培养基包括每容器2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，引发第一扩增中的培养基包括OKT-3。在一些实施例中，培养基包括每容器30ng的OKT-3。在一些实施例中，容器是GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，培养基包括6000IU/mL的IL-2、30ng/mL的OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器6000IU/mL的IL-2、30ng/mL的OKT-3和2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器500mL的培养基和15μg的OKT-3每2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器500mL的培养基和15μg的OKT-3。在一些实施例中，容器是GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，培养基包括500mL的培养基和6000IU/mL的IL-2、30ng/mL的OKT-3以及2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器500mL的培养基和6000IU/mL的IL-2、15μg的OKT-3以及2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器500mL的培养基和15μg的OKT-3每2.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0786] 在一实施例中，本文所述的引发第一扩增程序在第二扩增期间需要相对于TIL过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞是获自同种异体健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法，如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。在实施例中，使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

[0787] 通常，通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC，并且将其用于本文所述的TIL扩增程序，包含附图和实例中描述的示例性程序中。

[0788] 在实施例中，在引发第一扩增中使用人工抗原呈递细胞代替PBMC或与其组合。

[0789] 2.细胞因子

[0790] 本文所述的扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(具体地，IL-2)的培养基，如本领域已知的。

[0791] 可替代地，另外可能使用细胞因子的组合进行TIL的引发第一扩增，其中IL-2、IL-15和IL-21中的两个或更多个的组合是如国际公开第WO 2015/189356号和第WO 2015/189357号中通常概述，所述国际公开特此通过引用整体明确地并入。因此，可能的组合包含IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21，其中后者特别适用于许多实施例中。使用细胞因子的组合特别有利于产生淋巴细胞，并且具体地如本文所述的T细胞。

[0792] 表4:白介素的氨基酸序列。

[0793]

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

[0794] C.步骤C:引发第一扩增到快速第二扩增的转变

[0795] 在一些情况下,从引发第一扩增(其可以包含有时称为REP前的扩增)获得的本体TIL群体,包含例如从例如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)中所指示的步骤B获得的TIL群体,可以进行快速第二扩增(其可以包含有时称为快速扩增方案(REP)的扩增)并且然后如以下所讨论的进行低温保存。类似地,在经基因修饰的TIL将用于疗法的情况下,来自引发第一扩增的扩增TIL群体或来自快速第二扩增的扩增TIL群体可以进行基因修饰,以用于扩增步骤之前或引发第一扩增之后和在快速第二扩增之前的合适治疗。

[0796] 在一些实施例中,将从引发第一扩增(例如,从如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)中所指示的步骤B)获得的TIL储存,直到进行表型分型以供选择。在一些实施例中,从引发第一扩增(例如,从如图1(具体地,例如,图1B和/或图1C)所指示的步骤B)获得的TIL不被存储,并且直接进行快速第二扩增。在一些实施例中,在引发第一扩增之后并在快速第二扩增之前,未对从引发第一扩增中获得的TIL进行低温保存。在一些实施例中,在从发生肿瘤碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约3天到7天进行引发第一扩增到快速第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约3天到8天进行引发第一扩增到快速第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约4天到7天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约4天到8天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约5天到7天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约5天到8天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约6天到7天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约6天到8天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约7天到8天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约7天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。在一些实施例中,在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起约8天进行引发第一扩增到第二扩增的转变。

[0797] 在一些实施例中，在从发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤时起1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天进行引发第一扩增到快速第二扩增的转变。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的1天到7天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的1天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的2天到7天。在一些实施例中，引发第一扩增到第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的2天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的3天到7天。在一些实施例中，引发第一扩增到第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的3天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的4天到7天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的4天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的5天到7天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的5天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的6天到7天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的6天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的7天到8天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的7天。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变发生在发生碎裂和/或启动第一引发扩增步骤的8天。

[0798] 在一些实施例中，在初始第一扩增之后和在快速第二扩增之前不存储TIL，并且TIL直接进行快速第二扩增(例如，在一些实施例中，在如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)所示的步骤B到步骤D的转变期间不存在存储)。在一些实施例中，如本文所述，在密闭系统中进行转变。在一些实施例中，来自引发第一扩增的TIL(第二TIL群体)直接进行快速第二扩增，而不具有转变期。

[0799] 在一些实施例中，在密闭系统生物反应器中进行引发第一扩增到快速第二扩增的转变，例如根据图1(具体地，例如，图1B)的步骤C。在一些实施例中，如本文所述，采用密闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用单一生物反应器。在一些实施例中，采用的单一生物反应器是例如GREX-10或GREX-100。在一些实施例中，密闭系统生物反应器是单一生物反应器。在一些实施例中，引发第一扩增到快速第二扩增的转变涉及容器大小的扩大。在一些实施例中，在比快速第二扩增更小的容器中进行引发第一扩增。在一些实施例中，在GREX-100中进行引发第一扩增，并且在GREX-500中进行快速第二扩增。

[0800] 在一些实施例中，在引发第一扩增结束时获得最多1×10^6个细胞TIL。在引发第一扩增结束时获得0.1×10^6个、0.2×10^6个、0.3×10^6个、0.4×10^6个、0.5×10^6个、0.6×10^6个、0.7×10^6个、0.8×10^6个、0.9×10^6个、1.0×10^6个、1.1×10^6个、1.2×10^6个、1.3×10^6个、1.4×10^6个或0.5×10^6个TIL。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约9％到约40％PD-1+。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约10％到约40％PD-1+。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约15％到约30％PD-1+。在一些实施例中，在

引发第一扩增结束时的TIL为约20％到约40％PD-1+。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约20％到约30％PD-1+。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约10％到约20％PD-1+。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约9％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％或约40％PD-1+。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约9％到约40％PD-1高。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约15％到约30％PD-1高。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约20％到约40％PD-1高。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约20％到约30％PD-1高。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约10％到约20％PD-1高。在一些实施例中，在引发第一扩增结束时的TIL为约9％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％或约40％PD-1高。

[0801] D.步骤D:快速第二扩增

[0802] 在一些实施例中，在采集和引发第一扩增之后，在步骤A和步骤B，以及称为步骤C的转变之后，TIL细胞群体的数量进一步得到扩增，如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中所指示的。所述进一步扩增在本文中称为快速第二扩增，其可以包含本领域中通常称为快速扩增工艺的扩增工艺(快速扩增方案或REP;以及如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤D中所指示的工艺)。通常在可透气容器中使用包括多种组分(包含饲养细胞、细胞因子源和抗CD3抗体)的培养基来完成快速第二扩增。在一些实施例中，在启动快速第二扩增后的1天、2天、3天或4天(即，在整个Gen 3工艺的第8天、第9天、第10天或第11天)，将TIL转移到较大体积容器。

[0803] 在一些实施例中，在快速第二扩增开始时添加最多1×10^6个细胞TIL。在快速第二扩增开始时添加0.1×10^6个、0.2×10^6个、0.3×10^6个、0.4×10^6个、0.5×10^6个、0.6×10^6个、0.7×10^6个、0.8×10^6个、0.9×10^6个、1.0×10^6个、1.1×10^6个、1.2×10^6个、1.3×10^6个、1.4×10^6个或0.5×10^6个TIL。在一些实施例中，来自引发第一扩增的最大细胞密度为1e6细胞，以提供1e9用于启动快速第二扩增。

[0804] 在一些实施例中，TIL的快速第二扩增(其可以包含有时称为REP的扩增;以及如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤D中所指示的工艺)可以使用本领域的技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器来进行。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约1天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约1天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约2天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约2天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约3天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约3天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约4天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约4天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约5天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约5天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约6天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约6天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在

启动快速第二扩增之后进行约7天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约7天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约8天到约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约8天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约9天到约10天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约1天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约2天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约3天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约4天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约5天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约6天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约7天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约8天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约9天。在一些实施例中，第二TIL扩增可以在启动快速第二扩增之后进行约10天。

[0805] 在实施例中，可以使用本公开的方法在可透气容器中进行快速第二扩增(包含例如称为REP的扩增;以及如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)的步骤D中所指示的工艺)。在一些实施例中，在快速第二扩增中在存在IL-2、OKT-3和饲养细胞(在本文中也称为“抗原呈递细胞”)的情况下扩增TIL。在一些实施例中，在快速第二扩增中在存在IL-2、OKT-3和饲养细胞的情况下扩增TIL，其中将饲养细胞添加到存在于引发第一扩增中的饲养细胞的两倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍浓度的最终浓度。例如，可以在存在白介素-2(IL-2)或白介素-15(IL-15)的情况下使用非特异性T细胞受体刺激迅速地扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激可以包含，例如，抗CD3抗体，如约30ng/ml的OKT3，小鼠单克隆抗CD3抗体(可从新泽西州拉里坦的奥梅制药(Ortho-McNeil,Raritan,NJ)或加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech,Auburn,CA)商购获得)或UHCT-1(可从美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend商购获得)。通过在第二扩增期间包含癌症的一种或多种抗原，包含其抗原部分，如一个或多个表位，可以扩增TIL以在体外诱导TIL的进一步刺激，任选地在存在T细胞生长因子(如300IU/mL IL-2或IL-15)的情况下，所述抗原可以任选地由载体，如人类白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽，例如0.3μM MART-1:26-35(27L)or gp100:209-217(210M)表达。其它合适的抗原可以包含例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2或其抗原部分。还可以通过用在表达HLA-A2的抗原呈递细胞上进行脉冲的癌症的一种或多种相同抗原再刺激而迅速地扩增TIL。可替代地，可以用例如示例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。在一些实施例中，再刺激作为第二扩增的一部分来进行。在一些实施例中，在经辐照的自体淋巴细胞的存在下或在经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的情况下进行第二扩增。

[0806] 在实施例中，细胞培养基进一步包括IL-2。在一些实施例中，细胞培养基包括约3000IU/mL的IL-2。在实施例中，细胞培养基包括约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。在实施例中，细胞培养基包括在1000与2000IU/mL之间、在2000与3000IU/mL之间、在3000与4000IU/mL之间、在4000与5000IU/mL之间、在5000与6000IU/mL之间、在6000与7000IU/mL之

间、在7000与8000IU/mL之间或在8000IU/mL之间的IL-2。

[0807] 在实施例中，细胞培养基包括OKT-3抗体。在一些实施例中，细胞培养基包括约30ng/mL的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括介于0.1ng/mL与1ng/mL之间、介于1ng/mL与5ng/mL之间、介于5ng/mL与10ng/mL之间、介于10ng/mL与20ng/mL之间、介于20ng/mL与30ng/mL之间、介于30ng/mL与40ng/mL之间、介于40ng/mL与50ng/mL之间和介于50ng/mL与100ng/mL之间的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括30ng/ml与60ng/mL之间的OKT-3抗体。在实施例中，细胞培养基包括约60ng/mL OKT-3。在一些实施例中，OKT-3抗体是莫罗单抗。

[0808] 在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括IL-2。在一些实施例中，培养基包括6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括每容器7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括OKT-3。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括每容器500mL的培养基和30μg的OKT-3。在一些实施例中，容器是GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括6000IU/mL的IL-2、60ng/mL的OKT-3和7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器500mL的培养基和6000IU/mL的IL-2、30μg的OKT-3以及7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞。

[0809] 在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括IL-2。在一些实施例中，培养基包括6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，培养基包括每容器在5×10^8与7.5×10^8个之间的抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括OKT-3。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括每容器500mL的培养基和30μg的OKT-3。在一些实施例中，容器是GREX100 MCS烧瓶。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括6000IU/mL的IL-2、60ng/mL的OKT-3和在5×10^8与7.5×10^8个之间的抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中，快速第二扩增中的培养基包括每容器500mL的培养基和6000IU/mL的IL-2、30μg的OKT-3和在5×10^8与7.5×10^8个之间的抗原呈递饲养细胞。

[0810] 在一些实施例中，细胞培养基包括含有一种或多种TNFRSF激动剂的细胞培养基。在一些实施例中，TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。在一些实施例中，TNFRSF激动剂是4-1BB激动剂，并且4-1BB激动剂选自由以下组成的组：乌瑞鲁单抗、乌托米卢单抗、EU-101、融合蛋白，以及其片段、衍生物、变体、生物类似物及组合。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到0.1μg/mL与100μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。在一些实施例中，以足以在细胞培养基中达到20μg/mL与40μg/mL之间的浓度的浓度添加TNFRSF激动剂。

[0811] 在一些实施例中，除了一种或多种TNFRSF激动剂之外，细胞培养基进一步包括初始浓度为约3000IU/mL的IL-2和初始浓度为约30ng/mL的OKT-3抗体，并且其中所述一种或多种TNFRSF激动剂包括4-1BB激动剂。

[0812] 在一些实施例中，在第二扩增期间，以组合的形式采用IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的组合。在一些实施例中，在第二扩增期间，包含例如在根据图1(具体地，例如图1B和/或

图1C)的步骤D工艺期间,以及本文所述的期间,可以包含IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21及其任何组合。在一些实施例中,在第二扩增期间,以组合形式采用IL-2、IL-15和IL-21的组合。在一些实施例中,在根据图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤D工艺期间,以及如本文所述的期间,可以包含IL-2、IL-15和IL-21以及其任何组合。

[0813] 在一些实施例中,可以在包括IL-2、OKT-3、抗原呈递饲养细胞和任选的TNFRSF激动剂的补充细胞培养基中进行第二扩增。在一些实施例中,在补充细胞培养基中进行第二扩增。在一些实施例中,补充细胞培养基包括IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施例中,第二细胞培养基包括IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC;也称为抗原呈递饲养细胞)。在一些实施例中,在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(即,抗原呈递细胞)的细胞培养基中进行第二扩增。

[0814] 在一些实施例中,第二扩增培养基包括约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或约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约500IU/mL的IL-15到约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约400IU/mL的IL-15到约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约300IU/mL的IL-15到约100IU/mL的IL-15。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约200IU/mL的IL-15。在一些实施例中,细胞培养基包括约180IU/mL的IL-15。在实施例中,细胞培养基进一步包括IL-15。在优选的实施例中,细胞培养基包括约180IU/mL的IL-15。

[0815] 在一些实施例中,第二扩增培养基包括约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或约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约20IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约15IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约12IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约10IU/mL的IL-21到约0.5IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约5IU/mL的IL-21到约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中,第二扩增培养基包括约2IU/mL的IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包括约1IU/mL的IL-21。在一些实施例中,细胞培养基包括约0.5IU/mL的IL-21。在实施例中,细胞培养基进一步包括IL-21。在优选的实施例中,细胞培养基包括约1IU/mL的IL-21。

[0816] 在一些实施例中,抗原呈递饲养细胞(APC)是PBMC。在实施例中,快速扩增和/或第二扩增中的TIL与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为约1到10、约1到15、约1到20、约1到25、约1到30、约1到35、约1到40、约1到45、约1到50、约1到75、约1到100、约1到125、约1到150、约1到175、约1到200、约1到225、约1到250、约1到275、约1到300、约1到325、约1到350、约1到375、约1到400或约1到500。在实施例中,快速扩增和/或第二扩增中的TIL与PBMC的比率在1:50与1:300之间。在实施例中,快速扩增和/或第二扩增中的TIL与PBMC的比率在1:100与1:200之间。

[0817] 在实施例中,在烧瓶中进行REP和/或快速第二扩增,其中将本体TIL在150ml培养基中与100倍或200倍过量的灭活饲养细胞、30ng/mL OKT3抗CD3抗体和6000IU/mL IL-2混合,其中饲养细胞浓度为引发第一扩增中的饲养细胞浓度的至少1.1倍(1.1X)、1.2X、1.3X、

1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.8X、2X、2.1X、2.2X、2.3X、2.4X、2.5X、2.6X、2.7X、2.8X、2.9X、3.0X、3.1X、3.2X、3.3X、3.4X、3.5X、3.6X、3.7X、3.8X、3.9X或4.0X。进行培养基更换(通常通过抽吸2/3用过的培养基且用具有相等体积的新鲜培养基替代来更换2/3培养基)直到将细胞转移到替代性生长室。替代性生长室包含G-REX烧瓶和可透气容器,如下文更充分地讨论的。

[0818] 在一些实施例中,快速第二扩增(其可以包含称为REP工艺的工艺)为7到9天,如实例和附图中所讨论的。在一些实施例中,第二扩增为7天。在一些实施例中,第二扩增为8天。在一些实施例中,第二扩增为9天。

[0819] 在实施例中,可以在具有100cm可透气硅胶底部的500mL容量的可透气烧瓶(G-Rex100,可从美国明尼苏达州新布莱顿的威尔森沃尔夫制造公司(Wilson Wolf Manufacturing Corporation,New Brighton,MN,USA)商购获得)中进行第二扩增(其可以包含称为REP的扩增,以及图1(具体地,例如图1B和/或图1C)的步骤D中涉及的那些扩增),可以将5×10^6或10×10^6个TIL与PBMC一起培养在补充有5%人类AB血清、3000IU每mL的IL-2和60ng每ml的抗CD3(OKT3)的400mL 50/50培养基中。可以在37℃/5%CO_2下温育G-Rex100烧瓶。在第5天,可以去除250mL上清液并将其放置到离心瓶中且以1500rpm(491×g)离心10分钟。可以用具有5%人类AB血清、6000IU每mL IL-2的150mL新鲜培养基重新悬浮TIL沉淀,并且将其添加回最初的GREX-100烧瓶中。当TIL在GREX-100烧瓶中连续扩增时,在第10天或第11天,可以将TIL移动到较大烧瓶,如GREX-500。可以在培养的第14天采集细胞。可以在培养的第15天采集细胞。可以在培养的第16天采集细胞。在一些实施例中,进行培养基更换直到将细胞转移到替代性生长室。在一些实施例中,通过抽吸2/3用过的培养基且用相等体积的新鲜培养基替代来更换2/3的培养基。在一些实施例中,替代性生长室包含GREX烧瓶和可透气容器,如下文更充分地讨论的。

[0820] 在一些实施例中,本文公开的扩增工艺中使用的培养基是无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中,无血清或确定成分培养基包括基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中,无血清或确定成分培养基用于预防和/或减少部分由于含血清培养基的批次间变化而引起的实验变化。

[0821] 在一些实施例中,无血清或确定成分培养基包括基底细胞培养基和血清补充剂和/或血清替代物。在一些实施例中,基底细胞培养基包含但不限于CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™ AIM-V培养基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基底培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0822] 在一些实施例中,血清补充剂或血清替代物包含但不限于以下中的一种或多种:CTS™ OpTmizer T细胞扩增血清补充剂、CTS™免疫细胞血清替代物、一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种抗生素和一种或多种痕量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包括白蛋白和选自由以下组成的组的一种或多种成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、

L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以及含有痕量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中，确定成分培养基进一步包括L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或2-巯基乙醇。

[0823] 在一些实施例中，CTS™ OpTmizer™ T细胞免疫细胞血清替代物用于常规生长培养基，包含但不限于CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基、CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM、CTS™ AIM-V培养基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T细胞扩增无异种培养基、杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基底培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0824] 在一些实施例中，无血清或确定成分培养基中的总血清替代物浓度(体积%)为总无血清或确定成分培养基的约1体积%、2体积%、3体积%、4体积%、5体积%、6体积%、7体积%、8体积%、9体积%、10体积%、11体积%、12体积%、13体积%、14体积%、15体积%、16体积%、17体积%、18体积%、19体积%或20体积%。在一些实施例中，总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约3%。在一些实施例中，总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约5%。在一些实施例中，总血清替代物浓度为无血清或确定成分培养基的总体积的约10%。

[0825] 在一些实施例中，无血清或确定成分培养基是CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科技公司)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物可用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM是在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)以及55mM的2-巯基乙醇补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM。

[0826] 在一些实施例中，确定成分培养基是CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM(赛默飞世尔科技公司)。CTS™ OpTmizer™的任何调配物可用于本发明。CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM是在使用前混合在一起的1L CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增基底培养基和26mL CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增补充剂的组合。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)以及55mM的2-巯基乙醇补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约1000IU/mL到约8000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约3000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)、55mM的2-巯基乙醇以及2mM的L-谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM，并且进一步包括约6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中，用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和55mM的2-巯基乙醇补充

CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且进一步包括约1000IU/mL到约8000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和55mM的2-巯基乙醇补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且进一步包括约3000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和55mM的2-巯基乙醇补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且进一步包括约1000IU/mL到约6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和约2mM谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且进一步包括约1000IU/mL到约8000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和约2mM谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且进一步包括约3000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)和约2mM谷氨酰胺补充CTS™OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且进一步包括约6000IU/mL的IL-2。在一些实施例中,用约3%的CTS™免疫细胞血清替代物(SR)(赛默飞世尔科技公司)补充CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM,并且2-巯基乙醇在培养基中的最终浓度为55μM。在一些实施例中,用浓度为约0.1mM到约10mM、0.5mM到约9mM、1mM到约8mM、2mM到约7mM、3mM到约6mM或4mM到约5mM的谷氨酰胺(即,GlutaMAX®)补充无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中,用浓度为约2mM的谷氨酰胺(即,GlutaMAX®)补充无血清培养基或确定成分培养基。

[0827] 在一些实施例中,用浓度为约5mM到约150mM、10mM到约140mM、15mM到约130mM、20mM到约120mM、25mM到约110mM、30mM到约100mM、35mM到约95mM、40mM到约90mM、45mM到约85mM、50mM到约80mM、55mM到约75mM、60mM到约70mM或约65mM的2-巯基乙醇补充无血清培养基或确定成分培养基。在一些实施例中,用浓度为约55mM的2-巯基乙醇补充无血清培养基或确定成分培养基。

[0828] 在一些实施例中,国际PCT公开第WO/1998/030679号(其通过引用并入本文)中描述的确定成分培养基可用于本发明。在所述公开中,描述了无血清真核细胞培养基。无血清真核细胞培养基包含用能够支持细胞在无血清培养物中生长的无血清补充剂补充的基底细胞培养基。无血清真核细胞培养基补充剂包括或通过将选自由以下组成的组的一种或多种成分组合来获得:一种或多种白蛋白或白蛋白替代品、一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体、一种或多种痕量元素和一种或多种抗生素。在一些实施例中,确定成分培养基进一步包括L-谷氨酰胺、碳酸氢钠和/或β-巯基乙醇。在一些实施例中,确定成分培养基包括白蛋白或白蛋白替代品以及选自由以下组成的组的一种或多种成分:一种或多种氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、一种或多种抗氧化剂、一种或多种胰岛素或胰岛素替代品、一种或多种胶原蛋白前体和一种或多种痕量元素。在一些实施例中,确定成分培养基包括白蛋白和选自由以下组成的组的一种或多种成分:甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫胺素、还原型谷胱甘肽、L-抗坏血酸-2-磷酸酯、铁饱和转铁蛋白、胰岛素以及含有痕量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}和Zr^{4+}的化合物。在一些实施例中,基底细胞培养基选自以下组成的组:杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、最

小必需培养基(MEM)、伊格尔氏基底培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必需培养基(αMEM)、格拉斯哥氏最小必需培养基(G-MEM)、RPMI生长培养基和伊思考夫改良杜尔贝可培养基。

[0829] 在一些实施例中,在确定成分培养基中甘氨酸的浓度在约5-200mg/L的范围内,L-组氨酸的浓度为约5-250mg/L,L-异亮氨酸的浓度为约5-300mg/L,L-甲硫氨酸的浓度为约5-200mg/L,L-苯丙氨酸的浓度为约5-400mg/L,L-脯氨酸的浓度为约1-1000mg/L,L-羟脯氨酸的浓度为约1-45mg/L,L-丝氨酸的浓度为约1-250mg/L,L-苏氨酸的浓度为约10-500mg/L,L-色氨酸的浓度为约2-110mg/L,L-酪氨酸的浓度为约3-175mg/L,L-缬氨酸的浓度为约5-500mg/L,硫胺素的浓度为约1-20mg/L,还原型谷胱甘肽的浓度为约1-20mg/L,L-抗坏血酸-2-磷酸的浓度为约1-200mg/L,铁饱和转铁蛋白的浓度为约1-50mg/L,胰岛素的浓度为约1-100mg/L,亚硒酸钠的浓度为约0.000001-0.0001mg/L,并且白蛋白(例如,AlbuMAX® I)的浓度为约5000-50,000mg/L。

[0830] 在一些实施例中,确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1X培养基中的浓度范围”下的列中所列出的浓度范围存在。在其它实施例中,确定成分培养基中的非痕量元素部分成分是以下表A中标题“1X培养基的优选实施例”下的列中所列出的最终浓度存在。在其它实施例中,确定成分培养基是包括无血清补充剂的基底细胞培养基。在这些实施例中的一些实施例中,无血清补充剂包括具有以下类型且呈下表A中标题“补充剂的优选实施例”下的列中所列出的浓度的非痕量元素部分成分。

[0831] 表A:非痕量元素部分成分的浓度

[0832]

成分	补充剂的优选实施例(mg/L)(约)	1X 培养基中的浓度范围(mg/L)(约)	1X 培养基中的优选实施例(mg/L)(约)
甘氨酸	150	5-200	53
L-组氨酸	940	5-250	183
L-异亮氨酸	3400	5-300	615
L-甲硫氨酸	90	5-200	44
L-苯丙氨酸	1800	5-400	336
L-脯氨酸	4000	1-1000	600
L-羟脯氨酸	100	1-45	15
L-丝氨酸	800	1-250	162
L-苏氨酸	2200	10-500	425
L-色氨酸	440	2-110	82
L-酪氨酸	77	3-175	84
L-缬氨酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
还原型谷胱甘肽	10	1-20	1.5
抗坏血酸-2-PO_4(Mg 盐)	330	1-200	50
转铁蛋白(铁饱和)	55	1-50	8
胰岛素	100	1-100	10
亚硒酸钠	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50,000	12,500

[0833] 在一些实施例中,所述确定成分培养基的同渗浓摩在约260与350mOsmol之间。在一些实施例中,同渗浓摩在约280与310mOsmol之间。在一些实施例中,用至多约3.7g/L或约2.2g/L碳酸氢钠补充确定成分培养基。可以进一步用L-谷氨酰胺(最终浓度为约2mM)、一种

或多种抗生素、非必需氨基酸(NEAA;最终浓度为约100μM)、2-巯基乙醇(最终浓度为约100μM)补充确定成分培养基。

[0834] 在一些实施例中,在Smith等人,"使用新型无异种CTS免疫细胞血清替代物离体扩增用于过继性免疫治疗的人类T细胞",《临床转化免疫学》,4(1)2015(doi:10.1038/cti.2014.31)中描述的确定成分培养基可用于本发明。简单来说,RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基底细胞培养基,并且用0、2%、5%或10%CTS™免疫细胞血清替代物补充。

[0835] 在实施例中,第一和/或第二可透气容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在实施例中,第一和/或第二可透气容器中的细胞培养基缺乏β-巯基乙醇(BME或βME;也称为2-巯基乙醇,CAS 60-24-2)。

[0836] 在实施例中,进行快速第二扩增(包含称为REP的扩增)并且进一步包括其中选择TIL以获得优良的肿瘤反应性的步骤。可以使用本领域已知的任何选择方法。例如,在美国专利申请公开第2016/0010058A1号(所述美国专利申请公开的公开内容通过引用并入本文)中描述的方法可以用于选择具有优良的肿瘤反应性的TIL。

[0837] 任选地,细胞活力测定可以在快速第二扩增(包含称为REP扩增的扩增)之后使用本领域已知的标准测定来进行。例如,可以对具有本体TIL的样品进行锥虫蓝排除测定(trypan blue exclusion assay),其选择性地标记死细胞并且允许进行活力评估。在一些实施例中,可以使用Cellometer K2自动化细胞计数器(马萨诸塞州劳伦斯市的Nexcelom生物科学公司(Nexcelom Bioscience,Lawrence,MA))对TIL样品进行计数和活力确定。在一些实施例中,根据标准Cellometer K2图像细胞仪自动细胞计数器方案确定活力。

[0838] T淋巴细胞和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因区段的体细胞重组产生的。这些基因区段:V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)确定免疫球蛋白与T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供一种用于产生TIL的方法,所述TIL展现并且增加T细胞库多样性。在一些实施例中,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,在第二扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,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。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白重链中。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中,多样性是在T细胞受体中。在一些实施例中,多样性是在选自由以下组成的组的T细胞受体之一中:α受体、β受体、γ受体和δ受体。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施例中,TCRab(即,TCRα/β)的表达增加。

[0839] 在一些实施例中,快速第二扩增培养基(例如,有时称为CM2或第二细胞培养基)包括IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地讨论的。在一些实施例中,快速第二扩增培养基(例如,有时称为CM2或第二细胞培养基)包括6000IU/mL IL-2、30微克/烧瓶OKT-3以及7.5×10^8个抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地讨论的。在一些实施例中,快速第二扩增培养基(例如,有时称为CM2或第二细胞培养基)包括IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地讨论的。在一些实施例中,快速第二扩增培养基(例如,有时称为CM2或第二细胞培养基)包括6000IU/mL IL-2、30微克/烧瓶OKT-3以及5×10^8个抗原呈递饲养细胞(APC),如下文更详细地讨论的。

[0840] 在一些实施例中，在密闭系统生物反应器中进行快速第二扩增，例如根据图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤D。在一些实施例中，如本文所述，采用密闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用生物反应器。在一些实施例中，生物反应器用作容器。在一些实施例中，采用的生物反应器为例如G-REX-100或G-REX-500。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-500。

[0841] 1.饲养细胞和抗原呈递细胞

[0842] 在实施例中，本文所述的快速第二扩增程序(例如，包含如来自图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤D中描述的那些扩增的扩增，以及称为REP的那些扩增)在REP TIL扩增期间和/或在快速第二扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞是获自健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法，如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。

[0843] 通常，通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC，并且将其用于REP程序中，如实例中所述，其提供用于评估辐照的同种异体PBMC的复制不胜任的示例性方案。

[0844] 在一些实施例中，如果第7天或第14天的活细胞总数小于REP第0天和/或第二扩增第0天(即，第二扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量，则认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所述的TIL扩增程序中。

[0845] 在一些实施例中，如果在存在OKT3和IL-2的情况下培养，第7天和第14天的活细胞总数相比于在REP第0天和/或第二扩增第0天(即，第二扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量并未增加，则认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所述的TIL扩增程序中。在一些实施例中，在存在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在60ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在60ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0846] 在一些实施例中，如果在存在OKT3和IL-2的情况下培养，第7天和第14天的活细胞总数相比于在REP第0天和/或第二扩增第0天(即，第二扩增开始当天)置于培养物中的初始活细胞数量并未增加，则认为PBMC为复制不胜任的且认可用于本文所述的TIL扩增程序中。在一些实施例中，在存在30-60ng/ml OKT3抗体和1000-6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30-60ng/ml OKT3抗体和2000-5000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30-60ng/ml OKT3抗体和2000-4000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30-60ng/ml OKT3抗体和2500-3500IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。在一些实施例中，在存在30-60ng/ml OKT3抗体和6000IU/ml IL-2的情况下培养PBMC。

[0847] 在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施例中，抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在实施例中，第二扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率为约1到10、约1到25、约1到50、约1到100、约1到125、约1到150、约1到175、约1到200、约1到225、约1到250、约1到275、约1到300、约1到325、约1到350、约1到375、约1到400或约1到500。在实施例中，第二扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1:50与1:300之间。在实施例中，第二扩增中的TIL与抗原呈递饲养细胞的比率在1:100与1:200之间。

[0848] 在实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个

TIL的比率。在实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中，快速第二扩增需要的饲养细胞数量是快速第二扩增的两倍。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约7.5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，快速第二扩增需要的饲养细胞数量是引发第一扩增的两倍(2.0X)、2.5X、3.0X、3.5X或4.0X。

[0849] 在一些实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中，快速第二扩增需要与快速第二扩增相同数量的饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约7.5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约7.5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，快速第二扩增需要的饲养细胞数量是引发第一扩增的两倍(2.0X)、2.5X、3.0X、3.5X或4.0X。

[0850] 在一些实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约100×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约50×10^6个TIL的比率。在又另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中，本文所述的第二扩增程序需要约7.5×10^8个饲养细胞与约25×10^6个TIL。在又另一个实施例中，快速第二扩增需要与快速第二扩增相同数量的饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约2.5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约5×10^8个饲养细胞。在又另一个实施例中，当本文所述的引发第一扩增需要约7.5×10^8个饲养细胞时，快速第二扩增需要约7.5×10^8个饲养细胞。

[0851] 在实施例中，本文所述的快速第二扩增程序在快速第二扩增期间需要过量的饲养细胞。在许多实施例中，饲养细胞是获自同种异体健康血液供体的标准全血单位的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法，如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。在实施例中，使用人

工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。在一些实施例中,将PBMC以添加到引发第一扩增中的PBMC的两倍浓度添加到快速第二扩增中。

[0852] 通常,通过辐照或热处理灭活同种异体PBMC,并且将其用于本文所述的TIL扩增程序,包含附图和实例中描述的示例性程序中。

[0853] 在实施例中,在快速第二扩增中使用人工抗原呈递细胞代替PBMC或与其组合。

[0854] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施例中,施用约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}个TIL,其中平均约7.8×10^{10}个TIL,尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中,施用约1.2×10^{10}到约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中,施用约3×10^{10}到约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中,施用约4×10^{10}到约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中,施用约5×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中,施用约6×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中,施用约7×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。在一些实施例中,治疗有效剂量为约7.8×10^{10}个TIL,尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中,治疗有效剂量为约1.2×10^{10}到约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约3×10^{10}到约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约4×10^{10}到约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约5×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约6×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中,治疗有效剂量为约7×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。

[0855] 在一些实施例中,在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}和9×10^{13}个。在实施例中,在本发明的药物组合物中提供的TIL的数量的范围为1×10^{6}到5×10^{6}、5×10^{6}到1×10^{7}、1×10^{7}到5×10^{7}、5×10^{7}到1×10^{8}、1×10^{8}到5×10^{8}、5×10^{8}到1×10^{9}、1×10^{9}到5×10^{9}、5×10^{9}到1×10^{10}、1×10^{10}到5×10^{10}、5×10^{10}到1×10^{11}、5×10^{11}到1×10^{12}、1×10^{12}到5×10^{12}和5×10^{12}到1×10^{13}。

[0856] 2.细胞因子

[0857] 本文所述的快速第二扩增方法通常使用具有高剂量的细胞因子(具体地,IL-2)的培养基,如本领域已知的。

[0858] 可替代地,另外可能使用细胞因子的组合进行TIL的快速第二扩增,其中IL-2、IL-15和IL-21中的两个或更多个的组合是如国际公开第WO 2015/189356号和第WO 2015/189357号中通常概述,所述国际公开特此通过引用整体明确地并入。因此,可能的组合包含IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21以及IL-2、IL-15和IL-21,其中后者特别适用于许多实施例中。使用细胞因子的组合特别有利于产生淋巴细胞,并且具体地如本文所述的T细胞。

[0859] E.步骤E:采集TIL

[0860] 在快速第二扩增步骤之后,可以采集细胞。在一些实施例中,在例如如图1(具体

地，例如图1B和/或图1C)中提供的一个、两个、三个、四个或更多个扩增步骤之后采集TIL。在一些实施例中，在例如如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中提供的两个扩增步骤之后采集TIL。在一些实施例中，在例如如图1(具体地，例如图1B)中提供的两个扩增步骤(一个引发第一扩增和一个快速第二扩增)之后采集TIL。

[0861] 可以任何适当且无菌的方式，包含例如通过离心来采集TIL。用于TIL采集的方法是本领域熟知的并且任何此类已知的方法可以用于本发明方法。在一些实施例中，使用自动化系统采集TIL。

[0862] 细胞采集器和/或细胞处理系统可从多个来源商购获得，包含例如费森尤斯卡比公司(Fresenius Kabi)、Tomtec生命科学公司(Tomtec Life Science)、珀金埃尔默公司(Perkin Elmer)和艾诺泰克生物系统国际有限公司(Inotech Biosystems International,Inc)。任何基于细胞的采集器均可以用于本发明方法。在一些实施例中，细胞采集器和/或细胞处理系统是基于膜的细胞采集器。在一些实施例中，通过细胞处理系统，如LOVO系统(由费森尤斯卡比公司制造)进行细胞采集。术语“LOVO细胞处理系统”也指由任何供应商制造的在无菌和/或密闭系统环境中可以将包括细胞的溶液泵送到膜或过滤器(例如，旋转膜或旋转过滤器)，从而允许连续流动并进行细胞处理以在没有沉淀的情况下去除上清液或细胞培养基的任何仪器或装置。在一些实施例中，细胞采集器和/或细胞处理系统可以在密闭无菌的系统中进行细胞分离、洗涤、流体交换、浓缩和/或其它细胞处理步骤。

[0863] 在一些实施例中，在密闭系统生物反应器中进行快速第二扩增，例如根据图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤D。在一些实施例中，如本文所述，采用密闭系统进行TIL扩增。在一些实施例中，采用生物反应器。在一些实施例中，生物反应器用作容器。在一些实施例中，采用的生物反应器为例如G-REX-100或G-REX-500。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-100。在一些实施例中，采用的生物反应器为G-REX-500。

[0864] 在一些实施例中，根据本文所述的工艺进行根据图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤E。在一些实施例中，通过注射器在无菌条件下进入密闭系统以维持系统的无菌性和密闭性。在一些实施例中，采用如本文所述的密闭系统。

[0865] 在一些实施例中，根据本文所述的方法采集TIL。在一些实施例中，使用如本文所述的方法采集第14天与第16天之间的TIL。在一些实施例中，在14天使用如本文所述的方法采集TIL。在一些实施例中，在15天使用如本文所述的方法采集TIL。在一些实施例中，在16天使用如本文所述的方法采集TIL。

[0866] F.步骤F:最终调配物/转移到输注袋

[0867] 在完成如图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中以示例性顺序提供且如以上和本文详细概述的步骤A到E之后，将细胞转移到容器中以用于向患者施用。在一些实施例中，一旦使用以上所述的扩增方法获得治疗上足够数量的TIL，就将其转移到容器中以用于向患者施用。

[0868] 在实施例中，使用本公开的方法扩增的TIL是以药物组合物形式向患者施用。在实施例中，药物组合物是TIL于无菌缓冲液中的悬浮液。如本文所公开来扩增的TIL可以通过如本领域已知的任何合适途径施用。在一些实施例中，TIL以单次动脉内或静脉内输注形式施用，优选地持续大约30到60分钟。其它合适的施用途径包含腹膜内、鞘内和淋巴管内。

[0869] G.PBMC饲养细胞比率

[0870] 在一些实施例中,本文所述的扩增方法(参见例如,图1(具体地,例如图1B和/或图1C))中所使用的培养基包含抗CD3抗体,例如OKT-3。抗CD3抗体与IL-2结合诱导TIL群体中的T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab')2片段可以见到这种效果,其中前者通常是优选的;参见例如Tsoukas等人,《免疫学杂志》1985,135,1719,所述文献特此通过引用整体并入。

[0871] 在实施例中,如下计算PBMC饲养层的数量:

[0872] A.T细胞(10μm直径)的体积:$V=(4/3)\pi r^3=523.6\mu m^3$

[0873] B.具有40μm(4个细胞)高度的G-Rex 100(M)的体积:$V=(4/3)\pi r^3=4\times10^{12}\mu m^3$

[0874] C.填充柱B需要的细胞数:$4\times10^{12}\mu m^3/523.6\mu m^3=7.6\times10^8\mu m^3*0.64=4.86\times10^8$

[0875] D.在4D空间中可以被最佳活化的细胞数:$4.86\times10^8/24=20.25\times10^6$E.外推到G-Rex500的饲养细胞和TIL的数量:TIL:100×10^6以及饲养细胞:2.5×10^9

[0876] 在所述计算中,使用对具有100cm^2底座的圆柱体中的TIL的活化提供二十面体几何形状所需的单核细胞数的近似值。计算得出了用于紧密反映NCI实验数据的T细胞的阈值活化的实验结果为约5×10^8。(1) (C)乘数(0.64)是如由Jaeger和Nagel在1992年计算的等效球体的任意填料密度(2)。(D)除数24是可以接触4维空间"牛顿数(Newton number)"中的类似物体的等效球体的数量(3)。

[0877] (1)Jin,Jianjian等人,人类肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)在可透气烧瓶中生长到患者治疗所需的数量的简化方法(Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes(TIL)in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment).《免疫治疗学杂志》2012年4月;35(3):283-292。

[0878] (2)Jaeger HM,Nagel SR.《颗粒态的物理学(Physics of the granular state)》.《科学》.1992年3月20日;255(5051):1523-31。

[0879] (3)O.R.Musin(2003)."《二十五球体的问题(The problem of the twenty-five spheres)》".《俄罗斯数学调查(Russ.Math.Surv.)》58(4):794-795。

[0880] 在实施例中,在引发第一扩增期间外源供应的抗原呈递饲养细胞的数量是在快速第二扩增期间外源供应的抗原呈递饲养细胞数量的大约二分之一。在某些实施例中,方法包括在包括与快速第二扩增的细胞培养基相比大约少50%的抗原呈递细胞的细胞培养基中进行引发第一扩增。

[0881] 在另一个实施例中,在快速第二扩增期间外源供应的抗原呈递饲养细胞(APC)的数量大于在引发第一扩增期间外源供应的APC数量。

[0882] 在另一个实施例中,在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为20:1的范围。

[0883] 在另一个实施例中,在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为10:1的范围。

[0884] 在另一个实施例中,在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为9:1的范围。

[0885] 在另一个实施例中,在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为8:1的范围。

[0886] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为7:1的范围。

[0887] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为6:1的范围。

[0888] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为5:1的范围。

[0889] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为4:1的范围。

[0890] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC数量与在引发第一扩增期间外源供应的APC数量的比率是选自为或约为1.1:1至为或约为3:1的范围。

[0891] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.9:1的范围。

[0892] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.8:1的范围。

[0893] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.7:1的范围。

[0894] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.6:1的范围。

[0895] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.5:1的范围。

[0896] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.4:1的范围。

[0897] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.3:1的范围。

[0898] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.2:1的范围。

[0899] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.1:1的范围。

[0900] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2:1的范围。

[0901] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为10:1的范围。

[0902] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为5:1的范围。

[0903] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为4:1的范围。

[0904] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为3:1的范围。

[0905] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增

期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.9:1的范围。

[0906] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.8:1的范围。

[0907] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.7:1的范围。

[0908] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.6:1的范围。

[0909] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.5:1的范围。

[0910] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.4:1的范围。

[0911] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.3:1的范围。

[0912] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.2:1的范围。

[0913] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.1:1的范围。

[0914] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率为或约为2:1。

[0915] 在另一个实施例中，在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量与引发第一扩增期间外源供应的APC的数量的比率为或约为1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

[0916] 在另一个实施例中，在引发第一扩增期间外源供应的APC的数量为或约为1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8个APC，并且在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量为或约为3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9个APC。

[0917] 在另一个实施例中，在引发第一扩增期间外源供应的APC的数量选自为或约为1.5×10^8个APC到为或约3×10^8个APC的范围，并且在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量选自为或约为4×10^8个APC到为或约为7.5×10^8个APC的范围。

[0918] 在另一个实施例中，在引发第一扩增期间外源供应的APC的数量选自为或约为2×10^8个APC到为或约2.5×10^8个APC的范围，并且在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量选自为或约为4.5×10^8个APC到为或约为5.5×10^8个APC的范围。

[0919] 在另一个实施例中，在引发第一扩增期间外源供应的APC的数量为或约为2.5×10^8个APC，并且在快速第二扩增期间外源供应的APC的数量为或约为5×10^8个APC。

[0920] 在实施例中，在引发第一扩增的第0天添加的APC(包含例如，PBMC)数量是在引发第一扩增的第7天(例如，方法的第7天)添加的PBMC数量的大约二分之一。在某些实施例中，所述方法包括在引发第一扩增的第0天将抗原呈递细胞添加到第一TIL群体中和在第7天将抗原呈递细胞添加到第二TIL群体中，其中在第0天添加的抗原呈递细胞数量是在引发第一扩增的第7天(例如，方法的第7天)添加的抗原呈递细胞数量的大约50％。

[0921] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)数量大于在引发第一扩增的第0天外源供应的PBMC数量。

[0922] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.0×10^6个APC/cm^2到为或约为4.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0923] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.5×10^6个APC/cm^2到为或约为3.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0924] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以选自为或约为2×10^6个APC/cm^2到为或约为3×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0925] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以为或约为2×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中。

[0926] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以为或约为1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中。

[0927] 在另一个实施例中，将在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2到为或约为7.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0928] 在另一个实施例中，在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2到约6.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0929] 在另一个实施例中，在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2到约5.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0930] 在另一个实施例中，在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0931] 在另一个实施例中，将在快速第二扩增中外源供应的APC以为或约为2.5×10^6个APC/cm^2、2.6×10^6个APC/cm^2、2.7×10^6个APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、$5.8\times$

10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中。

[0932] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以为或约为1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中，并且将在快速第二扩增中外源供应的APC以为或约为2.5×10^6个APC/cm^2、2.6×10^6个APC/cm^2、2.7×10^6个APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中。

[0933] 在另一个实施例中，在引发第一扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.0×10^6个APC/cm^2到为或约为4.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中，并且将在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2到为或约为7.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0934] 在另一个实施例中，在引发第一扩增中外源供应的APC以选自为或约为1.5×10^6个APC/cm^2到为或约为3.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中，并且将在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2到为或约为6×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0935] 在另一个实施例中，在引发第一扩增中外源供应的APC以选自为或约为2×10^6个APC/cm^2到为或约为3×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中，并且将在快速第二扩增中外源供应的APC以选自为或约为4×10^6个APC/cm^2到为或约为5.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种在培养烧瓶中。

[0936] 在另一个实施例中，将在引发第一扩增中外源供应的APC以为或约为2×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中，并且将在快速第二扩增中外源供应的APC以为或约为4×10^6个APC/cm^2的密度接种在培养烧瓶中。

[0937] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的PBMC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为20:1的范围。

[0938] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的PBMC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为10:1的范围。

[0939] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的PBMC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或

约为9:1的范围。

[0940] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为8:1的范围。

[0941] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为7:1的范围。

[0942] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为6:1的范围。

[0943] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为5:1的范围。

[0944] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为4:1的范围。

[0945] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为3:1的范围。

[0946] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.9:1的范围。

[0947] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.8:1的范围。

[0948] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.7:1的范围。

[0949] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.6:1的范围。

[0950] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.5:1的范围。

[0951] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.4:1的范围。

[0952] 在另一个实施例中，在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如，PBMC)的数量的比率选自为或约

为1.1:1到为或约为2.3:1的范围。

[0953] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.2:1的范围。

[0954] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.1:1的范围。

[0955] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2:1的范围。

[0956] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为10:1的范围。

[0957] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为5:1的范围。

[0958] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为4:1的范围。

[0959] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为3:1的范围。

[0960] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.9:1的范围。

[0961] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.8:1的范围。

[0962] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.7:1的范围。

[0963] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.6:1的范围。

[0964] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.5:1的范围。

[0965] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约

为2:1到为或约为2.4:1的范围。

[0966] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.3:1的范围。

[0967] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.2:1的范围。

[0968] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.1:1的范围。

[0969] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率为或约为2:1。

[0970] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量与在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量的比率为或约为1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

[0971] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量为或约为1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8个APC,并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量为或约为3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或**1×10^9个APC(包含例如,PBMC)。**

[0972] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为1×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为3.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围,并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为3.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为1×10^9个APC(包含例如,PBMC)的范围。

[0973] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为1.5×10^8个APC到为或约为3×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围,并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为4×10^8个APC

(包含例如,PBMC)到为或约为7.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围。

[0974] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为1×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为3.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围,并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为3.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为1×10^9个APC(包含例如,PBMC)的范围。

[0975] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为1.5×10^8个APC到为或约为3×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围,并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为4×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为7.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围。

[0976] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为2×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为2.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围,并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量选自为或约为4.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)到为或约为5.5×10^8个APC(包含例如,PBMC)的范围。

[0977] 在另一个实施例中,在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量为或约为2.5×10^8个APC(包含例如,PBMC),并且在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)的数量为或约为5×10^8个APC(包含例如,PBMC)。

[0978] 在一实施例中,在引发第一扩增的第0天添加的APC(包含例如,PBMC)层的数量是在快速第二扩增的第7天添加的APC(包含例如,PBMC)层的数量的大约二分之一。在某些实施例中,所述方法包括在引发第一扩增的第0天将抗原呈递细胞层添加到第一TIL群体中和在第7天将抗原呈递细胞层添加到第二TIL群体中,其中在第0天添加的抗原呈递细胞层的数量是在第7天添加的抗原呈递细胞层的数量的大约50%。

[0979] 在另一个实施例中,在快速第二扩增的第7天外源供应的APC(包含例如,PBMC)层的数量大于在引发第一扩增的第0天外源供应的APC(包含例如,PBMC)层的数量。

[0980] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为2个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为4个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下。

[0981] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为一个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为3个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下。

[0982] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为1.5个细胞层到为或约为2.5个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为3个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下。

[0983] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为一个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为2个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下。

[0984] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3个细胞层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚

度为或约为3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下。

[0985] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为1个细胞层到为或约为2个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为3个细胞层到为或约为10个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下。

[0986] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为2个细胞层到为或约为3个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为4个细胞层到为或约为8个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下。

[0987] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为2个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为4个细胞层到为或约为8个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下。

[0988] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在平均厚度为或约为1个、2个或3个细胞层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在平均厚度为或约为3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个细胞层层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下。

[0989] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:10的范围。

[0990] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:8的范围。

[0991] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:7的范围。

[0992] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:6的范围。

[0993] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:5的范围。

[0994] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:4的范围。

[0995] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:3的范围。

[0996] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:2的范围。

[0997] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.2到为或约为1:8的范围。

[0998] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.3到为或约为1:7的范围。

[0999] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的比率选自为或约为1:1.4到为或约为1:6的范围。

[1000] 在另一个实施例中，引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如，PBMC)层的层叠APC(包含例如，PBMC)的情况下，其中第一数量的APC(包含例如，PBMC)层与第二数量的APC(包含例如，

PBMC)层的比率选自为或约为1:1.5到为或约为1:5的范围。

[1001] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,其中第一数量的APC(包含例如,PBMC)层与第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的比率选自为或约为1:1.6到为或约为1:4的范围。

[1002] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,其中第一数量的APC(包含例如,PBMC)层与第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的比率选自为或约为1:1.7到为或约为1:3.5的范围。

[1003] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,其中第一数量的APC(包含例如,PBMC)层与第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的比率选自为或约为1:1.8到为或约为1:3的范围。

[1004] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,其中第一数量的APC(包含例如,PBMC)层与第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的比率选自为或约为1:1.9到为或约为1:2.5的范围。

[1005] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,其中第一数量的APC(包含例如,PBMC)层与第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的比率为或约为1:2。

[1006] 在另一个实施例中,引发第一扩增的第0天发生在存在第一平均厚度等于第一数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,并且快速第二扩增的第7天发生在存在第二平均厚度等于第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的层叠APC(包含例如,PBMC)的情况下,其中第一数量的APC(包含例如,PBMC)层与第二数量的APC(包含例如,PBMC)层的比率选自为或约为1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

[1007] 在一些实施例中,引发第一扩增中的APC的数量选自约1.0×10^{6}个APC/cm^{2}到约4.5

×10^6个APC/cm^2的范围，并且快速第二扩增中的APC的数量选自约2.5×10^6个APC/cm^2到约7.5×10^6个APC/cm^2的范围。

[1008] 在一些实施例中，引发第一扩增中的APC的数量选自约1.5×10^6个APC/cm^2到约3.5×10^6个APC/cm^2的范围，并且快速第二扩增中的APC的数量选自约3.5×10^6个APC/cm^2到约6.0×10^6个APC/cm^2的范围。

[1009] 在一些实施例中，引发第一扩增中的APC的数量选自约2.0×10^6个APC/cm^2到约3.0×10^6个APC/cm^2的范围，并且快速第二扩增中的APC的数量选自约4.0×10^6个APC/cm^2到约5.5×10^6个APC/cm^2的范围。

[1010] H.任选的细胞培养基组分

[1011] 1.抗CD3抗体

[1012] 在一些实施例中，本文所述的扩增方法(参见例如，图1(具体地，例如图1B和/或图1C))中所使用的培养基包含抗CD3抗体。抗CD3抗体与IL-2结合诱导TIL群体中的T细胞活化和细胞分裂。全长抗体以及Fab和F(ab')2片段可以见到这种效果，其中前者通常是优选的；参见例如Tsoukas等人，《免疫学杂志》1985,135,1719，所述文献特此通过引用整体并入。

[1013] 如本领域的技术人员将了解，存在多种合适的用于本发明的抗人CD3抗体，包含来自各种哺乳动物的抗人CD3多克隆抗体和单克隆抗体，包含但不限于鼠类、人类、灵长类动物、大鼠和犬类抗体。在特定实施例中，使用OKT3抗CD3抗体(可从新泽西州拉里坦的奥梅制药或加利福尼亚州奥本的美天旎生物技术公司商购获得)。

[1014] 表5:莫罗单抗的氨基酸序列(示例性OKT-3抗体)

[1015]

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

[1016] 2．4-1BB(CD137)激动剂

[1017] 在实施例中，引发第一扩增和/或快速第二扩增的细胞培养基包括TNFRSF激动剂。在实施例中，TNFRSF激动剂是4-1BB(CD137)激动剂。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与人类或哺乳动物4-1BB结合的单克隆抗体或融合蛋白。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可以包括免疫球蛋白分子的任何同种型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类别的免疫球蛋白重链。4-1BB激动剂或4-1BB结合分子可以具有重链和轻链两者。如本文所使用的，术语结合分子还包含与4-1BB结合的抗体(包含全长抗体)、单克隆抗体(包含全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、人类、人源化或嵌合抗体和抗体片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达库产生的片段、以上任一种的表位结合片段以及工程化形式的抗体，例如scFv分子。在实施例中，4-1BB激动剂是一种为全人抗体的抗原结合蛋白。在实施例中，4-1BB激动剂是一种为人源化抗体的抗原结合蛋白。在一些实施

例中，用于本公开方法和组合物的4-1BB激动剂包含抗4-1BB抗体、人类抗4-1BB抗体、小鼠抗4-1BB抗体、哺乳动物抗4-1BB抗体、单克隆抗4-1BB抗体、多克隆抗4-1BB抗体、嵌合抗4-1BB抗体、抗4-1BB纤连蛋白、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，以及其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。已知激动性抗4-1BB抗体能诱导较强的免疫应答。Lee等人，《公共科学图书馆·综合(PLOS One)》2013,8,e69677。在优选的实施例中，4-1BB激动剂是激动性抗4-1BB人源化或完全人单克隆抗体(即，源自单细胞系的抗体)。在实施例中，4-1BB激动剂是EU-101(Eutilex有限公司)、乌托米卢单抗或乌瑞鲁单抗，或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。在优选的实施例中，4-1BB激动剂是乌托米卢单抗或乌瑞鲁单抗，或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。

[1018] 在优选的实施例中，4-1BB激动剂或4-1BB结合分子还可以是融合蛋白。在优选的实施例中，与通常具有两个配体结合结构域的激动性单克隆抗体相比，多聚体4-1BB激动剂，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)可以诱导优良的受体(4-1BBL)聚类和内部细胞信号传导复合物形成。包括三个TNFRSF结合结构域和IgG1-Fc并且任选地进一步连接这些融合蛋白中的两个或更多个的三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更大融合蛋白描述于例如Gieffers等人，《分子癌症治疗(Mol.Cancer Therapeutics)》2013,12,2735-47中。

[1019] 已知激动性4-1BB抗体和融合蛋白能诱导较强的免疫应答。在优选的实施例中，4-1BB激动剂是以足以降低毒性的方式与4-1BB抗原特异性结合的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中，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。在一些实施例中，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。在一些实施例中，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。在一些实施例中，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。

[1020] 在一些实施例中，4-1BB激动剂的特征在于以高亲和力和激动性活性与人4-1BB(SEQ ID NO:9)结合。在实施例中，4-1BB激动剂是与人4-1BB(SEQ ID NO:9)结合的结合分子。在实施例中，4-1BB激动剂是与鼠类4-1BB(SEQ ID NO:10)结合的结合分子。表6中汇总了4-1BB激动剂或结合分子所结合的4-1BB抗原的氨基酸序列。

[1021] 表6:4-1BB抗原的氨基酸序列。

[1022]

标识符	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 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL	60 120 180 240 255
SEQ ID NO: 10 鼠类4-1BB，肿瘤坏死因子受体超家族成员9（小家鼠）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS CRCPQEEEGG GGGYEL	60 120 180 240 256

[1023] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约100pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合、以约90pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合、以约80pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合、以约70pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合、以约60pM或更低的K_D与人或鼠类

4-1BB结合、以约50pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合、以约40pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合或以约30pM或更低的K_D与人或鼠类4-1BB结合的4-1BB激动剂。

[1024] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约7.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约7.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约8×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约8.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约9×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约9.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合或以约1×10^6 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类4-1BB结合的4-1BB激动剂。

[1025] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约2×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.1×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.2×10^{-5}1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.3×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.4×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.5×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.6×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合或以约2.7×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.8×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合、以约2.9×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合或以约3×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类4-1BB结合的4-1BB激动剂。

[1026] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约10nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约9nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约8nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约7nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约6nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约5nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约4nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约3nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合、以约2nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合或以约1nM或更低的IC_{50}与人或鼠类4-1BB结合的4-1BB激动剂。

[1027] 在优选的实施例中，4-1BB激动剂是乌托米卢单抗(也称为PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。乌托米卢单抗可从辉瑞公司(Pfizer,Inc.)获得。乌托米卢单抗是免疫球蛋白G2-λ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(完全人类)单克隆抗体。表7中阐述了乌托米卢单抗的氨基酸序列。乌托米卢单抗包括在Asn59和Asn292处的糖基化位点;在位置22-96(V_H-V_L)、143-199(C_H1-C_L)、256-316(C_H2)和362-420(C_H3)处的重链链内二硫桥;在位置22'-87'(V_H-V_L)和136'-195'(C_H1-C_L)处的轻链链内二硫桥;在IgG2A异构体位置218-218、219-219、222-222和225-225处，在IgG2A/B异构体位置218-130、219-219、222-222和225-225处和在IgG2B异构体位置219-130(2)、222-222和225-225处的链间重链-重链二硫桥;以及在IgG2A异构体位置130-213'(2)、IgG2A/B异构体位置218-213'和130-213'处和在IgG2B异构体位置218-213'(2)处的链间重链-轻链二硫桥。乌托米卢单抗和其变体及片段的制备和性质描述于美国专利第8,821,867号;第8,337,850号;和第9,468,678号，以及国际专利申请公开第WO 2012/032433 A1号中，所述专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。乌托米卢单抗的临床前特性描述于Fisher等人，《癌症免疫学与免疫治疗学(Cancer Immunolog.&Immunother.)》2012,61,1721-33。乌托米卢单抗在多种血液和实体瘤适应症中的当前临床试验包含美国国家卫生研究院(U.S.National Institutes of Health)临床试验数据库标识符NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066和NCT02554812。

[1028] 在实施例中,4-1BB激动剂包括由SEQ ID NO:11所给出的重链和由SEQ ID NO:12所给出的轻链。在实施例中,4-1BB激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列的重链和轻链,或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少99%相同的重链和轻链。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少98%相同的重链和轻链。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少97%相同的重链和轻链。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少96%相同的重链和轻链。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列至少95%相同的重链和轻链。

[1029] 在实施例中,4-1BB激动剂包括乌托米卢单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中,4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:13中所示的序列,并且4-1BB激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:14中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少99%相同的V_H和V_L区。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少98%相同的V_H和V_L区。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少97%相同的V_H和V_L区。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少96%相同的V_H和V_L区。在实施例中,4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少95%相同的V_H和V_L区。在实施例中,4-1BB激动剂包括scFv抗体,其包括各自与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少99%相同的V_H和V_L区。

[1030] 在实施例中,4-1BB激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17中所示的序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代,以及具有分别在SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中所示的序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代。

[1031] 在实施例中,4-1BB激动剂是由药物管理机构(drug regulatory authorities)参考乌托米卢单抗批准的4-1BB激动剂生物类似物单克隆抗体。在实施例中,生物类似物单克隆抗体包括4-1BB抗体,其包括与参考药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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品是乌托米卢单抗。在一些实施例中,所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物是被授权或提交授权的4-1BB激动剂抗体,其中4-1BB激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的,其中参考药品或参考生物产品是乌托米卢单抗。4-1BB激动剂抗体可以由药物管理机构(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是乌托米卢单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品

是乌托米卢单抗。

[1032] 表7:与乌托米卢单抗相关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列。

[1033]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 11 乌托米卢单抗的重链	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
SEQ ID NO: 12 乌托米卢单抗的轻链	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
SEQ ID NO: 13 乌托米卢单抗的重链可变区	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO: 14 乌托米卢单抗的轻链可变区	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO: 15 乌托米卢单抗的重链CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO: 16 乌托米卢单抗的重链CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO: 17 乌托米卢单抗的重链CDR3	RGYGIFDY	8
乌托米卢单抗的SEQ ID NO:18轻链CDR1	SGDNIGDQYA H	11
乌托米卢单抗的SEQ ID NO:19轻链CDR2	QDKNRPS	7
乌托米卢单抗的SEQ ID NO:20轻链CDR3	ATYTGFGSLA V	11

[1034] 在优选的实施例中,4-1BB激动剂是单克隆抗体乌瑞鲁单抗(也称为BMS-663513和20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、变体或生物类似物。乌瑞鲁单抗可从百时美施贵宝公司和创造性生物学实验室公司(Creative Biolabs,Inc.)获得。乌瑞鲁单抗是免疫球蛋白G4-κ、抗[智人TNFRSF9(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,4-1BB,T细胞抗原ILA,CD137)]、智人(完全人类)单克隆抗体。表EE中阐述了乌瑞鲁单抗的氨基酸序列。乌瑞鲁单抗包括在位置298(和298″)处的N-糖基化位点;在位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、262-322(C_H2)和368-426(C_H3)处(和在位置22″-95″、148″-204″、262″-322″和368″-426″处)的重链链内二硫桥;在位置23''-88''(V_H-V_L)和136''-196''(C_H1-C_L)处(和在位置23″''-88″''和136″''-196″''处)的轻链链内二硫桥;在位置227-227″和230-230″处的链间重链-重链二硫桥;以及在135-216''和135″-216″''处的链间重链-轻链二硫桥。乌瑞鲁单抗和其变体及片段的制备和性质描述于美国专利第7,288,638号和第8,962,804号中,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。乌瑞鲁单抗的临床前和临床特性描述于Segal等人,《临床癌症研究》2016,可从以下网站获得:http:/dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272。乌瑞鲁单抗在多种血液和实体瘤适应症中的当前临床试验包含美国国家卫生研究院临床试验数据库标识符NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992和NCT01471210。

[1035] 在实施例中,4-1BB激动剂包括由SEQ ID NO:21所给出的重链和由SEQ ID NO:22所给出的轻链。在实施例中,4-1BB激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中

所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少99％相同的重链和轻链。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少98％相同的重链和轻链。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少97％相同的重链和轻链。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少96％相同的重链和轻链。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22中所示的序列至少95％相同的重链和轻链。

[1036] 在实施例中，4-1BB激动剂包括乌瑞鲁单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中，4-1BB激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:23中所示的序列，并且4-1BB激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:24中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少99％相同的V_H和V_L区。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少98％相同的V_H和V_L区。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少97％相同的V_H和V_L区。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少96％相同的V_H和V_L区。在实施例中，4-1BB激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区。在实施例中，4-1BB激动剂包括scFv抗体，其包括各自与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少99％相同的V_H和V_L区。

[1037] 在实施例中，4-1BB激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:27中所示的序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代，以及具有分别在SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30中所示的序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代。

[1038] 在实施例中，4-1BB激动剂是由药物管理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。在实施例中，生物类似物单克隆抗体包括4-1BB抗体，其包括与参考药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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。在一些实施例中，所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物是被授权或提交授权的4-1BB激动剂抗体，其中4-1BB激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的，其中参考药品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。4-1BB激动剂抗体可以由药物管理机构(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品是乌瑞鲁单抗。

[1039] 表8：与乌瑞鲁单抗相关的4-1BB激动剂抗体的氨基酸序列。

[1040]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO:21 乌瑞鲁单抗的重链	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO: 22 乌瑞鲁单抗的轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
SEQ ID NO: 23 乌瑞鲁单抗的可变重链	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
SEQ ID NO: 24 乌瑞鲁单抗的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
SEQ ID NO: 25 乌瑞鲁单抗的重链 CDR1	GYYWS	5
SEQ ID NO: 26 乌瑞鲁单抗的重链 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO: 27 乌瑞鲁单抗的重链 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID NO: 28 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO: 29 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO: 30 乌瑞鲁单抗的轻链 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

[1041] 在实施例中，4-1BB激动剂选自由以下组成的组：1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(赛默飞世尔(Thermo Fisher) MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、由寄存为ATCC号HB-11248并且在美国专利第6,974,863号中公开的细胞系产生的抗体、5F4(BioLegend 31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美国专利申请公开第US 2005/0095244号中公开的抗体、美国专利第7,288,638号中公开的抗体(如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美国专利第6,887,673号中公开的抗体(如4E9或BMS-554271)、美国专利第7,214,493号中公开的抗体、美国专利第6,303,121号中公开的抗体、美国专利第6,569,997号中公开的抗体、美国专利第6,905,685号中公开的抗体(如4E9或BMS-554271)、美国专利第6,362,325号中公开的抗体(如1D8或BMS-469492；3H3或BMS-469497；或3El)、美国专利第6,974,863号中公开的抗体(如53A2)；美国专利第6,210,669号中公开的抗体(如1D8、3B8或3El)、美国专利第5,928,893号中描述的抗体、美国专利第6,303,121号中公开的抗体、美国专利第6,569,997号中公开的抗体、国际专利申请公开第WO 2012/177788号、第WO 2015/119923号和第WO 2010/042433号中公开的抗体和其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物，其中前述专利或专利申请公开中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[1042] 在实施例中，4-1BB激动剂是以下中描述的4-1BB激动性融合蛋白：国际专利申请公开第WO 2008/025516 A1号、第WO 2009/007120 A1号、第WO 2010/003766 A1号、第WO 2010/010051 A1号和第WO 2010/078966 A1号；美国专利申请公开第US 2011/0027218 A1号、第US 2015/0126709 A1号、第US 2011/0111494 A1号、第US 2015/0110734 A1号和第US

2015/0126710 A1号;以及美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519和第8,450460号,所述国际专利申请公开和所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[1043] 在实施例中,如图131中提供的,4-1BB激动剂是如在结构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)中描绘的4-1BB激动性融合蛋白或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。

[1044] 在结构I-A和I-B中,圆柱体是指单独的多肽结合结构域。结构I-A和I-B包括源自例如4-1BBL(4-1BB配体、CD137配体(CD137L)或肿瘤坏死因子超家族成员9(TNFSF9)或与4-1BB结合的抗体的三个线性连接的TNFRSF结合结构域,所述结合结构域折叠以形成三价蛋白质,接着通过IgG1-Fc(包含C_H3和C_H2结构域)连接到第二三价蛋白质,接着用以通过二硫键(小细长卵形)将两个三价蛋白质连接在一起,使所述结构稳定并且提供能够将六个受体的胞内信号传导结构域和信号传导蛋白质聚集在一起以形成信号传导复合物的激动剂。以圆柱体形式表示的TNFRSF结合结构域可以是scFv结构域,其包括例如,由可以包括亲水性残基和具有灵活性的Gly及Ser序列以及具有溶解性的Glu及Lys的连接子连接的V_H和V_L链。可以使用任何scFv结构域设计,如de Marco,《微生物细胞工厂(Microbial Cell Factories)》2011,10,44;Ahmad等人,《临床与发育免疫学(Clin.&Dev.Immunol.)》2012,980250;Monnier等人,《抗体(Antibodies)》,2013,2,193-208;或并入本文中其它地方的参考文献中。这种形式的融合蛋白结构描述于美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519号和第8,450,460号中,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[1045] 表9中给出了结构I-A的其它多肽结构域的氨基酸序列。Fc结构域优选地包括完整恒定结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整铰链结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链结构域的一部分(例如,SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。用于连接C端Fc抗体的优选连接子可以选自在SEQ ID NO:32到SEQ ID NO:41中给出的实施例,包含适用于融合另外的多肽的连接子。

[1046] 表9:具有C端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-A)的TNFRSF激动剂融合蛋白(包含4-1BB激动剂融合蛋白)的氨基酸序列。

[1047]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO: 31 Fc结构域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
SEQ ID NO: 32 连接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO: 33 连接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO: 34 连接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO: 35 连接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO: 36 连接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO: 37 连接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO: 38 连接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO: 39 连接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO: 40 连接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO: 41 连接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

[1048] 表10中给出了结构I-B的其它多肽结构域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段与如在结构I-B中的TNRFSF激动剂融合蛋白的N端融合，则Fc模块的序列优选是在SEQ ID NO:42中所示的序列，并且连接子序列优选地选自在SED ID NO:43到SEQ ID NO:45中所示的那些实施例。

[1049] 表10：具有N端Fc抗体片段融合蛋白设计(结构I-B)的TNFRSF激动剂融合蛋白(包含4-1BB激动剂融合蛋白)的氨基酸序列。

[1050]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 42 Fc结构域	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID NO: 43 连接子	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID NO: 44 连接子	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID NO: 45 连接子	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

[1051] 在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括选自由以下组成的组的一个或多个4-1BB结合结构域：乌托米卢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、乌托米卢单抗的可变重链和可变轻链、选自表10中描述的可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、前述可变重链和可变轻链的任何组合，以及其片段、衍生物、缀合物、变体和生物类似物。

[1052] 在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括包含4-1BBL序列的一个或多个4-1BB结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括包含根据SEQ ID NO:46的序列的一个或多个4-1BB结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括包含可溶性4-1BBL序列的一个或多个4-1BB结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括包含根据SEQ ID NO:47的序列的一个或多个4-1BB结合结构域。

[1053] 在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括一个或多个4-1BB结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括一个或多个4-1BB结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的4-1BB激动剂融合蛋白包括一个或多个4-1BB结合结构域，其是包括各自与表11中给出的V_H和V_L序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。

[1054] 表11：可用作融合蛋白中的4-1BB结合结构域或scFv 4-1BB激动剂抗体的另外的多肽结构域。

[1055]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
SEQ ID NO: 47 4-1BBL 可溶性结构域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
SEQ ID NO: 48 4B4-1-1 版本 1 的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
SEQ ID NO: 49 4B4-1-1 版本 1 的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO: 50 4B4-1-1 版本 2 的可变重链	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
SEQ ID NO: 51 4B4-1-1 版本 2 的可变轻链	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO: 52 H39E3-2 的可变重链	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
SEQ ID NO: 53 H39E3-2 的可变轻链	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

[1056] 在实施例中，4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽，其包括(i)第一可溶性4-1BB结合结构域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性4-1BB结合结构域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性4-1BB结合结构域，进一步包括在N端和/或C端的另外的结构域，并且其中所述另外的结构域是Fab或Fc片段结构域。在实施例中，4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽，其包括(i)第一可溶性4-1BB结合结构域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性4-1BB结合结构域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性4-1BB结合结构域，进一步包括在N端和/或C端的另外的结构域，其中所述另外的结构域是Fab或Fc片段结构域，其中所述可溶性4-1BB结构域中的每一个缺乏茎区(其有助于三聚合并且提供到细胞膜的一定距离，但不是4-1BB结合结构域的一部分)并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度。

[1057] 在实施例中，4-1BB激动剂是4-1BB激动性单链融合多肽，其包括(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子结构域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子结构域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子结构域，其中所述可溶性TNF超家族细胞因子结构域中的每一个缺乏茎区并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度，并且其中每个TNF超家族细胞因子结构域是4-1BB结合结构域。

[1058] 在实施例中，4-1BB激动剂是4-1BB激动性scFv抗体，其包括任何前述V_H结构域与任何前述V_L结构域连接。

[1059] 在实施例中，4-1BB激动剂是BPS Bioscience 4-1BB激动剂抗体目录号79097-2，可从美国加利福尼亚州圣地亚哥的BPS Bioscience(BPS Bioscience,San Diego,CA,USA)商购获得。在一实施例中，4-1BB激动剂是创造性生物学实验室公司4-1BB激动剂抗体目录号MOM-18179，可从美国纽约希尔兰的创造性生物学实验室公司商购获得。

[1060] 3.OX40(CD134)激动剂

[1061] 在实施例中，TNFRSF激动剂是OX40(CD134)激动剂。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与人类或哺乳动物OX40结合的单克隆抗体或融合蛋白。OX40激动剂或OX40结合分子可以包括免疫球蛋白分子的任何同种型(例如，

IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类别的免疫球蛋白重链。OX40激动剂或OX40结合分子可以具有重链和轻链两者。如本文所使用的,术语结合分子还包含与OX40结合的抗体(包含全长抗体)、单克隆抗体(包含全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、人类、人源化或嵌合抗体和抗体片段,例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达库产生的片段、以上任一种的表位结合片段以及工程化形式的抗体,例如scFv分子。在实施例中,OX40激动剂是一种为全人抗体的抗原结合蛋白。在实施例中,OX40激动剂是一种为人源化抗体的抗原结合蛋白。在一些实施例中,用于本公开方法和组合物的OX40激动剂包含抗OX40抗体、人类抗OX40抗体、小鼠抗OX40抗体、哺乳动物抗OX40抗体、单克隆抗OX40抗体、多克隆抗OX40抗体、嵌合抗OX40抗体、抗OX40纤连蛋白、抗OX40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,以及其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。在优选的实施例中,OX40激动剂是激动性抗OX40人源化或完全人单克隆抗体(即,源自单细胞系的抗体)。

[1062] 在优选的实施例中,OX40激动剂或OX40结合分子还可以是融合蛋白。包括与OX40L融合的Fc结构域的OX40融合蛋白描述于例如Sadun等人,《免疫治疗学杂志》,2009,182,1481-89。在优选的实施例中,与通常具有两个配体结合结构域的激动性单克隆抗体相比,多聚体OX40激动剂,如三聚体或六聚体OX40激动剂(具有三个或六个配体结合结构域)可以诱导优良的受体(OX40L)聚类和内部细胞信号传导复合物形成。包括三个TNFRSF结合结构域和IgG1-Fc并且任选地进一步连接这些融合蛋白中的两个或更多个的三聚体(三价)或六聚体(或六价)或更大融合蛋白描述于例如Gieffers等人,《分子癌症治疗(Mol.Cancer Therapeutics)》2013,12,2735-47中。

[1063] 已知激动性OX40抗体和融合蛋白能诱导较强的免疫应答。Curti等人,《癌症研究》2013,73,7189-98。在优选的实施例中,OX40激动剂是以足以降低毒性的方式与OX40抗原特异性结合的单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40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OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施例中,OX40激动剂是消除Fc区功能性的激动性OX40单克隆抗体或融合蛋白。

[1064] 在一些实施例中,OX40激动剂的特征在于以高亲和力和激动性活性与人OX40(SEQ ID NO:54)结合。在实施例中,OX40激动剂是与人OX40(SEQ ID NO:54)结合的结合分子。在实施例中,OX40激动剂是与鼠类OX40(SEQ ID NO:55)结合的结合分子。表12中汇总了OX40激动剂或结合分子所结合的OX40抗原的氨基酸序列。

[1065] 表12:OX40抗原的氨基酸序列。

[1066]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO:54 人OX40 (智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
SEQ ID NO: 55 鼠类OX40 (小家鼠)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

[1067] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约100pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合、以约90pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合、以约80pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合、以约70pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合、以约60pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合、以约50pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合、以约40pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合或以约30pM或更低的K_D与人或鼠类OX40结合的OX40激动剂。

[1068] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约7.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合、以约7.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合、以约8×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合、以约8.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合、以约9×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合、以约9.5×10^5 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合或以约1×10^6 1/M·s或更快的k_{assoc}与人或鼠类OX40结合的OX40激动剂。

[1069] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约2×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.1×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.2×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.3×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.4×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.5×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.6×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合或以约2.7×10^{-5} 1/s或更慢的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.8×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合、以约2.9×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合或以约3×10^{-5} 1/s或更低的k_{dissoc}与人或鼠类OX40结合的OX40激动剂。

[1070] 在一些实施例中，所描述的组合物、工艺和方法包含以约10nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约9nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约8nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约7nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约6nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约5nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约4nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约3nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合、以约2nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合或以约1nM或更低的IC_{50}与人或鼠类OX40结合的OX40激动剂。

[1071] 在一些实施例中，OX40激动剂是他伏利珠单抗，又称为MEDI0562或MEDI-0562。他伏利珠单抗可从阿斯利康公司的医学免疫公司子公司(MedImmune subsidiary of AstraZeneca,Inc.)获得。他伏利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。表13中阐述了他伏利珠单抗的氨基酸序列。他伏利珠单抗包括在位置301和301″处的N-糖基化位点，具有岩藻糖基化复合双触角CHO型聚糖；在位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、265-325(C_H2)和371-429(C_H3)处(和在位置22″-95″、148″-204″、265″-325″和371″-429″处)的重链链内二硫桥；在位置23'-88'(V_H-V_L)和134'-194'(C_H1-C_L)处(和在位置23″'-88″'和134″'-194″'处)的轻链链内二硫桥；在位置230-230″和233-233″处的链间重链-重链二硫桥；以及在224-214'和224″-214″'处的链间重链-轻链二硫桥。他伏利珠单抗在多种实体瘤适应症中的当前临床试验包含美国国家卫生研究院临床试验数据库标识符NCT02318394和NCT02705482。

[1072] 在实施例中，OX40激动剂包括由SEQ ID NO:56所给出的重链和由SEQ ID NO:57所给出的轻链。在实施例中，OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合

物。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少99%相同的重链和轻链。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少98%相同的重链和轻链。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少97%相同的重链和轻链。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少96%相同的重链和轻链。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57中所示的序列至少95%相同的重链和轻链。

[1073] 在实施例中,OX40激动剂包括他伏利珠单抗的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:58中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:59中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少99%相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少98%相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少97%相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少96%相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少95%相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括scFv抗体,其包括各自与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少99%相同的V_H和V_L区。

[1074] 在实施例中,OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62中所示的序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代,以及具有分别在SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65中所示的序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代。

[1075] 在实施例中,OX40激动剂是由药物管理机构参考他伏利珠单抗批准的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在实施例中,生物类似物单克隆抗体包括OX40抗体,其包括与参考药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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品是他伏利珠单抗。在一些实施例中,所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物是被授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中OX40激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的,其中参考药品或参考生物产品是他伏利珠单抗。OX40激动剂抗体可以由药物管理机构(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是他伏利珠单抗。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是他伏利珠单抗。

[1076] 表13:与他伏利珠单抗相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1077]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 56 他伏利珠单抗的重链	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO: 57 他伏利珠单抗的轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO: 58 他伏利珠单抗的重链可变区	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
SEQ ID NO: 59 他伏利珠单抗的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO: 60 他伏利珠单抗的重链 CDR1	GSFSSGYWN	9
SEQ ID NO: 61 他伏利珠单抗的重链 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID NO: 62 他伏利珠单抗的重链 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID NO: 63 他伏利珠单抗的轻链 CDR1	QDISNYLN	8
SEQ ID NO: 64 他伏利珠单抗的轻链 CDR2	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID NO: 65 他伏利珠单抗的轻链 CDR3	QQGSALPW	8

[1078] 在一些实施例中，OX40激动剂是11D4，其是从辉瑞公司获得的全人抗体。11D4的制备和性质描述于美国专利第7,960,515号；第8,236,930号；和第9,028,824号中，所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。表14中阐述了11D4的氨基酸序列。

[1079] 在实施例中，OX40激动剂包括由SEQ ID NO:66所给出的重链和由SEQ ID NO:67所给出的轻链。在实施例中，OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少99％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少98％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少97％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少96％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67中所示的序列至少95％相同的重链和轻链。

[1080] 在实施例中，OX40激动剂包括11D4的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中，OX40激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:68中所示的序列，并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:69中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少99％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少98％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中

所示的序列至少97％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少96％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区。

[1081] 在实施例中，OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72中所示的序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代，以及具有分别在SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75中所示的序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代。

[1082] 在实施例中，OX40激动剂是由药物管理机构参考11D4批准的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在实施例中，生物类似物单克隆抗体包括OX40抗体，其包括与参考药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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品是11D4。在一些实施例中，所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物是被授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中OX40激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的，其中参考药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(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品是11D4。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包括的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品是11D4。

[1083] 表14：与11D4相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1084]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 66 11D4的重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
SEQ ID NO: 67 11D4的轻链	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO: 68 11D4的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO: 69 11D4的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO: 70 11D4的重链CDR1	SYSMN	5
SEQ ID NO: 71 11D4的重链CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO: 72 11D4的重链CDR3	ESGWYLFDY	9
SEQ ID NO: 73 11D4的轻链CDR1	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO: 74 11D4的轻链CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO: 75 11D4的轻链CDR3	QQYNSYPPT	9

[1085] 在一些实施例中，OX40激动剂是18D8，其是从辉瑞公司获得的全人抗体。18D8的制备和性质描述于美国专利第7,960,515号；第8,236,930号；和第9,028,824号中，所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。表15中阐述了18D8的氨基酸序列。

[1086] 在实施例中，OX40激动剂包括由SEQ ID NO:76所给出的重链和由SEQ ID NO:77所给出的轻链。在实施例中，OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列的重链和轻链，或其抗原结合片段、Fab片段、单链可变片段(scFv)、变体或缀合物。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少99％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少98％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少97％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少96％相同的重链和轻链。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:76和SEQ ID NO:77中所示的序列至少95％相同的重链和轻链。

[1087] 在实施例中，OX40激动剂包括18D8的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中，OX40激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:78中所示的序列，并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:79中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少99％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少98％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中

所示的序列至少97％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少96％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区。

[1088] 在实施例中，OX40激动剂包含分别具有SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82中所阐述的序列和其保守氨基酸取代的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及分别具有SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85中所阐述的序列和其保守氨基酸取代的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[1089] 在实施例中，OX40激动剂是由药物管理机构参考18D8批准的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在实施例中，生物类似物单克隆抗体包括OX40抗体，其包括与参考药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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列，其中参考药品或参考生物产品是18D8。在一些实施例中，所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个：糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中，生物类似物是被授权或提交授权的OX40激动剂抗体，其中OX40激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的，其中参考药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(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品是18D8。在一些实施例中，生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供，其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包括的赋形剂相同或不同，其中参考药品或参考生物产品是18D8。

[1090] 表15：与18D8相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1091]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 76 18D8的重链	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO: 77 18D8的轻链	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO: 78 18D8的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO: 79 18D8的轻链可变区	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
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

[1092] 在一些实施例中，OX40激动剂是Hu119-122，其是从葛兰素史克公司(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第9,006,399号和第9,163,085号，以及国际专利公开第WO 2012/027328号中，所述美国专利和所述国际专利公开的公开内容通过引用并入本文。表16中阐述了Hu119-122的氨基酸序列。

[1093] 在实施例中，OX40激动剂包括Hu119-122的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中，OX40激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:86中所示的序列，并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:87中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少99％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少98％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少97％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少96％相同的V_H和V_L区。在实施例中，OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区。

[1094] 在实施例中，OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90中所示的序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代，以及具有分别在SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93中所示的序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代。

[1095] 在实施例中，OX40激动剂是由药物管理机构参考Hu119-122批准的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在实施例中，生物类似物单克隆抗体包括OX40抗体，其包括与参考药

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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品是Hu119-122。在一些实施例中,所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物是被授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中OX40激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的,其中参考药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(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是Hu119-122。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是Hu119-122。

[1096] 表16:与Hu119-122相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1097]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO: 86 Hu119-122的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO: 87 Hu119-122的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO: 88 Hu119-122的重链CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO: 89 Hu119-122的重链CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	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

[1098] 在一些实施例中,OX40激动剂是Hu106-222,其是从葛兰素史克公司获得的人源化抗体。Hu106-222的制备和性质描述于美国专利第9,006,399号和第9,163,085号,以及国际专利公开第WO 2012/027328号中,所述美国专利和所述国际专利公开的公开内容通过引用并入本文。表17中阐述了Hu106-222的氨基酸序列。

[1099] 在实施例中,OX40激动剂包括Hu106-222的重链和轻链CDR或可变区(VR)。在实施例中,OX40激动剂重链可变区(V_H)包括SEQ ID NO:94中所示的序列,并且OX40激动剂轻链可变区(V_L)包括SEQ ID NO:95中所示的序列以及其保守氨基酸取代。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少99％相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少98％相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少97％相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂包括各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少96％相同的V_H和V_L区。在实施例中,OX40激动剂

包括各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区。

[1100] 在实施例中,OX40激动剂包括具有分别在SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98中所示的序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代,以及具有分别在SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100和SEQ ID NO:101中所示的序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域和其保守氨基酸取代。

[1101] 在实施例中,OX40激动剂是由药物管理机构参考Hu106-222批准的OX40激动剂生物类似物单克隆抗体。在实施例中,生物类似物单克隆抗体包括OX40抗体,其包括与参考药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)并且与参考药品或参考生物产品相比包括一个或多个转译后修饰的氨基酸序列,其中参考药品或参考生物产品是Hu106-222。在一些实施例中,所述一个或多个转译后修饰选自以下中的一个或多个:糖基化、氧化、去酰胺化和截短。在一些实施例中,生物类似物是被授权或提交授权的OX40激动剂抗体,其中OX40激动剂抗体是以不同于参考药品或参考生物产品的调配物的调配物提供的,其中参考药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(如美国FDA和/或欧盟EMA)授权。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是Hu106-222。在一些实施例中,生物类似物是以进一步包括一种或多种赋形剂的组合物形式提供,其中所述一种或多种赋形剂与参考药品或参考生物产品中所包含的赋形剂相同或不同,其中参考药品或参考生物产品是Hu106-222。

[1102] 表17:与Hu106-222相关的OX40激动剂抗体的氨基酸序列。

[1103]

标识符	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO: 94 Hu106-222 的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO: 95 Hu106-222 的轻链可变区	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP 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	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO: 99 Hu106-222 的轻链 CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO: 100 Hu106-222 的轻链 CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO: 101 Hu106-222 的轻链 CDR3	QQHYSTPRT	9

[1104] 在一些实施例中,OX40激动剂抗体是MEDI6469(也称为9B12)。MEDI6469是鼠类单克隆抗体。Weinberg等人,《免疫治疗学杂志》2006,29,575-585。在一些实施例中,OX40激动剂是由9B12杂交瘤产生的抗体,所述杂交瘤由Biovest公司(美国马萨诸塞州马尔文)寄存,如Weinberg等人,《免疫治疗学杂志》2006,29,575-585中所描述,所述文献的公开内容通过

引用整体并入本文。在一些实施例中，抗体包括MEDI6469的CDR序列。在一些实施例中，抗体包括MEDI6469的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。

[1105] 在实施例中，OX40激动剂是L106 BD(Pharmingen产品号340420)。在一些实施例中，OX40激动剂包括抗体L106(BD Pharmingen产品号340420)的CDR。在一些实施例中，OX40激动剂包括抗体L106(BD Pharmingen产品号340420)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在实施例中，OX40激动剂是ACT35(圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)，目录号20073)。在一些实施例中，OX40激动剂包括抗体ACT35(圣克鲁斯生物技术公司，目录号20073)的CDR。在一些实施例中，OX40激动剂包括抗体ACT35(圣克鲁斯生物技术公司，目录号20073)的重链可变区序列和/或轻链可变区序列。在实施例中，OX40激动剂是鼠类单克隆抗体抗mCD134/mOX40(克隆OX86)，可从新罕布什尔州西黎巴嫩的BioXcell公司，InVivoMAb(InVivoMAb,BioXcell Inc,West Lebanon,NH)商购获得。

[1106] 在实施例中，OX40激动剂选自以下中描述的OX40激动剂：国际专利申请公开第WO 95/12673号、第WO 95/21925号、第WO 2006/121810号、第WO 2012/027328号、第WO 2013/028231号、第WO 2013/038191号和第WO 2014/148895号；欧洲专利申请EP 0672141；美国专利申请公开第US 2010/136030号、第US 2014/377284号、第US 2015/190506号和第US 2015/132288号(包含克隆20E5和12H3)；以及美国专利第7,504,101号、第7,550,140号、第7,622,444号、第7,696,175号、第7,960,515号、第7,961,515号、第8,133,983号、第9,006,399号和第9,163,085号，所述专利的公开内容通过引用整体并入本文。

[1107] 在实施例中，OX40激动剂是如在结构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)中描绘的OX40激动性融合蛋白，或其片段、衍生物、缀合物、变体或生物类似物。结构I-A和I-B的性质描述于上文以及美国专利第9,359,420号、第9,340,599号、第8,921,519号和第8,450,460号中，所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。表9中给出了结构I-A的多肽结构域的氨基酸序列。Fc结构域优选地包括完整恒定结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸17-230)、完整铰链结构域(SEQ ID NO:31的氨基酸1-16)或铰链结构域的一部分(例如，SEQ ID NO:31的氨基酸4-16)。用于连接C端Fc抗体的优选连接子可以选自在SEQ ID NO:32到SEQ ID NO:41中给出的实施例，包含适用于融合另外的多肽的连接子。同样地，表10中给出了结构I-B的多肽结构域的氨基酸序列。如果Fc抗体片段与如在结构I-B中的TNRFSF融合蛋白的N端融合，则Fc模块的序列优选是在SEQ ID NO:42中所示的序列，并且连接子序列优选地选自在SED ID NO:43到SEQ ID NO:45中所示的那些实施例。

[1108] 在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括选自由以下组成的组的一个或多个OX40结合结构域：他伏利珠单抗的可变重链和可变轻链、11D4的可变重链和可变轻链、18D8的可变重链和可变轻链、Hu119-122的可变重链和可变轻链、Hu106-222的可变重链和可变轻链、选自表17中描述的可变重链和可变轻链的可变重链和可变轻链、前述可变重链和可变轻链的任何组合，以及其片段、衍生物、缀合物、变体和生物类似物。

[1109] 在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括包含OX40L序列的一个或多个OX40结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括包含根据SEQ ID NO:102的序列的一个或多个OX40结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括包含可溶性OX40L序列的一个或多个OX40结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括包含根据SEQ ID NO:103的序列的

一个或多个OX40结合结构域。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括包含根据SEQ ID NO:104的序列的一个或多个OX40结合结构域。

[1110] 在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括一个或多个OX40结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括一个或多个OX40结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括一个或多个OX40结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括一个或多个OX40结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括一个或多个OX40结合结构域，其是包括各自分别与SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95中所示的序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。在实施例中，根据结构I-A或I-B的OX40激动剂融合蛋白包括一个或多个OX40结合结构域，其是包括各自与表14中给出的V_H和V_L序列至少95％相同的V_H和V_L区的scFv结构域，其中V_H和V_L结构域通过连接子连接。

[1111] 表18：可用作融合蛋白中的OX40结合结构域(例如，结构I-A和I-B)或scFv OX40激动剂抗体的另外的多肽结构域。

[1112]

标识符	序列（单字母氨基酸符号）	
SEQ ID NO: 102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
SEQ ID NO: 103 OX40L 可溶性结构域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
SEQ ID NO:104 OX40L 可溶性结构域（替代性）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
SEQ ID NO: 105 008 的可变重链	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO: 106 008 的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108

SEQ ID NO: 107 011 的可变重链	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
SEQ ID NO: 108 011 的可变轻链	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO: 109 021 的可变重链	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO: 110 021 的可变轻链	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO: 111 023 的可变重链	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO: 112 023 的可变轻链	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO: 113 重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
SEQ ID NO: 114 轻链可变区	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO: 115 重链可变区	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
SEQ ID NO: 116 轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO: 117 人源化抗体的重链可变区	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO: 118 人源化抗体的重链可变区	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO: 119 人源化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO: 120 人源化抗体的轻链可变区	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO: 121 人源化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
SEQ ID NO: 122 人源化抗体的重链可变区	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO: 123 人源化抗体的轻链可变区	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
SEQ ID NO: 124 人源化抗体的轻链可变区	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO: 125 重链可变区	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
SEQ ID NO: 126 轻链可变区	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

[1113]

[1114] 在实施例中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包括(i)第一可溶性OX40结合结构域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性OX40结合结构域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性OX40结合结构域,进一步包括在N端和/或C端的另外的结构域,并且其中所述另外的结构域是Fab或Fc片段结构域。在实施例中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包括(i)第一可溶性OX40结合结构域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性OX40结合结构域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性OX40结合结构域,进一步包括在N端和/或C端的另外的结构域,其中所述另外的结构域是Fab或Fc片段结构域,其中所述可溶性OX40结构域中的每一个缺乏茎区(其有助于三聚合并且提供到细胞膜的一定距离,但不是OX40结合

结构域的一部分)并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度。

[1115] 在实施例中,OX40激动剂是OX40激动性单链融合多肽,其包括(i)第一可溶性肿瘤坏死因子(TNF)超家族细胞因子结构域、(ii)第一肽连接子、(iii)第二可溶性TNF超家族细胞因子结构域、(iv)第二肽连接子和(v)第三可溶性TNF超家族细胞因子结构域,其中所述可溶性TNF超家族细胞因子结构域中的每一个缺乏茎区并且第一和第二肽连接子独立地具有3-8个氨基酸的长度,并且其中所述TNF超家族细胞因子结构域是OX40结合结构域。

[1116] 在一些实施例中,OX40激动剂是MEDI6383。MEDI6383是OX40激动性融合蛋白,并且可以如美国专利第6,312,700号中所描述来制备,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[1117] 在实施例中,OX40激动剂是OX40激动性scFv抗体,其包括任何前述V_H结构域与任何前述V_L结构域连接。

[1118] 在实施例中,OX40激动剂是创造性生物学实验室公司OX40激动剂单克隆抗体MOM-18455,可从美国纽约希尔兰的创造性生物学实验室公司商购获得。

[1119] 在一实施例中,OX40激动剂是可从美国加利福尼亚州圣地亚哥的BioLegend公司商购获得的OX40激动抗体克隆Ber-ACT35。

[1120] I.任选的细胞活力分析

[1121] 任选地,细胞活力测定可以在引发第一扩增(有时称为初始本体扩增)之后使用本领域已知的标准测定来进行。

因此,在某些实施例中,所述方法包括在引发第一扩增之后进行细胞活力测定。例如,可以对具有本体TIL的样品进行锥虫蓝排除测定,其选择性地标记死细胞并且允许进行活力评估。用于测试活力的其它测定可以包含但不限于阿尔玛蓝测定(Alamar blue assay);和MTT测定。

[1122] 1.细胞计数、活力、流式细胞术

[1123] 在一些实施例中,测量细胞计数和/或活力。如但不限于CD3、CD4、CD8和CD56以及本文所公开或描述的任何其它的标志物的表达可以通过用抗体(例如但不限于可从BD生物科学公司(加利福尼亚州圣何塞的BD生物科学公司(BD Biosciences,San Jose,CA))商购获得的那些抗体)使用FACSCanto™流式细胞仪(BD生物科学公司)进行流式细胞术来测量。可以使用一次性c芯片血细胞计数器(VWR,伊利诺伊州巴达维亚)对细胞进行人工地计数,并且可以使用本领域已知的任何方法(包含但不限于锥虫蓝染色)来评估活力。还可以基于USSN 15/863,634来测定细胞活力,其通过引用整体并入本文。还可以基于美国专利公开第2018/0280436号或国际专利公开第WO/2018/081473号来测定细胞活力,所述美国专利和国际专利两者均出于所有目的而整体并入本文。

[1124] 在一些情况下,可以使用下文讨论的方案立即低温保存本体TIL群体。可替代地,本体TIL群体可以经受REP并且接着如下文所讨论进行低温保存。类似地,在经基因修饰的TIL将用于疗法的情况下,可以使本体或REP TIL群体进行基因修饰以进行合适的治疗。

[1125] 2.细胞培养物

[1126] 在实施例中,用于扩增TIL的方法(包含以上讨论以及在图1,具体地例如图1B和/或图1C中例示的那些方法)可以包含使用约5,000mL到约25,000mL的细胞培养基、约5,000mL到约10,000mL的细胞培养基或约5,800mL到约8,700mL的细胞培养基。在一些实施例

中,培养基是无血清培养基。在一些实施例中,引发第一扩增中的培养基是无血清的。在一些实施例中,第二扩增中的培养基是无血清的。在一些实施例中,引发第一扩增和第二扩增(也称为快速第二扩增)中的培养基均是无血清的。在实施例中,扩增TIL的数量使用不超过一种类型的细胞培养基。可以使用任何合适的细胞培养基,例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50μM硫酸链霉素和10μM硫酸庆大霉素)细胞培养基(英杰公司(Invitrogen),卡尔斯巴德,加利福尼亚州)。在这方面,本发明方法有利地减少扩增TIL数量所需的培养基数量和培养基类型的量。在实施例中,扩增TIL的数量可以包括以不超过每三天或每四天的频率饲养细胞。在可透气容器中扩增细胞的数量通过降低扩增细胞所必需的饲养频率而简化扩增细胞数量所必需的程序。

[1127] 在实施例中,第一和/或第二可透气容器中的细胞培养基并未过滤。使用未过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量必需的程序。在实施例中,第一和/或第二可透气容器中的细胞培养基缺乏β-巯基乙醇(BME)。

[1128] 在实施例中,所述方法的持续时间包括从哺乳动物获得肿瘤组织样品;将肿瘤组织样品在含有包含IL-2、1X抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第一可透气容器中培养约1到8天,例如约8天的持续时间,作为引发第一扩增;将TIL转移到第二可透气容器,并且在含有包含IL-2、2X抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第二可透气容器中扩增TIL的数量,持续约7到9天,例如约7天、约8天或约9天的持续时间。

[1129] 在实施例中,所述方法的持续时间包括从哺乳动物获得肿瘤组织样品;将肿瘤组织样品在含有包含IL-2、1X抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第一可透气容器中培养约1到7天,例如约7天的持续时间,作为引发第一扩增;将TIL转移到第二可透气容器,并且在含有包含IL-2、2X抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第二可透气容器中扩增TIL的数量,持续约7到9天,例如约7天、约8天或约9天的持续时间。

[1130] 在实施例中,所述方法的持续时间包括从哺乳动物获得肿瘤组织样品;将肿瘤组织样品在含有包含IL-2、1X抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第一可透气容器中培养约1到7天,例如约7天的持续时间,作为引发第一扩增;将TIL转移到第二可透气容器,并且在含有包含IL-2、2X抗原呈递饲养细胞和OKT-3的细胞培养基的第二可透气容器中扩增TIL的数量,持续约7到10天,例如约7天、约8天、约9天或约10天的持续时间。

[1131] 在实施例中,在可透气容器中扩增TIL。已经将可透气容器用于使用PBMC使用本领域已知的方法、组合物和装置,包含描述于美国专利申请公开第2005/0106717A1号中的那些来扩增TIL,所述美国专利申请的公开内容通过引用并入本文。在实施例中,在可透气袋中扩增TIL。在实施例中,使用在可透气袋中扩增TIL的细胞扩增系统,如Xuri细胞扩增系统W25(通用电气医疗集团(GE Healthcare))来扩增TIL。在实施例中,使用在可透气袋中扩增TIL的细胞扩增系统,如WAVE生物反应器系统,又称为Xuri细胞扩增系统W5(通用电气医疗集团)来扩增TIL。在实施例中,细胞扩增系统包含体积选自由以下组成的组的可透气细胞袋:约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L。

[1132] 在实施例中,可以在G-Rex烧瓶(可从威尔森沃尔夫制造公司商购获得)中扩增TIL。此类实施例允许细胞群体从约5×10^5个细胞/cm^2扩增到10×10^6与30×10^6个细胞/cm^2之间。在实施例中,这不需要进料。在实施例中,这不需要进料,只要培养基驻留在G-Rex烧

瓶中的约10cm高度处即可。在实施例中，这不需要进料但需要添加一种或多种细胞因子。在实施例中，细胞因子可以以团注添加而不需要将细胞因子与培养基混合。此类容器、装置和方法是本领域已知的并且已经用于扩增TIL，并且包含以下中所描述的容器、装置和方法：美国专利申请公开第US 2014/0377739A1号、国际公开第WO 2014/210036 A1号、美国专利申请公开第us 2013/0115617 A1号、国际公开第WO 2013/188427 A1号、美国专利申请公开第US 2011/0136228 A1号、美国专利第US 8,809,050 B2号、国际公开第WO 2011/072088 A2号、美国专利申请公开第US 2016/0208216 A1号、美国专利申请公开第US 2012/0244133 A1号、国际公开第WO 2012/129201 A1号、美国专利申请公开第US 2013/0102075 A1号、美国专利第US 8,956,860 B2号、国际公开第WO 2013/173835 A1号、美国专利申请公开第US 2015/0175966 A1号，所述专利的公开内容通过引用并入本文。此类工艺还描述于Jin等人，《免疫治疗学杂志》,2012,35:283-292。

[1133] J.TIL的任选基因工程化

[1134] 在一些实施例中，在扩增步骤之前、期间或之后，包含在各自如本文中所提供的密闭无菌的制造工艺期间进一步操控本发明的扩增TIL，以便以瞬时方式改变蛋白质表达。在一些实施例中，瞬时改变的蛋白质表达归因于瞬时基因编辑。在一些实施例中，本发明的扩增TIL用能够瞬时改变TIL中的蛋白质表达的转录因子(TF)和/或其它分子处理。在一些实施例中，能够瞬时改变蛋白质表达的TF和/或其它分子实现改变的肿瘤抗原表达和/或TIL群体中的肿瘤抗原特异性T细胞数量的改变。

[1135] 在某些实施例中，方法包括基因编辑TIL群体。在某些实施例中，方法包括基因编辑第一TIL群体、第二TIL群体和/或第三TIL群体。

[1136] 在一些实施例中，本发明包含通过核苷酸插入，如通过核糖核酸(RNA)插入进行基因编辑，包含将信使RNA(mRNA)或小(或短)干扰RNA(siRNA)插入到TIL群体中以促进一种或多种蛋白质的表达或抑制一种或多种蛋白质的表达，以及促进一组蛋白质与抑制另一组蛋白质两者的同时组合。

[1137] 在一些实施例中，本发明的扩增TIL经历蛋白质表达的瞬时改变。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第一扩增之前的本体TIL群体中，包含例如在从例如图1(具体地，图1B和图1C)中所示的步骤A获得的TIL群体中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第一扩增期间，包含例如在例如图1(例如，图1B)中所示的步骤B中扩增的TIL群体中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第一扩增之后，包含例如在第一扩增与第二扩增之间的转变中的TIL群体(例如，如本文所述的第二TIL群体)中，从例如步骤B获得并且包含在如图1中所示的步骤C中的TIL群体。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第二扩增之前的本体TIL群体中，包含例如从例如步骤C获得的TIL群体中和在如图1中所示的步骤D中其扩增之前。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第二扩增期间，包含例如在例如图1中所示的步骤D中扩增的TIL群体(例如，第三TIL群体)中。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变发生在第二扩增之后，包含例如在从例如图1中所示的步骤D中的扩增获得的TIL群体中。

[1138] 在实施例中，瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包含电穿孔的步骤。电穿孔方法是本领域已知的并且描述于例如Tsong,《生物物理杂志(Biophys.J.)》1991,60,297-306，以及美国专利申请公开第2014/0227237 A1号中，所述文献和所述美国专利申请中的

每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包含磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面涂层和内吞作用)是本领域已知的并且描述于Graham和van der Eb,《病毒学(Virology)》1973,52,456-467;Wigler等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)》1979,76,1373-1376;以及Chen和Okayarea,《分子细胞生物学(Mol.Cell.Biol.)》1987,7,2745-2752;以及美国专利第5,593,875号中，所述文献和美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包含脂质体转染的步骤。脂质体转染方法，如采用阳离子脂质N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)与二油酰基磷脂酰乙醇胺(dioleoyl phophotidylethanolamine,DOPE)于过滤水中的1:1(w/w)脂质体调配物的方法，是本领域已知的并且描述于Rose等人,《生物技术(Biotechniques)》1991,10,520-525和Felgner等人,《美国国家科学院院刊》,1987,84,7413-7417以及美国专利第5,279,833号;第5,908,635号;第6,056,938号;第6,110,490号;第6,534,484号;和第7,687,070号中，所述文献和美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达的方法包含使用美国专利第5,766,902号;第6,025,337号;第6,410,517号;第6,475,994号;和第7,189,705号;中描述的方法进行转染的步骤，所述美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[1139] 在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致干记忆T细胞(TSCM)增加。TSCM是经历抗原的中央记忆T细胞的早期祖细胞。TSCM通常显示界定干细胞的长期存活、自我更新和多潜能性能力，并且通常对产生有效TIL产物是期望的。TSCM已经示出与过继性细胞转移的小鼠模型中的其它T细胞亚群相比增强的抗肿瘤活性(Gattinoni等人,《自然医学(Nat Med)》2009,2011;Gattinoni,《自然癌症综述(Nature Rev.Cancer)》,2012;Cieri等人,《血液(Blood)》2013)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变产生具有包括高比例TSCM的组合物的TIL群体。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致TSCM百分比增加至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致TIL群体中的TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变产生具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%TSCM的TIL群体。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变产生具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%TSCM的治疗性TIL群体。

[1140] 在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致经历抗原的T细胞再生(rejuvenation)。在一些实施例中，再生包含例如增殖增加、T细胞活化增加和/或抗原识别增加。

[1141] 在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变改变大部分T细胞的表达，以便保存肿瘤源性TCR库。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变不改变肿瘤源性TCR库。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变维持肿瘤源性TCR库。

[1142] 在一些实施例中，蛋白质的瞬时改变导致特定基因的表达改变。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向基因，包含但不限于PD-1(也称为PDCD1或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激性受体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1和/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向选自由以下组成的组的基因:PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(嵌合共刺激性受体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1和/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向PD-1。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向TGFBR2。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR4/5。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CBLB。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CISH。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR(嵌合共刺激性受体)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-2。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-12。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-15。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向IL-21。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向NOTCH 1/2ICD。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向TIM3。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向LAG3。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向TIGIT。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向TGFβ。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR1。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR2。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR4。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCR5。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCR1。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCR2。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CSCR3。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL2(MCP-1)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL3(MIP-1α)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL4(MIP1-β)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL5(RANTES)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCL1。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CXCL8。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL22。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CCL17。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向VHL。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向CD44。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向PIK3CD。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向SOCS1。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变靶向cAMP蛋白激酶A(PKA)。

[1143] 在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致趋化因子受体的增加和/或过度表达。在一些实施例中，通过瞬时蛋白质表达而过度表达的趋化因子受体包含具有配体的受体，所述配体包含但不限于CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22和/或CCL17。

[1144] 在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβR2和/或TGFβ减少和/或表达降低(包含导致例如，TGFβ路径阻塞)。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致CBLB(CBL-B)的减少和/或表达降低。在一些实施例中，蛋白质表

达的瞬时改变导致CISH的减少和/或表达降低。

[1145] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致趋化因子受体的增加和/或过度表达,以便例如改善TIL运输或向肿瘤位点的移动。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致CCR(嵌合共刺激性受体)的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自由以下组成的组的趋化因子受体的增加和/或过度表达:CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2和/或CSCR3。

[1146] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致白介素的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自由以下组成的组的白介素的增加和/或过度表达:IL-2、IL-12、IL-15和/或IL-21。

[1147] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致NOTCH 1/2 ICD的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致VHL的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致CD44的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PIK3CD的增加和/或过度表达。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致SOCS1的增加和/或过度表达。

[1148] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致cAMP蛋白激酶A(PKA)的减少和/或表达降低。

[1149] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自由以下组成的组的分子的减少和/或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)和其组合。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自由以下组成的组的两种分子的减少和/或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)和其组合。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1和选自由以下组成的组的一种分子的减少和/或表达降低:LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)和其组合。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3和其组合的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1和LAG3、CISH、CBLB、TIM3和其组合中的一种的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1和LAG3的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1和CISH的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致PD-1和CBLB的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致LAG3和CISH的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致LAG3和CBLB的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致CISH和CBLB的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致TIM3和PD-1的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致TIM3和LAG3的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致TIM3和CISH的减少和/或表达降低。在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致TIM3和CBLB的减少和/或表达降低。

[1150] 在一些实施例中,将选自由以下组成的组的粘附分子通过γ逆转录病毒或慢病毒方法插入到第一TIL群体、第二TIL群体或采集的TIL群体中(例如,增加了粘附分子的表达):CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1和其组合。

[1151] 在一些实施例中,蛋白质表达的瞬时改变导致选自由以下组成的组的分子的减少和/或表达降低:PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)和其

组合，以及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1和其组合的增加和/或表达增强。在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变导致选自由以下组成的组的分子的减少和/或表达降低：PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB和其组合，以及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1和其组合的增加和/或表达增强。

[1152] 在一些实施例中，表达减低为约5％、约10％、约10％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低为至少约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低为至少约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低为至少约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低为至少约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达降低为至少约80％。在一些实施例中，表达降低为至少约85％。在一些实施例中，表达降低为至少约90％。在一些实施例中，表达降低为至少约95％。在一些实施例中，表达降低为至少约99％。

[1153] 在一些实施例中，表达增加为约5％、约10％、约10％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达增加为至少约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达增加为至少约75％、约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达增加为至少约80％、约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达增加为至少约85％、约90％或约95％。在一些实施例中，表达增加为至少约80％。在一些实施例中，表达增加为至少约85％。在一些实施例中，表达增加为至少约90％。在一些实施例中，表达增加为至少约95％。在一些实施例中，表达增加为至少约99％。

[1154] 在一些实施例中，通过用转录因子(TF)和/或能够瞬时改变TIL中的蛋白质表达的其它分子处理TIL来诱导蛋白质表达的瞬时改变。在一些实施例中，SQZ无载体微流体平台用于胞内递送转录因子(TF)和/或能够瞬时改变蛋白质表达的其它分子。已经描述了表明将蛋白质(包含转录因子)递送到各种初始人类细胞(包含T细胞)的能力的这类方法(Sharei等人，《美国国家科学院院刊》2013，以及Sharei等人，《公共科学图书馆综合》2015和Greisbeck等人，《免疫学杂志》第195卷，2015)；参见例如国际专利公开WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1和WO 2017/123663A1，所有所述文献和专利均通过引用整体并入本文。如国际专利公开WO 2013/059343A1、WO 2017/008063A1和WO 2017/123663A1中描述的这类方法可以用于本发明以便将TIL群体暴露于转录因子(TF)和/或能够诱导瞬时蛋白质表达的其它分子，其中所述TF和/或能够诱导瞬时蛋白质表达的其它分子实现增加的肿瘤抗原表达和/或TIL群体中的肿瘤抗原特异性T细胞数量的增加，从而引起TIL群体的重新编程以及与非重新编程的TIL群体相比重新编程TIL群体的功效增加。在一些实施例中，重新编程导致效应T细胞和/或中央记忆T细胞相对于TIL的起始或先前群体(即，在重新编程之前)群体的亚群增加，如本文所述。

[1155] 在一些实施例中，转录因子(TF)包含但不限于TCF-1、NOTCH 1/2 ICD和/或MYB。在一些实施例中，转录因子(TF)是TCF-1。在一些实施例中，转录因子(TF)是NOTCH 1/2 ICD。在一些实施例中，转录因子(TF)是MYB。在一些实施例中，将转录因子(TF)与诱导性多能干细胞培养物(iPSC)(如可商购获得的基因敲除血清替代物(Gibco/赛默飞世尔)一起施用，以诱导另外的TIL重新编程。在一些实施例中，将转录因子(TF)与iPSC混合物一起施用以诱

导另外的TIL重新编程。在一些实施例中，在没有iPSC混合物的情况下施用转录因子(TF)。在一些实施例中，重新编程导致TSCM的百分比增加。在一些实施例中，重新编程导致TSCM的百分比增加约5％、约10％、约10％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％或约95％TSCM。

[1156] 在一些实施例中，如上文所述，瞬时改变蛋白质表达的方法可以与对TIL群体进行基因修饰的方法组合，所述对TIL群体进行基因修饰的方法包含稳定并入基因以用于产生一种或多种蛋白质的步骤。在某些实施例中，所述方法包括对TIL群体进行基因修饰的步骤。在某些实施例中，所述方法包括对第一TIL群体、第二TIL群体和/或第三TIL群体进行基因修饰。在一实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含逆转录病毒转导的步骤。在一实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统是本领域已知的并且描述于例如Levine等人，《美国国家科学院院刊》2006,103,17372-77；Zufferey等人，《自然·生物技术(Nat.Biotechnol.)》1997,15,871-75;Dull等人，《病毒学杂志(J.Virology)》1998,72,8463-71，以及美国专利第6,627,442号中，所述文献和专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含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并且描述于例如Cepko和Pear，《现代分子生物学实验指南(Cur.Prot.Mol.Biol.)》1996,9.9.1-9.9.16中，所述文献的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统是本领域已知的并且包含以下系统：其中转座酶是以DNA表达载体形式或以可表达的RNA或蛋白质形式提供以使得转基因细胞中不发生转座酶的长期表达，例如，以mRNA(例如，包括帽和poly-A尾部的mRNA)形式提供的转座酶。包含鲑科鱼型Tel样转座酶(睡美人转座酶(SB/Sleeping Beauty transposase))，如SB10、SB11和SB100x的合适转座子介导的基因转移系统，和具有增加酶促活性的工程化酶描述于例如Hackett等人，《分子疗法(Mol.Therapy)》2010,18,674-83和美国专利第6,489,458号中，所述文献和美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[1157] 在一些实施例中，蛋白质表达的瞬时改变是由自递送RNA干扰(sdRNA)诱导的表达降低，所述RNA干扰是具有高百分比的2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)的化学合成的不对称siRNA双螺旋体，其包括20个核苷酸反义(引导)链和在其3'端使用四乙二醇(tetraethylenglycol,TEG)连接子与胆固醇缀合的13到15个碱基有义(过客(passenger))链。在一些实施例中，所述方法包括瞬时改变TIL群体中的蛋白质表达，包括使用自递送RNA干扰(sdRNA)，所述RNA干扰是具有高百分比的2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)的化学合成的不对称siRNA双螺旋体，其包括20个核苷酸反义(引导)链和在其3'端使用四乙二醇(TEG)连接子与胆固醇缀合的13到15个碱基有义(过客)链。使用sdRNA的方法已经描述于Khvorova和Watts，《自然·生物技术》2017,35,238-248;Byrne等人，《眼部药理学与治疗学杂志(J.Ocul.Pharmacol.Ther.)》2013,29,855-864;和Ligtenberg等人，《分子疗法》2018(印刷中)中，所述文献的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，在不使用电穿孔、SQZ或其它方法的情况下，替代地使用1到3天时间段来完成将sdRNA递送到TIL群体，其中将TIL群体以1μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在某些实施例中，方法包括将sdRNA递送到TIL群体，包括将TIL群体以1μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA，持续1到3天之间的时间段。在实施例中，将sdRNA递送到TIL群体是使用1到3天时间段来完成，其中将

TIL群体以10μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在实施例中,将sdRNA递送到TIL群体是使用1到3天时间段来完成,其中将TIL群体以50μM/10,000个TIL的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在实施例中,将sdRNA递送到TIL群体是使用1到3天时间段来完成,其中将TIL群体以0.1μM/10,000个TIL与50μM/10,000个TIL之间的浓度暴露于培养基中的sdRNA。在实施例中,将sdRNA递送到TIL群体是使用1到3天时间段来完成,其中将TIL群体以0.1μM/10,000个TIL与50μM/10,000个TIL之间的浓度暴露于培养基中的sdRNA,其中通过向培养基中添加新鲜sdRNA来使暴露于sdRNA进行两次、三次、四次或五次。其它合适的工艺描述于例如美国专利申请公开第US 2011/0039914 A1号、第US 2013/0131141 A1号和第US 2013/0131142 A1号以及美国专利第9,080,171号中,所述美国专利申请和美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[1158] 在一些实施例中,在制造期间将sdRNA插入到TIL群体中。在一些实施例中,sdRNA编码干扰NOTCH 1/2ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP蛋白激酶A(PKA)、BAFF BR3、CISH和/或CBLB的RNA。在一些实施例中,基于基因沉默的百分比,例如如由流式细胞术和/或qPCR所评估来确定表达的降低。在一些实施例中,表达减低为约5%、约10%、约10%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低为至少约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低为至少约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低为至少约80%、约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低为至少约85%、约90%或约95%。在一些实施例中,表达降低为至少约80%。在一些实施例中,表达降低为至少约85%。在一些实施例中,表达降低为至少约90%。在一些实施例中,表达降低为至少约95%。在一些实施例中,表达降低为至少约99%。

[1159] 基于化学修饰的siRNA的可自递送RNAi技术可以用于本发明的方法,以成功地将sdRNA递送到如本文所述的TIL。具有不对称siRNA结构的主链修饰和疏水性配体的组合(参见例如,Ligtenberg等人,《分子疗法》,2018和US20160304873)允许sdRNA在无需另外的调配物和方法的情况下通过简单添加到培养基中,利用sdRNA的核酸酶稳定性来渗透培养的哺乳动物细胞。这种稳定性允许仅仅通过维持sdRNA在培养基中的活性浓度来支持恒定水平的RNAi介导的靶基因活性降低。尽管不受理论束缚,但sdRNA的主链稳定实现基因表达效应的扩展降低,其可以在非分裂细胞中持续数月。

[1160] 在一些实施例中,发生超过95%的TIL转染效率和各种特定sdRNA对靶标的表达降低。在一些实施例中,用经完全修饰的序列替换含有若干未经修饰的核糖残基的sdRNA,以增加RNAi效应的效力和/或长久性。在一些实施例中,表达效应的降低维持12小时、24小时、36小时、48小时、5天、6天、7天或8天或更久。在一些实施例中,表达效应的降低在TIL的sdRNA处理后的10天或更长时间减小。在一些实施例中,维持靶标表达的表达降低超过70%。在一些实施例中,通过TIL维持靶标表达的表达降低超过70%。在一些实施例中,PD-1/PD-L1路径中的表达降低允许TIL展现更有效的体内效果,这在一些实施例中是由于避免了PD-1/PD-L1路径的抑制作用。在一些实施例中,通过sdRNA的PD-1的表达降低导致TIL增殖增加。

[1161] 小干扰RNA(siRNA)(有时称为短干扰RNA或沉默RNA)是双链RNA分子,长度通常为

19-25个碱基对。siRNA用于RNA干扰(RNAi)中,其中其干扰具有互补核苷酸序列的特定基因的表达。

[1162] 双链DNA(dsRNA)通常可以用于定义包括一对互补RNA链(通常是有义(过客)和反义(引导)链)的任何分子,并且可以包含单链突出区。与siRNA相比,术语dsRNA通常是指包含siRNA分子的序列的前体分子,所述siRNA分子通过裂解酶系统(包含切丁酶(Dicer))的作用而从较大dsRNA分子释放。

[1163] sdRNA(可自递送的RNA)是新类别的经共价修饰的RNAi化合物,其与传统siRNA相比不需要递送媒剂进入细胞且具有改进的药理学。"可自递送的RNA"或"sdRNA"是经疏水性修饰的RNA干扰-反义杂交体,证实其在体外初始细胞中和体内局部施用后均为高度有效的。已证实稳固吸收和/或沉默而无毒性。sdRNA通常是具有最小双链区的不对称的经化学修饰的核酸分子。sdRNA分子通常含有单链区和双链区,并且可以在分子的单链区和双链区两者内含有各种化学修饰。另外,sdRNA分子可以连接到疏水性缀合物,例如常规和高级固醇型分子,如本文所述。sdRNA和用于制造此类sdRNA的相关方法也已经广泛描述于例如US20160304873、WO 2010033246、WO 2017070151、WO 2009102427、WO 2011119887、WO 2010033247A2、WO 2009045457、WO 2011119852中,所有所述文献均出于所有目的通过引用整体并入本文。为了优化sdRNA结构、化学反应、靶向位置、序列偏好等,开发了专有算法并且将其用于sdRNA效力预测(参见例如,US 20160304873)。基于这些分析,通常将功能性sdRNA序列定义为在1μM浓度下表达降低超过70%,其中概率超过40%。

[1164] 在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低70%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低75%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低80%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低85%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低90%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低95%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列展现靶基因的表达降低99%。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.25μM到约4μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.25μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约0.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.25μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约1.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.25μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约2.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约3.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中,用于本发明中的sdRNA序列在以约3.25μM的浓度递送时展现靶

基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约3.5μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约3.75μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。在一些实施例中，用于本发明中的sdRNA序列在以约4.0μM的浓度递送时展现靶基因的表达降低。

[1165] 在一些实施例中，寡核苷酸试剂包括一种或多种修饰以增加治疗剂的稳定性和/或有效性，并且实现将寡核苷酸有效递送到待治疗的细胞或组织。此类修饰可以包含2'-O-甲基修饰、2'-O-氟修饰、二硫代磷酸酯修饰、2'F修饰的核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸和/或2'脱氧核苷酸。在一些实施例中，修饰寡核苷酸以包含一种或多种疏水性修饰，包含例如固醇、胆固醇、维生素D、萘基、异丁基、苯甲基、吲哚、色氨酸和/或苯基。在另外的特定实施例中，经化学修饰的核苷酸是硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'脱氧、疏水性修饰和硫代磷酸酯的组合。在一些实施例中，糖可以被修饰并且经修饰的糖可以包含但不限于D-核糖、2'-O-烷基(包含2'-O-甲基和2'-O-乙基)(即，2'-烷氧基)、2'-氨基、2'-S-烷基、2'-卤基(包含2'-氟)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基(-$OCH_2CH=CH_2$)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基和氰基等。在一个实施例中，糖部分可以己糖并且并入到如所描述的寡核苷酸中(Augustyns,K.等人,《核酸研究(Nucl.Acids.Res.)》18:4711(1992))。

[1166] 在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上是双链的，即，在分子的任一端不具有突出单链序列，即是平末端的。在一些实施例中，个别核酸分子可以具有不同长度。换句话说，本发明的双链寡核苷酸在其整个长度上不是双链的。例如，当使用两个分开的核酸分子时，分子中的一个(例如，包括反义序列的第一分子)可以长于与其杂交的第二分子(留下单链分子的一部分)。在一些实施例中，当使用单个核酸分子时，在任一端处的分子的一部分可以保持单链。

[1167] 在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸含有错配和/或环或凸出，但在寡核苷酸长度的至少约70％上是双链的。在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸长度的至少约80％上是双链的。在另一个实施例中，本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸长度的至少约90％-95％上是双链的。在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸在寡核苷酸长度的至少约96％-98％上是双链的。在一些实施例中，本发明的双链寡核苷酸含有至少或至多1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个错配。

[1168] 在一些实施例中，可以例如通过修饰3'或5'键来基本上保护寡核苷酸免受核酸酶影响(例如，美国专利第5,849,902号和WO 98/13526)。例如，可以通过掺合“封端基团”而使寡核苷酸具有抗性。如本文中所使用的术语“封端基团”是指可以作为用于合成的保护基或偶合基团(例如，FITC、丙基(CH_2-CH_2-CH_3)、乙二醇(-O-CH_2-CH_2-O-)磷酸酯(PO_3^{2-})、氢膦酸酯或氨基亚磷酸酯)连接到寡核苷酸或核单体的取代基(例如，除了OH基团之外)。“封端基团”还可以包含“末端封端基团”或“核酸外切酶封端基团”，其保护寡核苷酸的5'和3'端，包含经修饰的核苷酸和非核苷酸核酸外切酶抗性结构。

[1169] 在一些实施例中，sdRNA内的连续多核苷酸的至少一部分是通过取代键，例如硫代磷酸酯键连接。

[1170] 在一些实施例中，化学修饰可以导致细胞吸收增强至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、

300、325、350、375、400、425、450、475、500。在一些实施例中，C或U残基中的至少一个包含疏水性修饰。在一些实施例中，多个C和U含有疏水性修饰。在一些实施例中，至少10％、15％、20％、30％、40％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％或至少95％的C和U可以含有疏水性修饰。在一些实施例中，所有C和U均含有疏水性修饰。

[1171] 在一些实施例中，sdRNA或sd-rxRNA通过并入可质子化胺而展现增强的sd-rxRNA分子的核内体释放。在一些实施例中，将可质子化胺并入于有义链中(在RISC装载之后丢弃的分子的一部分中)。在一些实施例中，本发明的sdRNA化合物包括不对称化合物，所述不对称化合物包括(具有10-15个碱基长的有效RISC进入所需的)双螺旋体区和4-12个核苷酸长的单链区；具有13个核苷酸双螺旋体。在一些实施例中，采用6个核苷酸单链区。在一些实施例中，sdRNA的单链区包括2-12个硫代磷酸酯核苷酸间键(称为硫代磷酸酯修饰)。在一些实施例中，采用6-8个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一些实施例中，本发明的sdRNA化合物还包含独特的化学修饰模式，其提供稳定性并且与RISC进入相容。

[1172] 例如，引导链还可以通过任何化学修饰进行修饰，所述化学修饰在不干扰RISC进入的情况下确认稳定性。在一些实施例中，引导链中的化学修饰模式包含大部分的C和U核苷酸被2'F修饰并且5'端被磷酸化。

[1173] 在一些实施例中，sdRNA或sd-rxRNA中至少30％的核苷酸被修饰。在一些实施例中，在sdRNA或sd-rxRNA中至少30％、31％、32％、33％、34％、35％、36％、37％、38％、39％、40％、41％、42％、43％、44％、45％、46％、47％、48％、49％、50％、51％、52％、53％、54％、55％、56％、57％、58％、59％、60％、61％、62％、63％、64％、65％、66％、67％、68％、69％、70％、71％、72％、73％、74％、75％、76％、77％、78％、79％、80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的核苷酸被修饰。在一些实施例中，sdRNA或sd-rxRNA中的100％的核苷酸被修饰。

[1174] 在一些实施例中，sdRNA分子具有最小双链区。在一些实施例中，双链的分子的区域在8-15个核苷酸长的范围内。在一些实施例中，双链的分子的区域为8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个核苷酸长。在一些实施例中，双链区为13个核苷酸长。在引导链与过客链之间可能存在100％互补，或在引导链与过客链之间可能存在一个或多个错配。在一些实施例中，在双链分子的一端，分子是平末端的或具有一个核苷酸突出。在一些实施例中，分子的单链区介于4-12个核苷酸长之间。在一些实施例中，单链区可以为4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个或12个核苷酸长。在一些实施例中，单链区还可以小于4个或大于12个核苷酸长。在某些实施例中，单链区为6个或7个核苷酸长。

[1175] 在一些实施例中，sdRNA分子具有增加的稳定性。在一些情况下，经化学修饰的sdRNA或sd-rxRNA分子在培养基中的半衰期比1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超过24小时(包含任何中间值)更长。在一些实施例中，sd-rxRNA在培养基中的半衰期比12小时更长。

[1176] 在一些实施例中，针对增加的效力和/或降低的毒性优化sdRNA。在一些实施例中，引导链和/或过客链的核苷酸长度和/或引导链和/或过客链中硫代磷酸酯修饰的数量可以在一些方面影响RNA分子的效力，而用2'-O-甲基(2'OMe)修饰替换2'-氟(2'F)修饰可以在一些方面影响分子的毒性。在一些实施例中，预测分子的2'F含量降低以降低分子的毒性。在一些实施例中，RNA分子中的硫代磷酸酯修饰的数量可以影响分子到细胞中的吸收，例如

将分子被动吸收到细胞中的效率。在一些实施例中，sdRNA不具有2'F修饰，但其特征在于在细胞吸收和组织渗透方面的功效相同。

[1177] 在一些实施例中，引导链的长度为大约18-19个核苷酸并且具有大约2-14个磷酸酯修饰。例如，引导链可以含有2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或超过14个磷酸酯修饰的核苷酸。引导链可以含有一种或多种修饰，其赋予增加的稳定性而不干扰RISC进入。磷酸酯修饰的核苷酸(例如，硫代磷酸酯修饰的核苷酸)可以位于3'端、5'端或分散在整个引导链中。在一些实施例中，引导链的3'末端10个核苷酸含有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个硫代磷酸酯修饰的核苷酸。引导链还可以含有2'F和/或2'OMe修饰，其可以位于整个分子中。在一些实施例中，在引导链中的一个位置的核苷酸(在引导链的最接近5'位置的核苷酸)被2'OMe修饰和/或磷酸化。引导链内的C和U核苷酸可以被2'F修饰。例如，在19nt引导链的位置2-10(或不同长度的引导链中的对应位置)的C和U核苷酸可以被2'F修饰。引导链内的C和U核苷酸还可以被2'OMe修饰。例如，在19nt引导链的位置11-18(或不同长度的引导链中的对应位置)的C和U核苷酸可以被2'OMe修饰。在一些实施例中，在引导链的最接近3'端的核苷酸未经修饰。在某些实施例中，引导链内的大部分C和U被2'F修饰，并且引导链的5'端被磷酸化。在其它实施例中，位置1和在位置11-18的C或U被2'OMe修饰，并且引导链的5'端被磷酸化。在其它实施例中，位置1和在位置11-18的C或U被2'OMe修饰，引导链的5'端被磷酸化，并且在位置2-10的C或U被2'F修饰。

[1178] 可自递送的RNAi技术提供一种用RNAi药剂直接转染细胞而不需要另外的调配物或技术的方法。转染难以转染的细胞系的能力、高体内活性和简单使用是相对于传统的基于siRNA的技术呈现显著功能优势的组合物和方法的特征，并且如此在与本发明的TIL中的靶基因的表达降低的方法有关的若干实施例中采用sdRNA方法。sdRNAi方法允许将化学合成的化合物直接递送到广泛范围的初始细胞和组织(离体和体内两者)。本文在本发明的一些实施例中描述的sdRNA可从美国马萨诸塞州伍斯特市的Advirna公司(Advirna LLC,Worcester,MA,USA)商购获得。

[1179] sdRNA形成为经疏水性修饰的siRNA-反义寡核苷酸杂交结构，并且公开于例如Byrne等人，2013年12月，《眼部药理学与治疗学杂志》，29(10):855-864中，所述文献通过引用并入本文。

[1180] 在一些实施例中，可以使用无菌电穿孔将sdRNA寡核苷酸递送到本文所述的TIL。在某些实施例中，方法包括对TIL群体进行无菌电穿孔以递送sdRNA寡核苷酸。

[1181] 在一些实施例中，可以将寡核苷酸与跨膜递送系统组合递送到细胞。在一些实施例中，这种跨膜递送系统包括脂质、病毒载体等。在一些实施例中，寡核苷酸试剂是不需要任何递送药剂的自递送RNAi药剂。在某些实施例中，方法包括使用跨膜递送系统将sdRNA寡核苷酸递送到TIL群体。

[1182] 将寡核苷酸和寡核苷酸组合物与本文所述的TIL接触(例如，使与其接触，在本文中也称为向其施用或递送)并且由TIL吸收，包含通过TIL的被动吸收。可以在第一扩增(例如，步骤B)期间、在第一扩增之后(例如，在步骤C期间)、在第二扩增之前或期间(例如，在步骤D之前或期间)、在步骤D之后和在步骤E中的采集之前、在步骤F中的采集期间或之后、在步骤F中最终调配和/或转移到输注袋之前或期间以及在步骤F中的任何任选的低温保存步骤之前将sdRNA添加到如本文所述的TIL中。此外，可以在从步骤F中的任何低温保存步骤解

冻之后添加sdRNA。在一实施例中，可以将一种或多种靶向如本文所述的基因(包含PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA以选自由以下组成的组的浓度添加到包括TIL和其它药剂的细胞培养基中：100nM到20mM、200nM到10mM、500nm到1mM、1μM到100μM和1μM到100μM。在实施例中，可以将如本文所述的一种或多种靶向基因(包含PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA以选自由以下组成的组的量添加到包括TIL和其它药剂的细胞培养基中：0.1μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、0.5μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、0.75μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、1μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、1.25μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、1.5μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、2μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基、5μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基或10μM sdRNA/10,000个TIL/100μL培养基。在实施例中，可以在REP前或REP期期间一天两次、一天一次、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天或每七天将如本文所述的一种或多种靶向基因(包含PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH和CBLB)的sdRNA添加到TIL培养物中。

[1183] 本发明的寡核苷酸组合物(包含sdRNA)可以在扩增工艺期间，例如通过将高浓度的sdRNA溶解于细胞培养基中并且允许足够的时间进行被动吸收来与如本文所述的TIL接触。在某些实施例中，本发明方法包括使TIL群体与如本文所述的寡核苷酸组合物接触。在某些实施例中，方法包括将寡核苷酸(例如，sdRNA)溶解于细胞培养基中并且使细胞培养基与TIL群体接触。TIL可以是如本文所述的第一群体、第二群体和/或第三群体。

[1184] 在一些实施例中，可以通过合适的技术识别方法(包含磷酸钙、DMSO、甘油或葡聚糖)、电穿孔法或通过使用本领域已知的方法转染(例如，使用阳离子、阴离子或中性脂质组合物或脂质体)来增强寡核苷酸到细胞中的递送(参见例如，WO 90/14074;WO 91/16024;WO 91/17424;美国专利第4,897,355号;Bergan等人1993.《核酸研究》21:3567)。

[1185] 在一些实施例中，使用超过一个sdRNA来减少靶基因的表达。在一些实施例中，将靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH的sdRNA中的一个或多个一起使用。在一些实施例中，PD-1sdRNA与TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH中的一个或多个一起使用以减少超过一种基因靶标的表达。在一些实施例中，LAG3 sdRNA与靶向CISH的sdRNA组合使用以减少两种靶标的基因表达。在一些实施例中，本文中的靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3和/或CISH中的一个或多个的sdRNA可从美国马萨诸塞州伍斯特的Advirna公司商购获得。

[1186] 在一些实施例中，sdRNA靶向选自以下组成的组的基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其组合。在一些实施例中，sdRNA靶向选自以下组成的组的基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其组合。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1，并且另一个sdRNA靶向选自以下组成的组的基因：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其组合。在一些实施例中，sdRNA靶向选自以下的基因：PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3及其组合。在一些实施例中，sdRNA靶向选自PD-1以及LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其组合中的一个的基因。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1，并且一个sdRNA靶向LAG3。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1，并且一个sdRNA靶向CISH。在一些实施例中，一个sdRNA靶向PD-1，并且一个sdRNA靶向CBLB。在一些实施例中，一个sdRNA靶向LAG3，并且一个sdRNA靶向CISH。在一些实施例中，一个sdRNA靶向LAG3，并且一个sdRNA靶向CBLB。在一些实施例中，一个sdRNA靶向CISH，并且一个sdRNA靶向CBLB。在一些实施例中，一个sdRNA靶向TIM3，并且一个sdRNA靶向PD-1。在一些实

施例中，一个sdRNA靶向TIM3，并且一个sdRNA靶向LAG3。在一些实施例中，一个sdRNA靶向TIM3，并且一个sdRNA靶向CISH。在一些实施例中，一个sdRNA靶向TIM3，并且一个sdRNA靶向CBLB。

[1187] 如以上所讨论的，本发明的实施例提供已经通过基因编辑进行基因修饰以增强其治疗作用的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。本发明的实施例包含通过核苷酸插入(RNA或DNA)到TIL群体中的基因编辑，以促进一种或多种蛋白质的表达并且抑制一种或多种蛋白质的表达，以及其组合。本发明的实施例还提供用于将TIL扩增成治疗性群体的方法，其中所述方法包括对TIL进行基因编辑。存在可以用于对TIL群体进行基因修饰的若干种基因编辑技术，其适合于根据本发明使用。

[1188] 在一些实施例中，所述方法包括对TIL群体进行基因修饰的方法，其包含稳定并入用于产生一种或多种蛋白质的基因的步骤。在一实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含逆转录病毒转导的步骤。在一实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含慢病毒转导的步骤。慢病毒转导系统是本领域已知的并且描述于例如Levine等人，《美国国家科学院院刊》2006,103,17372-77；Zufferey等人，《自然·生物技术》1997,15,871-75；Dull等人，《病毒学杂志》1998,72,8463-71，以及美国专利第6,627,442号中，所述文献和专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含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并且描述于例如Cepko和Pear，《现代分子生物学实验指南》1996,9.9.1-9.9.16中，所述文献的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含转座子介导的基因转移的步骤。转座子介导的基因转移系统是本领域已知的并且包含以下系统：其中转座酶是以DNA表达载体形式或以可表达的RNA或蛋白质形式提供以使得转基因细胞中不发生转座酶的长期表达，例如，以mRNA(例如，包括帽和poly-A尾部的mRNA)形式提供的转座酶。包含鲑科鱼型Tel样转座酶(睡美人转座酶)，如SB10、SB11和SB100x的合适转座子介导的基因转移系统，和具有增加酶促活性的工程化酶描述于例如Hackett等人，《分子疗法》2010,18,674-83和美国专利第6,489,458号中，所述文献和美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。

[1189] 在实施例中，所述方法包括对TIL群体(例如，如本文所述的第一群体、第二群体和/或第三群体)进行基因修饰的方法。在一些实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含稳定并入用于产生或抑制(例如，沉默)一种或多种蛋白质的基因的步骤。在实施例中，对TIL群体进行基因修饰的方法包含电穿孔的步骤。电穿孔方法是本领域已知的并且描述于例如Tsong，《生物物理杂志》1991,60,297-306，以及美国专利申请公开第2014/0227237A1号中，所述文献和所述美国专利申请中的每一个的公开内容通过引用并入本文。可以使用本领域已知的其它电穿孔方法，如在美国专利第5,019,034号；第5,128,257号；第5,137,817号；第5,173,158号；第5,232,856号；第5,273,525号；第5,304,120号；第5,318,514号；第6,010,613号和第6,078,490号中描述的方法，所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，电穿孔方法是无菌电穿孔方法。在实施例中，电穿孔方法是脉冲式电穿孔方法。在实施例中，电穿孔方法是包括以下步骤的脉冲式电穿孔方法：用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化，包括向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤，其中至少三个DC电脉冲序列具有以下特性中的一个、两个或三个：(1)至少三个脉冲中的至

少两个的脉冲幅度彼此不同;(2)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同;以及(3)至少三个脉冲中的第一组两个脉冲的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的第二组两个脉冲的第二脉冲间隔。在实施例中,电穿孔方法是包括以下步骤的脉冲式电穿孔方法:用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化,包括向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤,其中至少三个脉冲中的至少两个的脉冲幅度彼此不同。在实施例中,电穿孔方法是包括以下步骤的脉冲式电穿孔方法:用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化,包括向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤,其中至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同。在实施例中,电穿孔方法是包括以下步骤的脉冲式电穿孔方法:用脉冲式电场处理TIL以改变、操控或引起限定且控制的、永久性或暂时性的TIL变化,包括向TIL施加至少三个单一的由操作员控制的独立编程的场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤,其中至少三个脉冲中的第一组两个脉冲的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的第二组两个脉冲的第二脉冲间隔。在一实施例中,电穿孔方法是包括以下步骤的脉冲式电穿孔方法:用脉冲式电场处理TIL以诱导TIL中的孔形成,包括向TIL施加至少三个场强度等于或大于100V/cm的DC电脉冲序列的步骤,其中至少三个DC电脉冲序列具有以下特性中的一个、两个或三个:(1)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲幅度彼此不同;(2)至少三个脉冲中的至少两个的脉冲宽度彼此不同;以及(3)至少三个脉冲中的第一组两个脉冲的第一脉冲间隔不同于至少三个脉冲中的第二组两个脉冲的第二脉冲间隔,以使得诱导孔持续相对较长的时间段,并且使得TIL的活力得以保持。在实施例中,对TIL群体进行基因修饰的方法包含磷酸钙转染的步骤。磷酸钙转染方法(磷酸钙DNA沉淀、细胞表面涂层和内吞作用)是本领域已知的并且描述于Graham和van der Eb,《病毒学》1973,52,456-467;Wigler等人,《美国国家科学院院刊》1979,76,1373-1376;以及Chen和Okayarea,《分子细胞生物学》1987,7,2745-2752;以及美国专利第5,593,875号中,所述文献和美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中,对TIL群体进行基因修饰的方法包含脂质体转染的步骤。脂质体转染方法,如采用阳离子脂质N-[1-(2,3-二油基氧基)丙基]-n,n,n-三甲基氯化铵(DOTMA)与二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)于过滤水中的1:1(w/w)脂质体调配物的方法,是本领域已知的并且描述于Rose等人,《生物技术》1991,10,520-525和Felgner等人,《美国国家科学院院刊》,1987,84,7413-7417以及美国专利第5,279,833号;第5,908,635号;第6,056,938号;第6,110,490号;第6,534,484号;和第7,687,070号中,所述文献和美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。在实施例中,对TIL群体进行基因修饰的方法包含使用在美国专利第5,766,902号;第6,025,337号;第6,410,517号;第6,475,994号;和第7,189,705号;中描述的方法进行转染的步骤,所述美国专利中的每一个的公开内容通过引用并入本文。TIL可以是如本文所述的TIL的第一群体、第二群体和/或第三群体。

[1190] 根据实施例,基因编辑过程可以包括使用介导在一个或多个免疫检查点基因处产生双链或单链断裂的可编程核酸酶。此类可编程核酸酶通过在特定基因组位点引入断裂来实现精确的基因组编辑,即,其依赖于识别基因组内的将核酸酶域靶向此位置并且介导在靶序列处产生双链断裂的特定DNA序列。DNA中的双链断裂随后将内源性修复机构募集带断裂位点以通过非同源末端连接(non-homologous end-joining;NHEJ)或同源性定向修复

(homology-directed repair;HDR)介导基因组编辑。因此,断裂的修复可以导致引入破坏(例如,沉默、抑制或增强)靶基因产物的插入/缺失突变。

[1191] 已经开发实现特定位点基因组编辑的主要类别的核酸酶,包含锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样核酸酶(TALEN)和CRISPR相关核酸酶(例如,CRISPR/Cas9)。这些核酸酶系统可以基于其DNA识别模式而广泛地分为两个类别:ZFN和TALEN通过蛋白质-DNA相互作用实现特定DNA结合,而CRISPR系统(例如Cas9)通过与靶DNA直接碱基配对的短RNA向导分子且通过蛋白质-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。参见例如,Cox等人,《自然医学(Nature Medicine)》,2015,第21卷,第2期。

[1192] 可以根据本发明的TIL扩增方法使用的基因编辑方法的非限制性实例包含CRISPR方法、TALE方法和ZFN方法,其更详细地描述于下文中。根据实施例,用于将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所述的方法(例如,GEN 3工艺)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包括通过CRISPR方法、TALE方法或ZFN方法中的一种或多种对TIL的至少一部分进行基因编辑,以便产生可以提供增强的治功效果的TIL。根据实施例,可以通过将经基因编辑的TIL与未经修饰的TIL进行体外比较(例如,通过评估与未经修饰的TIL相比的体外效应功能、细胞因子分布等)来评估基因编辑的TIL的改进的治疗作用。在某些实施例中,方法包括使用CRISPR、TALE和/或ZFN方法对TIL群体进行基因编辑。

[1193] 在本发明的一些实施例中,电穿孔用于递送基因编辑系统,如CRISPR、TALEN和ZFN系统。在本发明的一些实施例中,电穿孔系统是流式电穿孔系统。适合于本发明的一些实施例的合适流式电穿孔系统的实例是可商购获得的MaxCyte STX系统。存在可以适用于本发明的若干替代性可商购获得的电穿孔仪器,如购自BTX-哈佛设备公司(BTX-Harvard Apparatus)的AgilePulse系统或ECM 830、Cellaxess Elektra(Cellectricon)、核转染仪(Lonza/Amaxa)、GenePulser MXcell(BIORAD)、iPorator-96(致伸科技公司(Primax))或siPORTer96(Ambion)。在本发明的一些实施例中,电穿孔系统与TIL扩增方法的其余部分形成密闭无菌系统。在本发明的一些实施例中,电穿孔系统是如本文所述的脉冲式电穿孔系统,并且与TIL扩增方法的其余部分形成密闭无菌系统。

[1194] 用于将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所述的方法(例如,工艺GEN 3)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包括通过CRISPR方法(例如,CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)对TIL的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,在TIL扩增工艺期间使用CRISPR方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中沉默或减少。可替代地,在TIL扩增工艺期间使用CRISPR方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中增强。

[1195] CRISPR表示“成簇的规律间隔的短回文重复序列”。使用CRISPR系统进行基因编辑的方法在本文中又称为CRISPR方法。存在三种类型的并入RNA和Cas蛋白质并且可以根据本发明使用的CRISPR系统:I型、II型和III型。II型CRISPR(通过Cas9例示)是最充分表征系统之一。

[1196] 根据细菌和古细菌的天然防御机制(单细胞微生物的域)调适CRISPR技术。这些生物体使用CRISPR源性RNA和各种Cas蛋白质(包含Cas9)以通过切碎并破坏外来侵入物的DNA

来阻止病毒和其它外来物体的攻击。CRISPR是具有两种不同特性的DNA特化区:存在核苷酸重复序列和间隔子。核苷酸的重复序列分配于整个CRISPR区中,其中外来DNA(间隔子)的短片段穿插于重复序列当中。在II型CRISPR/Cas系统中,间隔子整合于CRISPR基因组位点内并且转录且处理到短CRISPR RNA(crRNA)中。这些crRNA粘接到反式活化crRNA(tracrRNA)并且通过Cas蛋白引导致病性DNA的序列特异性裂解和沉默。由Cas9蛋白进行的靶识别需要crRNA内的"种子"序列和crRNA结合区的含有保守性二核苷酸的前间区序列邻近基序(PAM)序列上游。通过重新设计crRNA,CRISPR/Cas系统进而可以进行重新靶向以裂解几乎任何DNA序列。天然系统中的crRNA和tracrRNA可以简化成具有大约100个核苷酸的单向导RNA(sgRNA)以用于基因工程化。CRISPR/Cas系统通过共递送表达Cas9内核酸酶和必要crRNA组分的质粒来直接便携到人类细胞。Cas蛋白的不同变体可以用于降低靶向局限性(例如,Cas9的直系同源物,如Cpf1)。

[1197] 可以通过CRISPR方法对TIL进行永久性地基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包含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。

[1198] 可以通过CRISPR方法对TIL进行永久性地基因编辑而增强的基因的非限制性实例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1199] 通过CRISPR方法改变靶基因序列的表达并且可以根据本发明的实施例使用的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利第8,697,359号;第8,993,233号;第8,795,965号;第8,771,945号;第8,889,356号;第8,865,406号;第8,999,641号;第8,945,839号;第8,932,814号;第8,871,445号;第8,906,616号;以及第8,895,308号中,所述美国专利通过引用并入本文。用于实施CRISPR方法的资源,如表达CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1的质粒,可从如金斯瑞公司(GenScript)等公司商购获得。

[1200] 在实施例中,如本文所述,可以使用如美国专利第US 9790490号中所描述的CRISPR/Cpf1系统进行TIL群体的基因修饰,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。

[1201] 用于将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所述的方法(例如,工艺2A)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行,其中所述方法进一步包括通过TALE方法对TIL的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例,在TIL扩增工艺期间使用TALE方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中沉默或减少。可替代地,在TIL扩增工艺期间使用TALE方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体中的至少一部分中增强。

[1202] TALE表示"转录激活因子样效应子"蛋白,其包含TALEN("转录激活因子样效应子核酸酶")。使用TALE系统进行基因编辑的方法在本文中还可以称作TALE方法。TALE是来自植物病原菌属黄单胞菌(Xanthomonas)的天然存在的蛋白质,并且含有由一系列33-35个氨基酸重复结构域构成的DNA结合结构域,每个结合结构域均识别单个碱基对。通过称为重复可变二残基(RVD)的两个高变氨基酸来确定TALE特异性。模块化TALE重复序列连接在一起以识别相邻DNA序列。DNA结合结构域中的特定RVD识别靶基因座中的碱基,从而提供组装可

预测DNA-结合结构域的结构性特征。TALE的DNA结合结构域与IIS型FokI核酸内切酶的催化域融合以形成可靶向的TALE核酸酶。为了诱导位点特异性突变，由14-20个碱基对间隔区间隔开的两个单独TALEN臂使得FokI单体非常接近以二聚合并产生靶向的双链断裂。

[1203] 利用各种组装方法的若干大型系统性研究已表明，TALE重复序列可以组合以识别几乎任何的自定义序列。也可以通过Cellectis Bioresearch(巴黎，法国)、Transposagen Biopharmaceuticals(列克星敦，肯塔基州，美国)和生命技术公司(Life Technologies)(格兰德岛，纽约，美国)商购获得专门设计的TALE阵列。适用于本发明的TALE和TALEN方法描述于美国专利申请公开第US 2011/0201118 A1号；第US 2013/0117869 A1号；第US 2013/0315884 A1号；第US 2015/0203871 A1号和第US 2016/0120906 A1号中，所述美国专利申请的公开内容通过引用并入本文。

[1204] 可以通过TALE方法对TIL进行永久性地基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包含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。

[1205] 可以通过TALE方法对TIL进行永久性地基因编辑而增强的基因的非限制性实例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1206] 通过TALE方法改变靶基因序列的表达并且可以根据本发明的实施例使用的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利第8,586,526号中，所述美国专利通过引用并入本文。

[1207] 用于将TIL扩增成治疗性群体的方法可以根据本文所述的方法(例如，工艺GEN 3)的任何实施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述来进行，其中所述方法进一步包括通过锌指或锌指核酸酶方法对TIL的至少一部分进行基因编辑。根据特定实施例，在TIL扩增工艺期间使用锌指方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中沉默或减少。可替代地，在TIL扩增工艺期间使用锌指方法使得一个或多个免疫检查点基因的表达在治疗性TIL群体的至少一部分中增强。

[1208] 单个锌指在保守性ββα构型中含有大约30个氨基酸。在α螺旋的表面上的若干个氨基酸通常在DNA主沟中接触3bp，具有不同水平的选择性。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且含有锌指。第二结构域是核酸酶结构域，其包含FokI限制酶并且负责催化裂解DNA。

[1209] 单独ZFN的DNA结合结构域通常含有三到六个单独锌指重复序列，并且各自可以识别9到18个碱基对。如果锌指域对其预期靶位点具有特异性，则识别总共18个碱基对的一对3-指ZFN在理论上能够靶向哺乳动物基因组中的单个基因座。一种产生新的锌指阵列的方法应组合具有已知特异性的较小锌指“模块”。最常见的模块组装工艺涉及组合三个单独的锌指，所述锌指各自可以识别3个碱基对DNA序列以产生可以识别9个碱基对靶位点的3-指阵列。可替代地，基于选择的途径，如寡聚库工程化(OPEN)可以用于从考虑邻近指之间的内容相关交互的随机库中选择新的锌指阵列。工程化锌指是可商购获得的；加莫生物科技公司(Sangamo Biosciences)(里奇蒙，加利福尼亚州，美国)与西格玛-奥德里奇公司(Sigma-

Aldrich)(圣路易斯,密苏里州,美国)合作开发了用于锌指构造的专用平台(CompoZr®)。

[1210] 可以通过锌指方法对TIL进行永久性地基因编辑而沉默或抑制的基因的非限制性实例包含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。

[1211] 可以通过锌指方法对TIL进行永久性地基因编辑而增强的基因的非限制性实例包含CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15和IL-21。

[1212] 通过可以根据本发明的实施例使用的锌指方法改变靶基因序列的表达的系统、方法和组合物的实例描述于美国专利第6,534,261号;第6,607,882号;第6,746,838号;第6,794,136号;第6,824,978号;第6,866,997号;第6,933,113号;第6,979,539号;第7,013,219号;第7,030,215号;第7,220,719号;第7,241,573号;第7,241,574号;第7,585,849号;第7,595,376号;第6,903,185号和第6,479,626号中,所述美国专利通过引用并入本文。

[1213] 用于通过锌指方法改变靶基因序列的表达并且可以根据本发明的实施例使用的系统、方法和组合物的其它实例描述于Beane等人,《分子疗法》,2015,23 1380-1390,所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[1214] 在一些实施例中,对TIL进行任选地基因工程化以包含另外的功能,包含但不限于高亲和力T细胞受体(TCR),例如靶向肿瘤相关抗原的TCR(如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1),或与肿瘤相关细胞表面分子(例如,间皮素)或谱系限制性细胞表面分子(例如,CD19)结合的嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施例中,所述方法包括对TIL群体进行基因工程化以包含高亲和力T细胞受体(TCR),例如靶向肿瘤相关抗原(如MAGE-1、HER2的TCR或NY-ESO-1),或与肿瘤相关细胞表面分子(例如,间皮素)或谱系限制性细胞表面分子(例如,CD19)结合的嵌合抗原受体(CAR)。适当地,TIL群体可以是如本文所述的第一群体、第二群体和/或第三群体。

[1215] K.用于TIL制造的密闭系统

[1216] 本发明提供密闭系统在TIL培养工艺期间的用途。此类密闭系统允许避免和/或减少微生物污染,允许使用较少的烧瓶并且允许成本降低。在一些实施例中,密闭系统使用两个容器。

[1217] 此类密闭系统是本领域熟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中找到。

[1218] 无菌连接装置(STCD)在两段相容的导管之间产生无菌焊缝。此程序准许各种容器和导管直径的无菌连接。在一些实施例中,密闭系统包含鲁尔锁(luer lock)和如例如实例G中所描述的热密封系统。在一些实施例中,通过注射器在无菌条件下进入密闭系统以维持系统的无菌性质和密闭性质。在一些实施例中,采用如实例G中所描述的密闭系统。在一些实施例中,根据实例G,“最终调配和填充”部分中描述的方法将TIL调配到最终产物调配物容器中。

[1219] 在一些实施例中,从获得肿瘤碎片时起,密闭系统使用一个容器直到准备将TIL用

于向患者施用或低温保存。在一些实施例中，当使用两个容器时，第一容器是密闭的G-容器并且在不打开第一密闭G-容器的情况下将TIL群体离心并转移到输注袋中。在一些实施例中，当使用两个容器时，输注袋是含有HypoThermosol的输注袋。密闭系统或密闭的TIL细胞培养系统的特征在于一旦已添加肿瘤样品和/或肿瘤碎片后，就将系统从外部紧密地密封，以形成不含细菌、真菌侵入和/或任何其它微生物污染的密闭环境。

[1220] 在一些实施例中，微生物污染的减少在约5％与约100％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少在约5％与约95％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少在约5％与约90％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少在约10％与约90％之间。在一些实施例中，微生物污染的减少在约15％与约85％之间。在一些实施例中，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％或约100％。

[1221] 密闭系统允许在不存在微生物污染和/或微生物污染明显减少的情况下的TIL生长。

[1222] 此外，TIL细胞培养环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压各自随着培养细胞而变化。因此，即使循环适合于细胞培养的培养基，但密闭环境仍需要恒定地保持为用于TIL增殖的最优环境。为此目的，需要借助于传感器监测密闭环境的培养液体内的pH、二氧化碳分压和氧气分压的物理因素，其信号用以控制安装在培养环境入口的气体交换器，并且根据培养液体中的变化实时调节密闭环境的气体分压以便优化细胞培养环境。在一些实施例中，本发明提供一种密闭细胞培养系统，其在密闭环境的入口处并入配备有监测装置的气体交换器，所述监测装置测量封闭环境的pH、二氧化碳分压和氧气分压，并且通过基于来自监测装置的信号自动地调节气体浓度来优化细胞培养环境。

[1223] 在一些实施例中，连续地或间歇地控制密闭环境内的压力。也就是说，可以借助例如压力维持装置来改变密闭环境中的压力，由此确保所述空间适合于正压状态下的TIL生长，或促进负压状态下的流体渗出，并且因此促进细胞增殖。此外，通过间歇地施加负压，有可能借助于密闭环境体积的暂时收缩而均匀地且有效地替换密闭环境中的循环液体。

[1224] 在一些实施例中，可以取代或添加用于TIL增殖的最优培养组分，并且可以添加包含例如IL-2和/或OKT3以及组合的因子。

[1225] L.任选的TIL低温保存

[1226] 本体TIL群体（例如，第二 TIL 群体）或经扩增的TIL群体（例如，第三群体 TIL 群体）可以任选地进行低温保存。在一些实施例中，对治疗性TIL群体进行低温保存。在一些实施例中，对第二扩增之后采集的TIL进行低温保存。在一些实施例中，在图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的实例性步骤F中对TIL进行低温保存。在一些实施例中，将TIL低温保存在输注袋中。在一些实施例中，将TIL放入输注袋之前进行低温保存。在一些实施例中，将TIL低温保存且不放入输注袋中。在一些实施例中，使用低温保存培养基进行低温保存。在一些实施例中，低温保存培养基含有二甲亚砜(DMSO)。这通常通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如，85％补体灭活的AB血清和15％二甲亚砜(DMSO))中来实现。将含细胞的溶液放入低温小瓶中并且在-80℃下存储24小时，其中任选的转移到气态氮冷冻柜中进行低温保存。参见Sadeghi等人，《肿瘤学学报(Acta Oncologica)》，2013,52,978-986。

[1227] 适当时，从冷冻柜中移出细胞并且将其在37℃水浴中解冻直到大约4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如本领域已知的，可以对解冻的TIL进行计数并评估活力。

[1228] 在优选的实施例中，使用CS10低温保存培养基(CryoStor 10，生物生命解决方案公司)对TIL群体进行低温保存。在优选的实施例中，使用含有二甲亚砜(DMSO)的低温保存培养基对TIL群体进行低温保存。在优选的实施例中，使用1:1(体积:体积)比率的CS10和细胞培养基对TIL群体进行低温保存。在优选的实施例中，使用进一步包括另外的IL-2的约1:1(体积:体积)比率的CS10和细胞培养基对TIL群体进行低温保存。

[1229] 如以上所讨论的，并且如在图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中提供的步骤A到E中所例示的，低温保存可以发生在整个TIL扩增工艺中的多个点处。在一些实施例中，可以低温保存第二扩增(如例如根据图1(具体地，例如图1B和/或图1C)的步骤D所提供的)之后的经扩增的TIL群体。通常可以通过将TIL群体放入冷冻溶液(例如，85％补体灭活的AB血清和15％二甲亚砜(DMSO))中来实现低温保存。将含细胞的溶液放入低温小瓶中并且在-80℃下存储24小时，其中任选的转移到气态氮冷冻柜中进行低温保存。参见Sadeghi等人，《肿瘤学学报》，2013，52，978-986。在一些实施例中，将TIL低温保存在5％DMSO中。在一些实施例中，将TIL低温保存在细胞培养基加5％DMSO中。在一些实施例中，根据实例D中提供的方法低温保存TIL。

[1230] 适当时，从冷冻柜中移出细胞并且将其在37℃水浴中解冻直到大约4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选地洗涤一次或多次。在一些实施例中，如本领域已知的，可以对解冻的TIL进行计数并评估活力。

[1231] 在一些情况下，可以使用下文讨论的方案立即低温保存步骤B TIL群体。可替代地，可以对本体TIL群体进行步骤C和步骤D并接着在步骤D之后进行低温保存。类似地，在经基因修饰的TIL将用于疗法的情况下，可以对步骤B或步骤D TIL群体进行基因修饰以用于合适的治疗。

[1232] M.经扩增的TIL的表型特征

[1233] 在一些实施例中，分析TIL在扩增之后的多种表型标志物的表达，包含本文中和实例中所描述的那些。在实施例中，检测一种或多种表型标志物的表达。在一些实施例中，在步骤B中第一扩增后，分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在步骤C中的转变期间分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在根据步骤C的转变期间和在低温保存之后分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在根据步骤D的第二扩增之后，分析TIL的表型特征。在一些实施例中，在根据步骤D的两次或更多次扩增之后，分析TIL的表型特征。

[1234] 在一些实施例中，标志物选自由CD8和CD28组成的组。在一些实施例中，检测CD8的表达。在一些实施例中，检测CD28的表达。在一些实施例中，与其它工艺(例如，如例如在图1(具体地，例如，图1B)中提供的Gen 3工艺)相比，与例如在图1(具体地，例如，图1B)中提供的2A工艺相比，CD8和/或CD28在根据本发明工艺产生的TIL上的表达更高。在一些实施例中，与其它工艺(例如，如例如在图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中提供的Gen 3工艺)相比，与例如在图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中提供的2A工艺相比，CD8在根据本发明工艺产生的TIL上的表达更高。在一些实施例中，与其它工艺(例如，如例如在图1(具体地，例如，图1B和/或图1C)中提供的Gen 3工艺)相比，与例如在图1(具体地，例如，图1A)中提供的

2A工艺相比，CD28在根据本发明工艺产生的TIL上的表达更高。在一些实施例中，高CD28表达表示更年轻更持久的TIL表型。在实施例中，测量一种或多种调节标志物的表达。

[1235] 在实施例中，在本文所述的扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法的任一个步骤期间没有进行基于CD8和/或CD28表达来选择第一TIL群体、第二TIL群体、第三TIL群体或采集的TIL群体。

[1236] 在一些实施例中，与其它工艺(例如，如例如在图1(具体地，例如，图1B)中提供的Gen 3工艺)相比，与例如在图1(具体地，例如，图1A)中提供的2A工艺相比，中央记忆细胞的百分比在根据本发明工艺产生的TIL上更高。在一些实施例中，中央记忆细胞的记忆标志物选自由CCR7和CD62L组成的组。

[1237] 在一些实施例中，CD4+和/或CD8+TIL记忆亚群可以划分成不同的记忆亚群。在一些实施例中，CD4+和/或CD8+TIL包括原初(CD45RA+CD62L+)TIL。在一些实施例中，CD4+和/或CD8+TIL包括中央记忆(CM;CD45RA-CD62L+)TIL。在一些实施例中，CD4+和/或CD8+TIL包括效应子记忆(EM;CD45RA-CD62L-)TIL。在一些实施例中，CD4+和/或CD8+TIL包括RA+效应子记忆/效应子(TEMRA/TEFF;CD45RA+CD62L+)TIL。

[1238] 在一些实施例中，TIL表达选自由颗粒酶B、穿孔素和粒溶素组成的组的多于一种标志物。在一些实施例中，TIL表达颗粒酶B。在一些实施例中，TIL表达穿孔素。在一些实施例中，TIL表达粒溶素。

[1239] 在实施例中，使用细胞因子释放测定还可以评估再刺激TIL的细胞因子释放。在一些实施例中，可以评估TIL的干扰素-γ(IFN-γ)分泌。在一些实施例中，通过ELISA测定测量IFN-γ分泌。在一些实施例中，在快速第二扩增步骤之后，在如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中提供的步骤D之后，通过ELISA测定测量IFN-γ分泌。在一些实施例中，通过IFN-γ(IFN-gamma)分泌测量TIL健康状况。在一些实施例中，IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些实施例中，采用了IFN-γ产生的效力测定。IFN-γ产生是细胞毒性潜力的另一种量度。可以通过确定用针对CD3、CD28和CD137/4-1BB的抗体刺激的TIL培养基中的细胞因子IFN-γ水平来测量IFN-γ产生。可以通过测量IFN-γ释放来确定这些经刺激的TIL的培养基中的IFN-γ水平。在一些实施例中，与如图1(具体地，例如图1A)中提供的2A工艺中的例如步骤D相比，如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中提供的Gen 3工艺中的例如步骤D TIL中的IFN-γ产生增加指示步骤D TIL的细胞毒性潜力增加。在一些实施例中，IFN-γ分泌增加一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些实施例中，IFN-γ分泌增加一倍。在一些实施例中，IFN-γ分泌增加两倍。在一些实施例中，IFN-γ分泌增加三倍。在一些实施例中，IFN-γ分泌增加四倍。在一些实施例中，IFN-γ分泌增加五倍。在一些实施例中，使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施例中，在离体TIL中测量IFN-γ。在一些实施例中，在离体TIL中测量IFN-γ，包含通过本发明的方法产生的TIL，包含例如图1B和/或图1C方法。

[1240] 在一些实施例中，能够分泌至少一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多倍IFN-γ的TIL是通过本发明的扩增方法(包含例如图1B和/或图1C方法)产生的TIL。在一些实施例中，能够分泌多至少一倍的IFN-γ的TIL是通过本发明的扩增方法(包含例如图1B和/或图1C方法)产生的TIL。在一些实施例中，能够分泌至少多两倍IFN-γ的TIL是通过本发明的扩增方法(包含例如图1B和/或图1C方法)产生的TIL。在一些实施例中，能够分泌至少多三倍IFN-γ的TIL是通过本发明的扩增方法(包含例如图1B和/或图1C方法)产生的TIL。在一些实施

例中,能够分泌至少多四倍的IFN-γ的TIL是通过本发明的扩增方法(包含例如图1B和/或图1C方法)产生的TIL。在一些实施例中,能够分泌至少多五倍IFN-γ的TIL是通过本发明的扩增方法(包含例如图1B和/或图1C方法)产生的TIL。

[1241] T淋巴细胞和B淋巴细胞的多种抗原受体是通过有限但大量的基因区段的体细胞重组产生的。这些基因区段:V(可变)、D(多样性)、J(连接)和C(恒定)确定免疫球蛋白与T细胞受体(TCR)的结合特异性和下游应用。本发明提供一种用于产生TIL的方法,所述TIL展现并且增加T细胞库多样性。在一些实施例中,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,与新鲜采集的TIL和/或使用除了本文提供的那些方法之外的其它方法(包含例如除了图1(具体地,例如图1B和/或图1C)中实施的那些方法之外的方法)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,与新鲜采集的TIL和/或使用称为工艺2A的方法(如图1(具体地,例如图1A)中例示的)制备的TIL相比,通过本发明方法获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,在第一扩增中获得的TIL展现T细胞库多样性的增加。在一些实施例中,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。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白重链中。在一些实施例中,免疫球蛋白的多样性是在免疫球蛋白轻链中。在一些实施例中,多样性是在T细胞受体中。在一些实施例中,多样性是在选自由以下组成的组的T细胞受体之一中:α受体、β受体、γ受体和δ受体。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α和/或β的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)α的表达增加。在一些实施例中,T细胞受体(TCR)β的表达增加。在一些实施例中,TCRab(即,TCRα/β)的表达增加。在一些实施例中,基于样品内独特肽CDR的数量,与其它工艺(例如称为Gen2的工艺)相比,如本文所述的工艺(例如,Gen 3工艺)示出更高的克隆多样性(参见,例如图12-14)。

[1242] 在一些实施例中,通过本发明方法(包含例如,图1中所描述的方法)制备的TIL与由其它方法(包含未在图1中例示的方法,例如称为工艺1C方法的方法)产生的TIL相比,展现出增加的多克隆性。在一些实施例中,显著提高的多克隆性和/或增加的多克隆性指示癌症治疗的治疗功效和/或增加的临床功效。在一些实施例中,多克隆性是指T细胞库多样性。在一些实施例中,多克隆性的增加可以指示关于施用由本发明方法产生的TIL的治疗功效。

[1243] 在一些实施例中,与使用除了本文提供的方法之外的方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL相比,多克隆性增加一倍、两倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加一倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加两倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加十倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加100倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加500倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/

或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加1000倍。

[1244] 在一些实施例中,可以通过检查一种或多种标志物来确定TIL的活化和耗尽。在一些实施例中,可以使用多色流式细胞术确定活化和耗尽。在一些实施例中,标志物的活化和耗尽包含但不限于选自由以下组成的组的一种或多种标志物:CD3、PD-1、2B4/CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194/CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103和/或LAG-3。在一些实施例中,标志物的活化和耗尽包含但不限于选自由以下组成的组的一种或多种标志物:BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、PD-1、TIGIT和/或TIM-3。在一些实施例中,标志物的活化和耗尽包含但不限于选自由以下组成的组的一种或多种标志物:BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+/CD69+、CD103+/CD69-、PD-1、TIGIT和/或TIM-3。在一些实施例中,可以确定和/或分析T细胞标志物(包含活化和耗尽标志物)以检查T细胞活化、抑制或功能。在一些实施例中,T细胞标志物可以包含但不限于选自由以下组成的组的一种或多种标志物:TIGIT、CD3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4和/或CD59。

[1245] 在一些实施例中,在低温保存之后检测表型表征。

[1246] N.另外的工艺实施例

[1247] 在一些实施例中,本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:(a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得第一TIL群体;(b)通过在包括IL-2和OKT-3的细胞培养基中培养所述第一TIL群体进行引发第一扩增,其中所述引发第一扩增进行持续约1到8天以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;(c)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和外源抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中所述快速第二扩增进行持续约1到10天以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体;以及(d)采集从步骤(c)获得的所述治疗性TIL群体。在一些实施例中,将快速第二扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现规模扩大的培养物:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约2到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述小规模培养的所述第二TIL群体转移到比第一容器(例如,G-REX500MCS容器)更大的第二容器,其中在所述第二容器中,在较大规模培养中培养来自所述小规模培养的所述第二TIL群体,持续约4到8天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX100MCS容器)中的第一小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小与第一容器相等的第二容器中或之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述第一小规模培养转移到这个第二容器的部分在第二小规模培养中培养持续约4到8天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约2到4天的时间段,以及然后(2)实现

将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)大的第二容器中和之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述小规模培养转移到这个第二容器的部分在较大规模培养中培养持续约4到8天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到2个、3个或4个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中和之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述小规模培养转移到这个第二容器的部分在较大规模培养中培养持续约5到7天的时间段。

[1248] 在一些实施例中,本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括:(a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得第一TIL群体;(b)通过在包括IL-2和OKT-3的细胞培养基中培养所述第一TIL群体进行引发第一扩增,其中所述引发第一扩增进行持续约1到8天以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体;(c)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和外源抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中所述快速第二扩增进行持续约1到8天以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体;以及(d)采集从步骤(c)获得的所述治疗性TIL群体。在一些实施例中,将快速第二扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现规模扩大的培养物:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约2到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述小规模培养的所述第二TIL群体转移到比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器,其中在所述第二容器中,在较大规模培养中培养来自所述小规模培养的所述第二TIL群体,持续约4到8天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约2到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小与第一容器相等的第二容器中或之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述第一小规模培养转移到这个第二容器的部分在第二小规模培养中培养持续约4到6天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养:(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约2到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中和之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述小规模培养转移到这个第二容器的部分在较大规模培养中培养持续约4到6天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向

外扩展和规模扩大的培养：(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到2个、3个或4个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中和之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述小规模培养转移到这个第二容器的部分在较大规模培养中培养持续约4到5天的时间段。

[1249] 在一些实施例中,本发明提供了一种用于将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增成治疗性TIL群体的方法,所述方法包括：(a)通过将从受试者获得的肿瘤样品处理成多个肿瘤碎片来从所述受试者切除的肿瘤获得第一TIL群体；(b)通过在包括IL-2和OKT-3的细胞培养基中培养所述第一TIL群体进行引发第一扩增,其中所述引发第一扩增进行持续约1到7天以获得第二TIL群体,其中所述第二TIL群体在数量上大于所述第一TIL群体；(c)通过使所述第二TIL群体与包括IL-2、OKT-3和外源抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基接触进行快速第二扩增,以产生第三TIL群体,其中所述快速第二扩增进行持续约1到11天以获得所述第三TIL群体,其中所述第三TIL群体是治疗性TIL群体；以及(d)采集从步骤(c)获得的所述治疗性TIL群体。在一些实施例中,将快速第二扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现规模扩大的培养物：(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述小规模培养的所述第二TIL群体转移到比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器,其中在所述第二容器中,在较大规模培养中培养来自所述小规模培养的所述第二TIL群体,持续约4到7天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展的培养：(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小与第一容器相等的第二容器中或之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述第一小规模培养转移到这个第二容器的部分在第二小规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养：(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)大的第二容器中和之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述小规模培养转移到这个第二容器的部分在较大规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在一些实施例中,将快速扩增的步骤分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养：(1)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养所述第二TIL群体来进行所述快速第二扩增,持续约4天的时间段,以及然后(2)实现将来自所述第一小规模培养的所述第二TIL群体转移并分配到2个、3个或4个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中和之中,其中在每个第二容器中,将所述第二TIL群体的从所述小规模培养转移到这个第二容器的部分在较大规模培养中培养持续

约5天的时间段。

[1250] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中，通过使第一TIL群体与进一步包括外源抗原呈递细胞(APC)的培养基接触来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中所述培养基中的APC的数量大于在步骤(b)中所述培养基中的APC的数量。

[1251] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中用另外的外源APC补充培养基。

[1252] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为20:1的范围。

[1253] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为10:1的范围。

[1254] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为9:1的范围。

[1255] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为8:1的范围。

[1256] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为7:1的范围。

[1257] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为6:1的范围。

[1258] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为5:1的范围。

[1259] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为4:1的范围。

[1260] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为3:1的范围。

[1261] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.9:1的范围。

[1262] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数

量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.8:1的范围。

[1263] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.7:1的范围。

[1264] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.6:1的范围。

[1265] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.5:1的范围。

[1266] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.4:1的范围。

[1267] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.3:1的范围。

[1268] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.2:1的范围。

[1269] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2.1:1的范围。

[1270] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为1.1:1到为或约为2:1的范围。

[1271] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为10:1的范围。

[1272] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为5:1的范围。

[1273] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为4:1的范围。

[1274] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为3:1的范围。

[1275] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数

量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.9:1的范围。

[1276] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.8:1的范围。

[1277] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.7:1的范围。

[1278] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.6:1的范围。

[1279] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.5:1的范围。

[1280] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.4:1的范围。

[1281] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.3:1的范围。

[1282] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.2:1的范围。

[1283] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率选自为或约为2:1到为或约为2.1:1的范围。

[1284] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率为或约为2:1。

[1285] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在快速第二扩增中添加的APC的数量与在步骤(b)中添加的APC的数量的比率为或约为1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

[1286] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在引发第一扩增中添加的APC的数量为或约为1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8个APC，并且使得在快速第二扩增

中添加的APC的数量为或约为3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9个APC。

[1287] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在引发第一扩增中添加的APC的数量选自为或约为1×10^8个APC到为或约为3.5×10^8个APC的范围，并且其中在快速第二扩增中添加的APC的数量选自为或约为3.5×10^8个APC到为或约为1×10^9个APC的范围。

[1288] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在引发第一扩增中添加的APC的数量选自为或约为1.5×10^8个APC到为或约为3×10^8个APC的范围，并且其中在快速第二扩增中添加的APC的数量选自为或约为4×10^8个APC到为或约为7.5×10^8个APC的范围。

[1289] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在引发第一扩增中添加的APC的数量选自为或约为2×10^8个APC到为或约为2.5×10^8个APC的范围，并且其中在快速第二扩增中添加的APC的数量选自为或约为4.5×10^8个APC到为或约为5.5×10^8个APC的范围。

[1290] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得向引发第一扩增添加为或约为2.5×10^8个APC，并且向快速第二扩增添加为或约为5×10^8个APC。

[1291] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[1292] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个肿瘤碎片被分配到多个单独容器中，在所述单独容器中的每个单独容器中，在步骤(a)中获得第一TIL群体，在步骤(b)中获得第二TIL群体，并且在步骤(c)中获得第三TIL群体，并且将来自步骤(c)中的多个容器的治疗性TIL群体组合以得到来自步骤(d)的所采集的TIL群体。

[1293] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个肿瘤被均匀地分配到多个单独容器中。

[1294] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个单独容器包括至少两个单独容器。

[1295] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个单独容器包括两个到二十个单独容器。

[1296] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个单独容器包括两个到十五个单独容器。

[1297] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，

所述方法被修改成使得多个单独容器包括两个到十个单独容器。

[1298] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个单独容器包括两个到五个单独容器。

[1299] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个单独容器包括2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个单独容器。

[1300] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得对于其中在步骤(b)中对第一TIL群体进行引发第一扩增的每个容器，在步骤(c)中在同一容器中对由此类第一TIL群体产生的第二TIL群体进行快速第二扩增。

[1301] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得所述单独容器中的每个单独容器包括第一可透气表面区域。

[1302] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个肿瘤碎片被分配到单个容器中。

[1303] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得单个容器包括第一可透气表面区域。

[1304] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中，将APC以平均厚度层为或约为一个细胞层到为或约为三个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1305] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为1.5个细胞层到为或约为2.5个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1306] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为2个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1307] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为1个、1.1个、1.2个、1.3个、1.4个、1.5个、1.6个、1.7个、1.8个、1.9个、2个、2.1个、2.2个、2.3个、2.4个、2.5个、2.6个、2.7个、2.8个、2.9个或3个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1308] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为3个细胞层到为或约为10个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1309] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为4个细胞层到为或约为8个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1310] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为3个、4个、5个、6个、7个、8

个、9个或10个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1311] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为4个、4.1个、4.2个、4.3个、4.4个、4.5个、4.6个、4.7个、4.8个、4.9个、5个、5.1个、5.2个、5.3个、5.4个、5.5个、5.6个、5.7个、5.8个、5.9个、6个、6.1个、6.2个、6.3个、6.4个、6.5个、6.6个、6.7个、6.8个、6.9个、7个、7.1个、7.2个、7.3个、7.4个、7.5个、7.6个、7.7个、7.8个、7.9个或8个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1312] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中在包括第一可透气表面区域的第一容器中进行引发第一扩增，并且在步骤(c)中在包括第二可透气表面区域的第二容器中进行快速第二扩增。

[1313] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得第二容器大于第一容器。

[1314] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中，将APC以平均厚度层为或约为一个细胞层到为或约为三个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1315] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为1.5个细胞层到为或约为2.5个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1316] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为2个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1317] 在另一个实施例中，本发明提供了如适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为1个、1.1个、1.2个、1.3个、1.4个、1.5个、1.6个、1.7个、1.8个、1.9个、2个、2.1个、2.2个、2.3个、2.4个、2.5个、2.6个、2.7个、2.8个、2.9个或3个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1318] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为3个细胞层到为或约为10个细胞层层叠在第二可透气表面区域上。

[1319] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为4个细胞层到为或约为8个细胞层层叠在第二可透气表面区域上。

[1320] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个细胞层层叠在第二可透气表面区域上。

[1321] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为4个、4.1个、4.2个、4.3个、4.4个、4.5个、4.6个、4.7个、4.8个、4.9个、5个、5.1个、5.2个、5.3个、5.4个、5.5个、5.6个、

5.7个、5.8个、5.9个、6个、6.1个、6.2个、6.3个、6.4个、6.5个、6.6个、6.7个、6.8个、6.9个、7个、7.1个、7.2个、7.3个、7.4个、7.5个、7.6个、7.7个、7.8个、7.9个或8个细胞层层叠在第二可透气表面区域上。

[1322] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中在包括第一可透气表面区域的第一容器中进行引发第一扩增，并且在步骤(c)中在第一容器中进行快速第二扩增。

[1323] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中，将APC以平均厚度层为或约为一个细胞层到为或约为三个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1324] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为1.5个细胞层到为或约为2.5个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1325] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为2个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1326] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中将APC以平均厚度为或约为1个、1.1个、1.2个、1.3个、1.4个、1.5个、1.6个、1.7个、1.8个、1.9个、2个、2.1个、2.2个、2.3个、2.4个、2.5个、2.6个、2.7个、2.8个、2.9个或3个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1327] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为3个细胞层到为或约为10个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1328] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为4个细胞层到为或约为8个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1329] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1330] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中将APC以平均厚度为或约为4个、4.1个、4.2个、4.3个、4.4个、4.5个、4.6个、4.7个、4.8个、4.9个、5个、5.1个、5.2个、5.3个、5.4个、5.5个、5.6个、5.7个、5.8个、5.9个、6个、6.1个、6.2个、6.3个、6.4个、6.5个、6.6个、6.7个、6.8个、6.9个、7个、7.1个、7.2个、7.3个、7.4个、7.5个、7.6个、7.7个、7.8个、7.9个或8个细胞层层叠在第一可透气表面区域上。

[1331] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添

加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:10的范围内。

[1332] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:9的范围内。

[1333] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:8的范围内。

[1334] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:7的范围内。

[1335] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:6的范围内。

[1336] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:5的范围内。

[1337] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:4的范围内。

[1338] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增，其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量，并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:3的范围内。

[1339] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的

细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1到为或约为1:2的范围内。

[1340] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.2到为或约为1:8的范围内。

[1341] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.3到为或约为1:7的范围内。

[1342] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.4到为或约为1:6的范围内。

[1343] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.5到为或约为1:5的范围内。

[1344] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.6到为或约为1:4的范围内。

[1345] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.7到为或约为1:3.5的范围内。

[1346] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.8到为或约为1:3的范围内。

[1347] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,

所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.9到为或约为1:2.5的范围内。

[1348] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:2的范围内。

[1349] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中通过用另外的抗原呈递细胞(APC)补充第一TIL群体的细胞培养基来进行引发第一扩增,其中在步骤(c)中添加的APC的数量大于在步骤(b)中添加的APC的数量,并且其中在步骤(b)中层叠的APC的层的平均数与在步骤(c)中层叠的APC的层的平均数的比率选自为或约为1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

[1350] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二TIL群体中的TIL的数量与第一TIL群体中的TIL的数量的比率为或约为1.5:1到为或约为100:1。

[1351] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二TIL群体中的TIL的数量与第一TIL群体中的TIL的数量的比率为或约为50:1。

[1352] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二TIL群体中的TIL的数量与第一TIL群体中的TIL的数量的比率为或约为25:1。

[1353] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二TIL群体中的TIL的数量与第一TIL群体中的TIL的数量的比率为或约为20:1。

[1354] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二TIL群体中的TIL的数量与第一TIL群体中的TIL的数量的比率为或约为10:1。

[1355] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二TIL群体在数量上比第一TIL群体大至少为或约为50倍。

[1356] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,

所述方法被修改成使得第二TIL群体在数量上比第一TIL群体大至少为或约为1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍、26倍、27倍、28倍、29倍、30倍、31倍、32倍、33倍、34倍、35倍、36倍、37倍、38倍、39倍、40倍、41倍、42倍、43倍、44倍、45倍、46倍、47倍、48倍、49倍或50倍。

[1357] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中在第二时间段开始之后的为或约为2天或为或约为3天，用另外的IL-2补充细胞培养基。

[1358] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成进一步包括使用低温保存工艺低温保存步骤(d)中的所采集的TIL群体的步骤。

[1359] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成包括在步骤(d)之后进行另外的步骤(e)：将来自步骤(d)的所采集的TIL群体转移到任选地含有HypoThermosol的输注袋。

[1360] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成包括使用低温保存工艺低温保存步骤(e)中的包括所采集的TIL群体的输注袋的步骤。

[1361] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得使用比率为1:1的所采集的TIL群体与低温保存培养基进行低温保存工艺。

[1362] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

[1363] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得PBMC是经辐照且同种异体的。

[1364] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中添加到细胞培养物中的APC的总数为2.5×10^{8}。

[1365] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(c)中添加到细胞培养物中的APC的总数为5×10^{8}。

[1366] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得APC是PBMC。

[1367] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得PBMC是经辐照且同种异体的。

[1368] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得抗原呈递细胞是人工抗原呈递细胞。

[1369] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改成使得使用基于膜的细胞处理系统进行步骤(d)中的采集。

[1370] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段中所述的方法，所述方法被修改成使得使用LOVO细胞处理系统进行步骤(d)中的采集。

[1371] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，

所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为5个到为或约为60个碎片。

[1372] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为10个到为或约为60个碎片。

[1373] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为15个到为或约为60个碎片。

[1374] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为20个到为或约为60个碎片。

[1375] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为25个到为或约为60个碎片。

[1376] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为30个到为或约为60个碎片。

[1377] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为35个到为或约为60个碎片。

[1378] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为40个到为或约为60个碎片。

[1379] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为45个到为或约为60个碎片。

[1380] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为50个到为或约为60个碎片。

[1381] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(b)中多个碎片包括每容器为或约为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60个碎片。

[1382] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为27mm^3。

[1383] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为20mm^3到为或约为50mm^3。

[1384] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，

所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为21mm^{3}到为或约为30mm^3。

[1385] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为22mm^{3}到为或约为29.5mm^3。

[1386] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为23mm^{3}到为或约为29mm^3。

[1387] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为24mm^{3}到为或约为28.5mm^3。

[1388] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为25mm^{3}到为或约为28mm^3。

[1389] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为26.5mm^{3}到为或约为27.5mm^3。

[1390] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得每个碎片的体积为或约为21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50mm^3。

[1391] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个碎片包括为或约为30个到为或约为60个碎片，其中总体积为或约为1300mm^{3}到为或约为1500mm^3。

[1392] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个碎片包括为或约为50个碎片，其中总体积为或约为1350mm^3。

[1393] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得多个碎片包括为或约为50个碎片，其中总质量为或约为1克到为约为1.5克。

[1394] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得细胞培养基被提供在容器中，所述容器是G-容器或Xuri细胞袋。

[1395] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得细胞培养基中的IL-2浓度为约10,000IU/mL到约5,000IU/mL。

[1396] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得细胞培养基中的IL-2浓度为约6,000IU/mL。

[1397] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得低温保存培养基包括二甲基亚砜(DMSO)。

[1398] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得低温保存培养基包括7％到10％DMSO。

[1399] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(b)中的第一时间段在为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天的时间段内执行。

[1400] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(c)中的第二时间段在为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天的时间段内执行。

[1401] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，

所述方法被修改成使得步骤(b)中的第一时间段和步骤(c)中的第二时间段各自单独地在为或约为1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天的时间段内执行。

[1402] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(b)中的第一时间段和步骤(c)中的第二时间段各自单独地在为或约为5天、6天或7天的时间段内执行。

[1403] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(b)中的第一时间段和步骤(c)中的第二时间段各自单独地在为或约为7天的时间段内执行。

[1404] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为14天到为或约为18天进行。

[1405] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为15天到为或约为18天进行。

[1406] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为16天到为或约为18天进行。

[1407] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为14天到为或约为17天进行。

[1408] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为15天到为或约为17天进行。

[1409] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为14天到为或约为16天进行。

[1410] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为15天到为或约为16天进行。

[1411] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为14天进行。

[1412] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为15天进行。

[1413] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为16天进行。

[1414] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为17天进行。

[1415] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为18天进行。

[1416] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为14天或更短时间进行。

[1417] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为15天或更短时间进行。

[1418] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为16天或更短时间进行。

[1419] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，

所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为17天或更短时间进行。

[1420] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(a)到(d)在总共为或约为18天或更短时间进行。

[1421] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(d)中采集的治疗性TIL群体包括用于治疗有效剂量的TIL的足够的TIL。

[1422] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得足以用于治疗有效剂量的TIL的数量为或约为2.3×10^{10}到为或约为13.7×10^{10}。

[1423] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(c)中的第三TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1424] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(c)中的第三TIL群体提供与通过长于16天的工艺制备的TIL相比至少一倍到五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1425] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(c)中的第三TIL群体提供与通过长于17天的工艺制备的TIL相比至少一倍到五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1426] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(c)中的第三TIL群体提供与通过长于18天的工艺制备的TIL相比至少一倍到五倍或更多的干扰素-γ产生。

[1427] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得相对于在步骤(b)中从所述第二细胞群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞，在步骤(c)中从所述第三TIL群体获得的效应T细胞和/或中央记忆T细胞表现出增加的CD8和CD28表达。

[1428] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得所述方法中所叙述的每个容器是密闭容器。

[1429] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得所述方法中所叙述的每个容器是G-容器。

[1430] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得所述方法中所叙述的每个容器是GREX-10。

[1431] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得所述方法中所叙述的每个容器是GREX-100。

[1432] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得所述方法中所叙述的每个容器是GREX-500。

[1433] 在另一个实施例中，本发明提供了通过如以上适用的前述段落中任一段所述的方法制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体。

[1434] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过在不添加任何抗原呈递细胞(APC)或OKT3的情况下进行TIL的

第一扩增的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1435] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过在不添加任何抗原呈递细胞(APC)的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1436] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过在不添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1437] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过在不添加抗原呈递细胞(APC)或不添加OKT3的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1438] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过长于16天的工艺的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1439] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过长于17天的工艺的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1440] 在另一个实施例中，本发明提供了由患者的肿瘤组织制备的治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其中与通过长于18天的工艺的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体提供增加的功效、增加的干扰素-γ产生和/或增加的多克隆性。

[1441] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其提供增加的干扰素-γ产生。

[1442] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其提供增加的多克隆性。

[1443] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其提供增加的功效。

[1444] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素-γ。在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素-γ。在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少一倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少一倍的干扰素-γ。

[1445] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产

生多至少两倍的干扰素-γ。在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少两倍的干扰素-γ。在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少两倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少两倍的干扰素-γ。

[1446] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于16天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少三倍的干扰素-γ。在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于17天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少三倍的干扰素-γ。在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其被修改成使得与通过长于18天的工艺所制备的TIL相比，治疗性TIL群体能够产生多至少三倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少三倍的干扰素-γ。

[1447] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何抗原呈递细胞(APC)的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少一倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少一倍的干扰素-γ。

[1448] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群体，其与通过在不添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少一倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少一倍的干扰素-γ。

[1449] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性TIL群体，其与通过在不添加任何APC的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少两倍的干扰素-γ。

[1450] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性TIL群体，其与通过在不添加任何APC的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少两倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少两倍的干扰素-γ。

[1451] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性TIL群体，其与通过在不添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少两倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少两倍的干扰素-γ。

[1452] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性TIL群体，其与通过在不添加任何APC的

情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少三倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少一倍的干扰素-γ。

[1453] 在另一个实施例中，本发明提供了治疗性TIL群体，其与通过在不添加任何OKT3的情况下进行TIL的第一扩增的工艺所制备的TIL相比，能够产生多至少三倍的干扰素-γ。在一些实施例中，由于本文所述的扩增工艺，例如如上文步骤A到F中所描述或根据上文步骤A到F(还如例如图1(具体地，例如图1B和/或图1C)中所示)，使TIL能够产生多至少三倍的干扰素-γ。

[1454] 在另一个实施例中，本发明提供了一种扩增T细胞的方法，所述方法包括：(a)通过培养第一T细胞群体来进行获自供体的第一T细胞群体的引发第一扩增以实现生长并且引发第一T细胞群体的活化；(b)在步骤(a)中引发的第一T细胞群体的活化开始衰减之后，通过培养第一T细胞群体引发第一T细胞群体的快速第二扩增以实现生长并且增强第一T细胞群体的活化，以获得第二T细胞群体；以及(c)采集所述第二T细胞群体。在另一个实施例中，将快速第二扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现规模扩大的培养物：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养物的第一T细胞群体转移到比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器，并且在第二容器中的较大规模培养中培养来自小规模培养的第一T细胞群体，持续约4到7天的时间段。在另一个实施例中，将快速扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自第一小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小与第一容器相等的第二容器中或之中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从第一小规模培养转移到这个第二容器的部分在第二小规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在另一个实施例中，将快速扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19或20个大小比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约4到7天的时间段。在另一个实施例中，将快速扩增的步骤分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展和规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个或4个大小比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约5天的时间段。

[1455] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，

所述方法被修改成使得快速第二扩增的步骤被分成多个步骤，以通过以下实现规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约2到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养物的第一T细胞群体转移到比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器，并且在第二容器中的较大规模培养中培养来自小规模培养的第一T细胞群体，持续约5到7天的时间段。

[1456] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得快速扩增的步骤被分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的第一小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约2到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自第一小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个大小与第一容器相等的第二容器中或之中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从第一小规模培养转移到这个第二容器的部分在第二小规模培养中培养持续约5到7天的时间段。

[1457] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得快速扩增的步骤被分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展并且规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约2到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19或20个大小比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约5到7天的时间段。

[1458] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得快速扩增的步骤被分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展并且规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个或4个大小比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约5到6天的时间段。

[1459] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得快速扩增的步骤被分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展并且规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个或4个大小比第一容器(例如，G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中，其中在每个第二容器中，将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约5天的时间段。

[1460] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得快速扩增的步骤被分成多个步骤，以通过以下实现向外扩展并且规模扩大的培养：(a)通过在第一容器(例如，G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增，持续约3到4天的时间段，以及然后(b)实现将来自小规模

培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个或4个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中,其中在每个第二容器中,将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约6天的时间段。

[1461] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得快速扩增的步骤被分成多个步骤,以通过以下实现向外扩展并且规模扩大的培养:(a)通过在第一容器(例如,G-REX 100MCS容器)中的小规模培养中培养第一T细胞群体来进行快速第二扩增,持续约3到4天的时间段,以及然后(b)实现将来自小规模培养的第一T细胞群体转移并分配到至少2个、3个或4个大小比第一容器(例如,G-REX 500MCS容器)更大的第二容器中,其中在每个第二容器中,将第一T细胞群体的从小规模培养转移到这个第二容器的部分在更大规模培养中培养持续约7天的时间段。

[1462] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(a)的引发第一扩增在长达7天的时间段期间进行。

[1463] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(b)的快速第二扩增在长达8天的时间段期间进行。

[1464] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(b)的快速第二扩增在长达9天的时间段期间进行。

[1465] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(b)的快速第二扩增在长达10天的时间段期间进行。

[1466] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(b)的快速第二扩增在长达11天的时间段期间进行。

[1467] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(a)中的引发第一扩增在7天的时间段期间进行并且步骤(b)的快速第二扩增在长达9天的时间段期间进行。

[1468] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得成步骤(a)中的引发第一扩增在7天的时间段期间进行并且步骤(b)的快速第二扩增在长达10天的时间段期间进行。

[1469] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(a)中的引发第一扩增在7天或8天的时间段期间进行并且步骤(b)的快速第二扩增在长达9天的时间段期间进行。

[1470] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(a)中的引发第一扩增在7天或8天的时间段期间进行并且步骤(b)的快速第二扩增在长达10天的时间段期间进行。

[1471] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(a)中的引发第一扩增在8天的时间段期间进行并且步骤(b)的快速第二扩增在长达9天的时间段期间进行。

[1472] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得成步骤(a)中的引发第一扩增在8天的时间段期间进行并且步骤(b)的快速第二扩增在长达8天的时间段期间进行。

[1473] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,

所述方法被修改成使得在步骤(a)中,在包括OKT-3和IL-2的第一培养基中培养第一T细胞群体。

[1474] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第一培养基包括4-1BB激动剂、OKT-3和IL-2。

[1475] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第一培养基包括OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)。

[1476] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第一培养基包括4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和抗原呈递细胞(APC)。

[1477] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中,在包括第一可透气表面的容器中的第一培养基中培养第一T细胞群体,其中第一培养基包括OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC)群体,其中第一APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠在第一可透气表面上,其中在步骤(b)中,在所述容器中的第二培养基中培养第一T细胞群体,其中第二培养基包括OKT-3、IL-2和第二APC群体,其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠在第一可透气表面上,并且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1478] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中,在包括第一可透气表面的容器中的第一培养基中培养第一T细胞群体,其中第一培养基包括4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC)群体,其中第一APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠在第一可透气表面上,其中在步骤(b)中,在所述容器中的第二培养基中培养第一T细胞群体,其中第二培养基包括OKT-3、IL-2和第二APC群体,其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠在第一可透气表面上,并且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1479] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中,在包括第一可透气表面的容器中的第一培养基中培养第一T细胞群体,其中第一培养基包括OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC)群体,其中第一APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠在第一可透气表面上,其中在步骤(b)中,在所述容器中的第二培养基中培养第一T细胞群体,其中第二培养基包括4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第二APC群体,其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠在第一可透气表面上,并且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1480] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中,在包括第一可透气表面的容器中的第一培养基中培养第一T细胞群体,其中第一培养基包括4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第一抗原呈递细胞(APC)群体,其中第一APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第一APC群体层叠在第一可透气表面上,其中在步骤(b)中,在所述容器中的第二培养基中培养第一T细胞群体,其中第二培养基包括4-1BB激动剂、OKT-3、IL-2和第二APC群体,其中第二APC群体对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的并且将第二APC群体层叠在第一可透气表面

上,并且其中第二APC群体多于第一APC群体。

[1481] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第二APC群体中的APC的数量与第一APC群体中的APC的数量的比率为约2:1。

[1482] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得第一APC群体中的APC的数量为约2.5×10^8并且第二APC群体中的APC的数量为约5×10^8。

[1483] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以平均厚度为2层APC层叠在第一可透气表面上。

[1484] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中将第二APC群体以平均厚度为选自4到8层APC的范围层叠在第一可透气表面上。

[1485] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得步骤(b)中层叠在第一可透气表面上的APC的层的平均数与步骤(a)中层叠在第一可透气表面上的APC的层的平均数的比率为2:1。

[1486] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.0×10^6个APC/cm^2到为或约为4.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1487] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.5×10^6个APC/cm^2到为或约为3.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1488] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为2.0×10^6个APC/cm^2到为或约为3.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1489] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以为或约为2.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一可透气表面上。

[1490] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2到为或约为7.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1491] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2到为或约为6.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1492] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2到为或约为5.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1493] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法,所述方法被修改成使得在步骤(b)中将第二APC群体以为或约为4.0×10^6个APC/cm^2的密度

接种于第一可透气表面上。

[1494] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.0×10^6个APC/cm^2到为或约为4.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上，并且在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为2.5×10^6个APC/cm^2到为或约为7.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1495] 在另一个实施例中，本发明提供了如适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为1.5×10^6个APC/cm^2到为或约为3.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上，并且在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为3.5×10^6个APC/cm^2到为或约为6.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1496] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以选自为或约为2.0×10^6个APC/cm^2到为或约为3.0×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上，并且在步骤(b)中将第二APC群体以选自为或约为4.0×10^6个APC/cm^2到为或约为5.5×10^6个APC/cm^2的范围的密度接种于第一可透气表面上。

[1497] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在步骤(a)中将第一APC群体以为或约为2.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一可透气表面上，并且在步骤(b)中将第二APC群体以为或约为4.0×10^6个APC/cm^2的密度接种于第一可透气表面上。

[1498] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得APC是外周血单核细胞(PBMC)。

[1499] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得PBMC是经辐照的并且对于第一T细胞群体的供体来说是外源性的。

[1500] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得T细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

[1501] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得T细胞是骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

[1502] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得T细胞是外周血淋巴细胞(PBL)。

[1503] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得第一T细胞群体是通过从供体的全血中分离而获得的。

[1504] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得第一T细胞群体是通过从供体的单采术产物中分离而获得的。

[1505] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得第一T细胞群体是通过阳性或阴性选择T细胞表型从供体的全血或单采术产物中分离的。

[1506] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得T细胞表型为CD3+和CD45+。

[1507] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得在进行第一T细胞群体的引发第一扩增之前，将T细胞与NK细胞分离。在另一个实施例中，通过从第一T细胞群体中去除CD3-CD56+细胞而将T细胞与第一T细胞群体中的NK细胞分离。在另一个实施例中，通过使用去除CD3-CD56+细胞级分并且恢复阴性级分的门控策略对第一T细胞群体进行细胞分选来从第一T细胞群体中去除CD3-CD56+细胞。在另一个实施例中，前述方法用于以高百分比NK细胞为特征的第一T细胞群体中的T细胞扩增。在另一个实施例中，前述方法用于以高百分比CD3-CD56+细胞为特征的第一T细胞群体中的T细胞扩增。在另一个实施例中，前述方法用于以存在大量NK细胞为特征的肿瘤组织中的T细胞扩增。在另一个实施例中，前述方法用于以大量CD3-CD56+细胞为特征的肿瘤组织中的T细胞扩增。在另一个实施例中，前述方法用于从患有肿瘤的患者获得的肿瘤组织中的T细胞扩增，所述肿瘤组织的特征为存在大量NK细胞。在另一个实施例中，前述方法用于从患有肿瘤的患者获得的肿瘤组织中的T细胞扩增，所述肿瘤组织的特征为存在大量CD3-CD56+细胞。在另一个实施例中，前述方法用于从患有卵巢癌的患者获得的肿瘤组织中的T细胞扩增。

[1508] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得将来自第一T细胞群体的为或约为1×10^{7}个T细胞接种于容器中，以在这个容器中启动初始第一扩增培养。

[1509] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得将第一T细胞群体分配到多个容器中，并且在每个容器中，接种来自第一T细胞群体的为或约为1×10^{7}个T细胞以在这个容器中启动初始第一扩增培养。

[1510] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的方法，所述方法被修改成使得步骤(c)中采集的第二T细胞群体是治疗性TIL群体。

[1511] III.药物组合物、剂量和给药方案

[1512] 在实施例中，使用本公开的方法扩增的TIL是以药物组合物形式向患者施用。在实施例中，药物组合物是TIL于无菌缓冲液中的悬浮液。可以通过如本领域已知的任何合适途径施用使用本公开的PBMC扩增的TIL。在一些实施例中，T细胞是以单次动脉内或静脉内输注形式施用，优选地持续大约30到60分钟。其它合适的施用途径包含腹膜内、鞘内和淋巴管内施用。

[1513] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施例中，施用约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}个TIL，其中平均约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中，施用约1.2×10^{10}到约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约3×10^{10}到约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约4×10^{10}到约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约5×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约6×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，施用约7×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约2.3×10^{10}到约13.7×10^{10}。在一些实施例中，治疗有效剂量为约7.8×10^{10}个TIL，尤其是在癌症为黑素瘤的情况下。在一些实施例中，治疗有效剂量为约1.2×10^{10}到约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约3×10^{10}到约12×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约4×10^{10}到约10×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约5×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约6×10^{10}到约8×10^{10}个TIL。在一些实施例中，治疗有效剂量为约$7\times$

10^{10}到约8×10^{10}个TIL。

[1514] 在一些实施例中，在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}和9×10^{13}个。在实施例中，在本发明的药物组合物中提供的TIL的数量的范围为1×10^{6}到5×10^{6}、5×10^{6}到1×10^{7}、1×10^{7}到5×10^{7}、5×10^{7}到1×10^{8}、1×10^{8}到5×10^{8}、5×10^{8}到1×10^{9}、1×10^{9}到5×10^{9}、5×10^{9}到1×10^{10}、1×10^{10}到5×10^{10}、5×10^{10}到1×10^{11}、5×10^{11}到1×10^{12}、1×10^{12}到5×10^{12}和5×10^{12}到1×10^{13}。

[1515] 在一些实施例中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度小于例如药物组合物的100％、90％、80％、70％、60％、50％、40％、30％、20％、19％、18％、17％、16％、15％、14％、13％、12％、11％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％、2％、1％、0.5％、0.4％、0.3％、0.2％、0.1％、0.09％、0.08％、0.07％、0.06％、0.05％、0.04％、0.03％、0.02％、0.01％、0.009％、0.008％、0.007％、0.006％、0.005％、0.004％、0.003％、0.002％、0.001％、0.0009％、0.0008％、0.0007％、0.0006％、0.0005％、0.0004％、0.0003％、0.0002％或0.0001％w/w、w/v或v/v。

[1516] 在一些实施例中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度大于药物组合物的90％、80％、70％、60％、50％、40％、30％、20％、19.75％、19.50％、19.25％、19％、18.75％、18.50％、18.25％、18％、17.75％、17.50％、17.25％、17％、16.75％、16.50％、16.25％、16％、15.75％、15.50％、15.25％、15％、14.75％、14.50％、14.25％、14％、13.75％、13.50％、13.25％、13％、12.75％、12.50％、12.25％、12％、11.75％、11.50％、11.25％、11％、10.75％、10.50％、10.25％、10％、9.75％、9.50％、9.25％、9％、8.75％、8.50％、8.25％、8％、7.75％、7.50％、7.25％、7％、6.75％、6.50％、6.25％、6％、5.75％、5.50％、5.25％、5％、4.75％、4.50％、4.25％、4％、3.75％、3.50％、3.25％、3％、2.75％、2.50％、2.25％、2％、1.75％、1.50％、125％、1％、0.5％、0.4％、0.3％、0.2％、0.1％、0.09％、0.08％、0.07％、0.06％、0.05％、0.04％、0.03％、0.02％、0.01％、0.009％、0.008％、0.007％、0.006％、0.005％、0.004％、0.003％、0.002％、0.001％、0.0009％、0.0008％、0.0007％、0.0006％、0.0005％、0.0004％、0.0003％、0.0002％或0.0001％w/w、w/v或v/v。

[1517] 在一些实施例中，在本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度是在药物组合物的约0.0001％到约50％、约0.001％到约40％、约0.01％到约30％、约0.02％到约29％、约0.03％到约28％、约0.04％到约27％、约0.05％到约26％、约0.06％到约25％、约0.07％到约24％、约0.08％到约23％、约0.09％到约22％、约0.1％到约21％、约0.2％到约20％、约0.3％到约19％、约0.4％到约18％、约0.5％到约17％、约0.6％到约16％、约0.7％到约15％、约0.8％到约14％、约0.9％到约12％或约1％到约10％w/w、w/v或v/v的范围内。

[1518] 在一些实施例中，在本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度是在药物组合物的约0.001％到约10％、约0.01％到约5％、约0.02％到约4.5％、约0.03％到约4％、约0.04％

到约3.5%、约0.05%到约3%、约0.06%到约2.5%、约0.07%到约2%、约0.08%到约1.5%、约0.09%到约1%、约0.1%到约0.9%w/w、w/v或v/v的范围内。

[1519] 在一些实施例中，本发明的药物组合物中提供的TIL的量等于或小于10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g或0.0001g。

[1520] 在一些实施例中，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、2.5、3g、3.5、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g或10g。

[1521] 本发明的药物组合物中提供的TIL在广泛剂量范围内有效。确切的剂量将取决于施用途径、化合物的施用形式、待治疗个体的性别和年龄、待治疗个体的体重以及主治医师的偏好和经验。适当时还可以使用临床上确定的TIL剂量。使用本文中的方法施用的药物组合物的量(例如，TIL的剂量)将取决于所治疗的人类或哺乳动物、病症或病状的严重程度、施用速率、活性医药成分的处置和处方医师的判断。

[1522] 在一些实施例中，可以以单剂量形式施用TIL。可以通过注射，例如静脉内注射进行这种施用。在一些实施例中，可以以多个剂量形式施用TIL。给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。给药可以是每月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。只要必要，可以继续TIL的施用。

[1523] 在一些实施例中，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}和9×10^{13}。在一些实施例中，TIL的有效剂量在1×10^6到5×10^6、5×10^6到1×10^7、1×10^7到5×10^7、5×10^7到1×10^8、1×10^8到5×10^8、5×10^8到1×10^9、1×10^9到5×10^9、5×10^9到1×10^{10}、1×10^{10}到5×10^{10}、5×10^{10}到1×10^{11}、5×10^{11}到1×10^{12}、1×10^{12}到5×10^{12}和5×10^{12}到1×10^{13}的范围内。

[1524] 在一些实施例中，TIL的有效剂量在约0.01mg/kg到约4.3mg/kg、约0.15mg/kg到约3.6mg/kg、约0.3mg/kg到约3.2mg/kg、约0.35mg/kg到约2.85mg/kg、约0.15mg/kg到约2.85mg/kg、约0.3mg到约2.15mg/kg、约0.45mg/kg到约1.7mg/kg、约0.15mg/kg到约1.3mg/

kg、约0.3mg/kg到约1.15mg/kg、约0.45mg/kg到约1mg/kg、约0.55mg/kg到约0.85mg/kg、约0.65mg/kg到约0.8mg/kg、约0.7mg/kg到约0.75mg/kg、约0.7mg/kg到约2.15mg/kg、约0.85mg/kg到约2mg/kg、约1mg/kg到约1.85mg/kg、约1.15mg/kg到约1.7mg/kg、约1.3mg/kg mg到约1.6mg/kg、约1.35mg/kg到约1.5mg/kg、约2.15mg/kg到约3.6mg/kg、约2.3mg/kg到约3.4mg/kg、约2.4mg/kg到约3.3mg/kg、约2.6mg/kg到约3.15mg/kg、约2.7mg/kg到约3mg/kg、约2.8mg/kg到约3mg/kg或约2.85mg/kg到约2.95mg/kg的范围内。

[1525] 在一些实施例中,TIL的有效剂量在约1mg到约500mg、约10mg到约300mg、约20mg到约250mg、约25mg到约200mg、约1mg到约50mg、约5mg到约45mg、约10mg到约40mg、约15mg到约35mg、约20mg到约30mg、约23mg到约28mg、约50mg到约150mg、约60mg到约140mg、约70mg到约130mg、约80mg到约120mg、约90mg到约110mg或约95mg到约105mg、约98mg到约102mg、约150mg到约250mg、约160mg到约240mg、约170mg到约230mg、约180mg到约220mg、约190mg到约210mg、约195mg到约205mg或约198到约207mg的范围内。

[1526] 可以通过具有类似实用程序的公认药剂施用模式中的任一种,包含鼻内和经皮途径、通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、局部、通过移植或通过吸入以单剂量或多个剂量形式施用有效量的TIL。

[1527] 在另一个实施例中,本发明提供了一种输注袋,其包括如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体。

[1528] 在另一个实施例中,本发明提供了一种肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)组合物,其包括如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体和药学上可接受的载体。

[1529] 在另一个实施例中,本发明提供了一种输注袋,其包括如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物。

[1530] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体的低温保存制剂。

[1531] 在另一个实施例中,本发明提供了一种肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)组合物,其包括如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体和低温保存培养基。

[1532] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物,其被修改成使得低温保存培养基含有DMSO。

[1533] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物,其被修改成使得低温保存培养基含有7-10%DMSO。

[1534] 在另一个实施例中,本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物的低温保存制剂。

[1535] IV.治疗患者的方法

[1536] 以最初的TIL收集和TIL培养开始治疗方法。此类方法均由例如Jin等人,《免疫治疗学杂志》,2012,35(3):283-292描述于本领域中,所述文献通过引用整体并入本文。在下文的整个章节(包含实例)中描述治疗方法的实施例。

[1537] 根据本文所述的方法(包含例如上文步骤A到F所描述或根据上文步骤A到F(还如例如在图1(具体地,例如图1B)中所示))产生的扩增TIL在治疗患有癌症的患者中具有特定用途(例如,如Goff等人,《临床肿瘤学杂志》,2016,34(20):2389-239,以及补充内容中所描述;所述文献通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,如先前所描述从切除的转移性黑

素瘤沉积物中生长TIL(参见Dudley等人,《免疫治疗学杂志》,2003,26:332-342;所述文献通过引用整体并入本文)。可以在无菌条件下切分新鲜肿瘤。可以收集代表性样品以用于正式病理性分析。可以使用2mm^{3}到3mm^{3}的单一碎片。在一些实施例中,获得每名患者5、10、15、20、25或30个样品。在一些实施例中,获得每名患者20、25或30个样品。在一些实施例中,获得每名患者20、22、24、26或28个样品。在一些实施例中,获得每名患者24个样品。可以将样品放入24孔板的单独孔中,保持在具有高剂量IL-2(6,000IU/mL)的生长培养基中,并监测肿瘤的破坏和/或TIL的增殖。如本文所述,可以将处理之后剩余有活细胞的任何肿瘤酶促消化成单一细胞悬浮液并低温保存。

[1538] 在一些实施例中,可以对成功生长的TIL进行采样以用于表型分析(CD3、CD4、CD8和CD56),并在可用时针对自体肿瘤进行测试。如果过夜共培养产生>200pg/mL和两倍背景的干扰素-γ(IFN-γ)水平,则可以认为TIL具有反应性。(Goff等人,《免疫治疗学杂志》,2010,33:840-847;所述文献通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,可以选择具有自体反应性或足够生长模式的证据的培养物用于第二扩增(例如,如根据图1(具体地,例如,图1B)的步骤D提供的第二扩增),包含有时被称为快速扩增(REP)的第二扩增。在一些实施例中,选择具有较高自体反应性(例如,在第二扩增期间的高增殖)的扩增TIL用于另外的第二扩增。在一些实施例中,选择具有高自体反应性(例如,在如图1(具体地,例如,图1B)的步骤D中提供的第二扩增期间的高增殖)的TIL用于根据图1的步骤D(具体地,例如,图1B)的另外的第二扩增。

[1539] 在一些实施例中,患者不直接移到ACT(过继性细胞转移),例如,在一些实施例中,在肿瘤采集和/或第一扩增后,不立即利用细胞。在一些实施例中,TIL可以在向患者施用之前2天低温保存并解冻。在一些实施例中,TIL可以在向患者施用之前1天低温保存和解冻。在一些实施例中,TIL可以在向患者施用之前立即低温保存和解冻。

[1540] 可以通过针对表面标志物CD3、CD4、CD8、CCR7和CD45RA(BD生物科学公司)进行流式细胞术(例如,FlowJo),以及通过本文所述的任何方法来分析输注袋TIL的低温保存样品的细胞表型。通过使用标准的酶联免疫吸附分析技术测量血清细胞因子。血清IFN-g升高限定为>100pg/mL并且大于4 3个基线水平。

[1541] 在一些实施例中,通过本文提供的方法产生的TIL,例如在图1(具体地,例如,图1B)中例示的那些,提供了在TIL的临床功效方面的令人惊讶的改善。在一些实施例中,通过本文提供的方法产生的TIL,例如图1(具体地,例如,图1B)中例示的那些,与通过除了本文所述的方法之外的方法,包含例如除了图1(具体地,例如,图1B)中例示的那些的方法产生的TIL相比,表现出增加的临床功效。在一些实施例中,除了本文所述的那些以外的方法包含称为工艺1C和/或第1代(Gen 1)的方法。在一些实施例中,通过DCR、ORR和/或其它临床反应测量增加的功效。在一些实施例中,通过本文提供的方法产生的TIL,例如在图1(具体地,例如,图1B)中例示的那些,与通过除了本文所述的方法之外的方法(包含例如除了图1(具体地,例如,图1B)中例示的方法之外的方法,例如Gen 1工艺)产生的TIL相比,表现出类似的应答时间和安全性曲线。

[1542] 在一些实施例中,IFN-γ(IFN-γ)指示治疗功效和/或增加的临床功效。在一些实施例中,用TIL治疗的受试者血液中的IFN-γ指示活性TIL。在一些实施例中,采用了IFN-γ产生的效力测定。IFN-γ产生是细胞毒性潜力的另一种量度。IFN-γ产生可以通过确定用

本发明的方法制备的TIL治疗的受试者的离体的血液、血清或TIL中的细胞因子IFN-γ的水平来测量，包含如例如在图1(具体地，例如，图1B)中描述的那些。在一些实施例中，IFN-γ的增加指示用通过本发明的这些方法产生的TIL治疗的患者的治疗功效。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ增加一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加一倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加两倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加三倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加四倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加五倍。在一些实施例中，使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施例中，在用通过本发明的方法制备的TIL治疗的受试者的离体的TIL中测量IFN-γ，包含如例如在图1(具体地，例如，图1B)中描述的那些。在一些实施例中，在用通过本发明的方法制备的TIL治疗的受试者的血液中测量IFN-γ，包含如例如在图1(具体地，例如，图1B)中描述的那些。在一些实施例中，在用通过本发明的方法制备的TIL治疗的受试者的TIL血清中测量IFN-γ，包含如例如在图1(具体地，例如，图1B)中描述的那些。

[1543] 在一些实施例中，通过本发明方法(包含例如，图1(具体地，例如，图1B)中所描述的方法)制备的TIL与由其它方法(包含未在图1(具体地，例如，图1B)中例示的方法，例如称为工艺1C方法的方法)产生的TIL相比，展现出增加的多克隆性。在一些实施例中，显著提高的多克隆性和/或增加的多克隆性指示治疗功效和/或增加的临床功效。在一些实施例中，多克隆性是指T细胞库多样性。在一些实施例中，多克隆性的增加可以指示关于施用由本发明方法产生的TIL的治疗功效。在一些实施例中，与使用除了本文提供的方法之外的方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL相比，多克隆性增加一倍、两倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加一倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加两倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加十倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中

体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加100倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1(具体地,例如,图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加500倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1(具体地,例如,图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加1000倍。

[1544] 功效的量度可以包含疾病控制速率(DCR)以及总体应答率(ORR),如本领域已知以及本文所述。

[1545] 1.治疗癌症和其它疾病的方法

[1546] 本文所述的组合物和方法可以用于治疗疾病的方法。在实施例中,所述组合物和方法用于治疗过度增殖性病症。所述组合物和方法还可以用于治疗如本文和以下段落中描述的其它病症。

[1547] 在一些实施例中,过度增殖性病症是癌症。在一些实施例中,过度增殖性病症是实体瘤癌症。在一些实施例中,实体瘤癌症选自由以下组成的组:成胶质细胞瘤(GBM)、胃肠癌、黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、肾癌和肾细胞癌。在一些实施例中,过度增殖性病症是恶性血液病。在一些实施例中,实体瘤癌症选自由以下组成的组:慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和套细胞淋巴瘤。

[1548] 在一些实施例中,癌症是高突变癌症表型。在Campbell等人中广泛描述了高突变癌症(《细胞(Cell)》,171:1042-1056(2017);所述文献出于所有目的通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,高突变肿瘤包括9到10个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,小儿高突变肿瘤包括9.91个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,成人高突变肿瘤包括9个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,增强的高突变肿瘤包括10到100个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,增强的儿科高突变肿瘤包括10到100个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,增强的成人高突变肿瘤包括10到100个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,超高突变肿瘤包括包括大于100个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,小儿超高突变肿瘤包括大于100个突变每兆碱基(Mb)。在一些实施例中,成人超高突变肿瘤包括大于100个突变每兆碱基(Mb)。

[1549] 在一些实施例中,高突变肿瘤在复制修复途径中具有突变。在一些实施例中,高突变肿瘤在复制修复相关DNA聚合酶中具有突变。在一些实施例中,高突变肿瘤具有微卫星不稳定性。在一些实施例中,超高突变肿瘤在复制修复相关DNA聚合酶中具有突变并且具有微卫星不稳定性。在一些实施例中,肿瘤中的高突变与对免疫检查点抑制剂的应答相关。在一些实施例中,高突变肿瘤对免疫检查点抑制剂的治疗具有抗性。在一些实施例中,可以使用本发明的TIL治疗高突变肿瘤。在一些实施例中,肿瘤中的高突变是由环境因素(外源性暴露)引起的。例如,UV光可以是恶性黑素瘤中大量突变的主要原因(参见例如,Pfeifer,G.P.,You,Y.H.和Besaratinia,A.(2005).《突变研究(Mutat.Res.)》571,19-31.;Sage,E.(1993).《光化学与光生物(Photochem.Photobiol.)》57,163-174.)。在一些实施例中,由于直接诱变剂暴露,肿瘤中的高突变可以由肺和喉肿瘤以及其它肿瘤的烟草烟雾中多于60种

致癌物引起(参见例如,Pleasance,E.D.、Stephens,P.J.、O'Meara,S.、McBride,D.J.、Meynert,A.、Jones,D.、Lin,M.L.、Beare,D.、Lau,K.W.、Greenman,C.等人,(2010).《自然(Nature)》463,184-190)。在一些实施例中,肿瘤中的高突变是由载脂蛋白B mRNA编辑酶、催化性多肽样(APOBEC)家族成员的失调引起的,这已经显示在广泛范围的癌症中导致C到T转换水平增加(参见例如,Roberts,S.A.、Lawrence,M.S.、Klimczak,L.J.、Grimm,S.A.、Fargo,D.、Stojanov,P.、Kiezun,A.、Kryukov,G.V.、Carter,S.L.、Saksena,G.等人(2013).《自然遗传学(Nat.Genet.)》45,970-976)。在一些实施例中,肿瘤中的高突变是由损害校正的突变引起的有缺陷的DNA复制修复引起的,所述DNA复制修复是由主要复制酶Pol3和Pold1进行的。在一些实施例中,肿瘤中的高突变是由DNA错配修复的缺陷引起的,所述缺陷与结肠直肠癌、子宫内膜癌和其它癌症中的高突变相关(参见例如,Kandoth,C.、Schultz,N.、Cherniack,A.D.、Akbani,R.、Liu,Y.、Shen,H.、Robertson,A.G.、Pashtan,I.、Shen,R.、Benz,C.C.等人;(2013).《自然》497,67-73.;Muzny,D.M.、Bainbridge,M.N.、Chang,K.、Dinh,H.H.、Drummond,J.A.、Fowler,G.、Kovar,C.L.、Lewis,L.R.、Morgan,M.B.、Newsham,I.F.等人;(2012).《自然》487,330-337)。在一些实施例中,DNA复制修复突变还发现于癌症易感综合征中,如组成性或双等位基因错配修复缺陷(CMMRD)、林奇综合征(Lynch syndrome)和聚合酶校正相关息肉病(PPAP)。

[1550] 在实施例中,本发明包含用TIL群体治疗癌症的方法,其中所述癌症是高突变癌症。在实施例中,本发明包含用TIL群体治疗癌症的方法,其中所述癌症是增强的高突变癌症。在实施例中,本发明包含用TIL群体治疗癌症的方法,其中所述癌症是超高突变癌症。

[1551] 在实施例中,本发明包含用TIL群体治疗癌症的方法,其中在输注根据本公开的TIL之前,用非清髓性化学疗法对患者进行预治疗。在实施例中,非清髓性化学疗法是环磷酰胺60mg/kg/d持续2天(在TIL输注之前的第27天和第26天)和氟达拉宾25mg/m^2/d持续5天(TIL输注之前的第27天到第23天)。在实施例中,在非清髓性化学疗法和根据本公开的TIL输注(第0天)之后,患者每8小时静脉内接受720,000IU/kg IL-2的静脉内输注达至生理耐受。

[1552] 可以使用本领域已知的各种模型测试本文所述的化合物和化合物组合在治疗、预防和/或管理所指示的疾病或病症中的功效,所述模型为人类疾病治疗提供指导。例如,用于确定卵巢癌的治疗功效的模型描述于例如Mullany等人,《内分泌学(Endocrinology)》2012,153,1585-92;和Fong等人,《卵巢研究杂志(J.Ovarian Res.)》2009,2,12中。用于确定治疗胰腺癌的功效的模型描述于Herreros-Villanueva等人,《世界胃肠病学杂志(World J.Gastroenterol.)》2012,18,1286-1294中。用于确定治疗乳腺癌的功效的模型描述于例如Fantozzi,《乳腺癌研究(Breast Cancer Res.)》2006,8,212中。用于确定治疗黑素瘤的功效的模型描述于Damsky等人,《颜料细胞和黑素瘤研究(Pigment Cell&Melanoma Res.)》2010,23,853-859中。用于确定治疗肺癌的功效的模型描述于例如Meuwissen等人,《基因与发育(Genes&Development)》2005,19,643-664中。用于确定治疗肺癌的功效的模型描述于例如Kim,《临床和实验耳鼻喉学(Clin.Exp.Otorhinolaryngol.)》2009,2,55-60;以及Sano,《头颈肿瘤学(Head Neck Oncol.)》2009,1,32。

[1553] 在一些实施例中,IFN-γ(IFN-γ)指示过度增殖性病症治疗的治疗功效。在一些实施例中,用TIL治疗的受试者血液中的IFN-γ指示活性TIL。在一些实施例中,采用了IFN-

γ产生的效力测定。IFN-γ产生是细胞毒性潜力的另一种量度。IFN-γ产生可以通过确定用本发明的方法制备的TIL治疗的受试者的血液中的细胞因子IFN-γ的水平来测量，包含如例如在图1(具体地，例如，图1B)中描述的那些。在一些实施例中，与用使用被称为Gen 3工艺的方法(如在图1(具体地，例如，图1B)和贯穿本申请例示的方法)制备的TIL治疗的受试者相比，通过本发明方法获得的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。在一些实施例中，IFN-γ的增加指示用通过本发明的这些方法产生的TIL治疗的患者的治疗功效。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ增加一倍、两倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加一倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加两倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加三倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加四倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，IFN-γ分泌增加五倍。在一些实施例中，使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施例中，使用Quantikine ELISA试剂盒测量IFN-γ。在一些实施例中，在离体来自用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者的TIL中测量IFN-γ。在一些实施例中，在用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者的血液中测量IFN-γ。在一些实施例中，在用通过本发明的方法产生的TIL治疗的患者的血清中测量IFN-γ。

[1554] 在一些实施例中，通过本发明方法(包含例如，图1(具体地，例如，图1B)中所描述的方法)制备的TIL与由其它方法(包含未在图1(具体地，例如，图1B)中例示的方法，例如称为工艺1C方法的方法)产生的TIL相比，展现出增加的多克隆性。在一些实施例中，显著提高的多克隆性和/或增加的多克隆性指示癌症治疗的治疗功效和/或增加的临床功效。在一些实施例中，多克隆性是指T细胞库多样性。在一些实施例中，多克隆性的增加可以指示关于施用由本发明方法产生的TIL的治疗功效。在一些实施例中，与使用除了本文提供的方法之外的方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL相比，多克隆性增加一倍、两倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加一倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比，多克隆性增加两倍。在一些实施例中，与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如，除了图1(具体地，例如，图1B)中体现的方法之外的

方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加十倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1(具体地,例如,图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加100倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1(具体地,例如,图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加500倍。在一些实施例中,与未治疗的患者相比和/或与用使用除了本文提供的方法之外的其它方法(包含例如,除了图1(具体地,例如,图1B)中体现的方法之外的方法)制备的TIL治疗的患者相比,多克隆性增加1000倍。

[1555] 2.共同施用的方法

[1556] 在一些实施例中,如本文所述产生的TIL(包含例如源自图1(具体地,例如,图1B)的步骤A到F中所描述的方法的TIL)可以与一种或多种免疫检查点调节剂(如以下所描述的抗体)组合施用。例如,靶向PD-1并且可以与本发明的TIL共同施用的抗体包含例如但不限于纳武单抗(BMS-936558,百时美施贵宝公司;Opdivo®)、派姆单抗(兰伯丽珠单抗,MK03475或MK-3475,默克公司;Keytruda®)、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、人源化抗PD-1抗体JS001(上海君士公司)、单克隆抗PD-1抗体TSR-042(Tesaro公司)、皮地利珠单抗(抗PD-1 mAb CT-011,麦迪韦逊医疗公司)、抗PD-1单克隆抗体BGB-A317(百济神州公司)和/或抗PD-1抗体SHR-1210(上海恒瑞公司)、人单克隆抗体REGN2810(再生元公司)、人单克隆抗体MDX-1106(百时美施贵宝公司)和/或人源化抗PD-1 IgG4抗体PDR001(诺华公司)。在一些实施例中,PD-1抗体来自克隆:RMP1-14(大鼠IgG)-BioXcell目录号BP0146。适用于与根据如本文所述的步骤A到F产生的TIL共同施用方法的其它合适的抗体是美国专利第8,008,449号中公开的抗PD-1抗体,所述美国专利通过引用并入本文。在一些实施例中,抗体或其抗原结合部分与PD-L1特异性结合并抑制其与PD-1的相互作用,从而增加免疫活性。本领域已知的与PD-L1结合并且破坏PD-1与PD-L1之间的相互作用并且刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适用于与根据如本文所述的步骤A到F产生的TIL共同施用方法中。例如,靶向PD-L1并处于临床试验中的抗体包含BMS-936559(百时美施贵宝公司)和MPDL3280A(基因泰克公司)。靶向PD-L1的其它合适的抗体公开于美国专利第7,943,743号中,所述美国专利通过引用并入本文。本领域的普通技术人员将理解的是,与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并且刺激抗肿瘤免疫应答的任何抗体适用于与根据如本文所述的步骤A到F产生的TIL共同施用方法中。在一些实施例中,当患者患有对于单独施用抗PD-1抗体是难治的癌症类型时,将施用根据步骤A到F产生的TIL的组合的受试者与抗PD-1抗体共同施用。在一些实施例中,当患者患有难治性黑素瘤时,向患者施用TIL与抗PD-1的组合。在一些实施例中,当患者患有非小细胞肺癌(NSCLC)时,向患者施用TIL与抗PD-1的组合。

[1557] 3.任选的对患者的淋巴细胞耗减预处理

[1558] 在实施例中,本发明包含用TIL群体治疗癌症的方法,其中在输注根据本公开的TIL之前,用非清髓性化学疗法对患者进行预治疗。在实施例中,本发明包含用于治疗患者的癌症的TIL群体,所述患者已经用非清髓性化学疗法进行预治疗。在实施例中,通过输注施用TIL群体。在实施例中,非清髓性化学疗法是环磷酰胺60mg/kg/d持续2天(在TIL输注之前的第27天和第26天)和氟达拉宾25mg/m^2/d持续5天(TIL输注之前的第27天到第23天)。在实施例中,在非清髓性化学疗法和根据本公开的TIL输注(第0天)之后,患者每8小时静脉内

接受720,000IU/kg IL-2(阿地白介素,可作为PROLEUKIN商购获得)的静脉内输注达至生理耐受。在某些实施例中,TIL群体与IL-2组合用于治疗癌症,其中IL-2是在TIL群体之后施用。

[1559] 实验结果表明,在过继性转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前,淋巴细胞耗减通过消除调节T细胞和免疫系统的竞争要素("细胞因子库")在增强治功效果中发挥关键作用。因此,在引入本发明的TIL之前,本发明的一些实施例对患者使用淋巴细胞耗减步骤(有时也称为"免疫抑制调节")。

[1560] 通常,使用使用氟达拉宾或环磷酰胺(称为马磷酰胺的活性形式)及其组合来实现淋巴细胞耗减。此类方法描述于Gassner等人,《癌症免疫学与免疫治疗学(Cancer Immunol.Immunother.)》2011,60,75-85;Muranski等人,《自然临床实践肿瘤学(Nat.Clin.Pract.Oncol.)》2006,3,668-681;Dudley等人,《临床肿瘤学杂志》2008,26,5233-5239以及Dudley等人,《临床肿瘤学杂志》2005,23,2346-2357,所有所述文献通过引用整体并入本文。

[1561] 在一些实施例中,以0.5μg/mL-10μg/mL氟达拉宾的浓度施用氟达拉宾。在一些实施例中,以1μg/mL氟达拉宾的浓度施用氟达拉宾。在一些实施例中,施用氟达拉宾治疗1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些实施例中,以每天10mg/kg、每天15mg/kg、每天20mg/kg、每天25mg/kg、每天30mg/kg、每天35mg/kg、每天40mg/kg或每天45mg/kg的剂量施用氟达拉宾。在一些实施例中,以每天35mg/kg施用氟达拉宾治疗2-7天。在一些实施例中,以每天35mg/kg施用氟达拉宾治疗4-5天。在一些实施例中,以每天25mg/kg施用氟达拉宾治疗4-5天。

[1562] 在一些实施例中,通过施用环磷酰胺获得浓度为0.5μg/mL-10μg/mL的马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)。在一些实施例中,通过施用环磷酰胺获得浓度为1μg/mL的马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)。在一些实施例中,施用环磷酰胺治疗1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些实施例中,以100毫克/m^2/天、150毫克/m^2/天、175毫克/m^2/天、200毫克/m^2/天、225毫克/m^2/天、250毫克/m^2/天、275毫克/m^2/天或300毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺。在一些实施例中,静脉内(即,i.v.)施用环磷酰胺。在一些实施例中,以每天35mg/kg施用环磷酰胺治疗2-7天。在一些实施例中,以每天250毫克/m^2/天静脉内施用环磷酰胺治疗4-5天。在一些实施例中,以每天250毫克/m^2/天静脉内施用环磷酰胺治疗4天。

[1563] 在一些实施例中,通过向患者一起施用氟达拉宾和环磷酰胺而进行淋巴细胞耗减。在一些实施例中,在4天内以每天25毫克/m^2/天静脉内施用氟达拉宾并且以每天250毫克/m^2/天静脉内施用环磷酰胺。

[1564] 在实施例中,通过以每天60毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺两天,接着以每天25毫克/m^2/天的剂量施用氟达拉宾五天来进行淋巴细胞耗减。

[1565] 4.IL-2方案

[1566] 在实施例中,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性TIL群体的治疗有效部分之后的那天开始静脉内施用的阿地白介素或生物类似物或其变体,其中阿地白介素或生物类似物或其变体以0.037mg/kg或0.044mg/kg IU/kg(患者体重)的剂量施用,每八小时使用15分钟团注静脉内输注直到耐受,持续最多14个剂量。休息9天后,可以重复进行另外14个剂量的方案,总共最多28个剂量。

[1567] 在实施例中，IL-2方案包括递减型IL-2方案。递减型IL-2方案已经描述于O'Day等人，《临床肿瘤学杂志》1999,17,2752-61和Eton等人，《癌症(Cancer)》2000,88,1703-9中，所述文献的公开内容通过引用并入本文。在实施例中，递减型IL-2方案包括在6小时内静脉内施用18×10^6IU/m^2、接着在12小时内静脉内施用18×10^6IU/m^2、接着在24小时内静脉内施用18×10^6IU/m^2、接着在72小时内静脉内施用4.5×10^6IU/m^2。每28天可以重复进行这个治疗周期，持续最多四个周期。在实施例中，递减型IL-2方案包括在第1天的18,000,000IU/m^2、在第2天的9,000,000IU/m^2，以及在第3天和第4天的4,500,000IU/m^2。

[1568] 在实施例中，IL-2方案包括每1天、每2天、每4天、每6天、每7天、每14天或每21天以0.10毫克/天到50毫克/天的剂量施用聚乙二醇化IL-2。

[1569] 5.过继性细胞转移

[1570] 过继性细胞转移(ACT)是一种非常有效的免疫疗法形式并且涉及将具有抗肿瘤活性的免疫细胞转移到癌症患者中。ACT是一种治疗方法，其涉及体外鉴定具有抗肿瘤活性的淋巴细胞，在体外将这些细胞扩增到大量并且将其输注到携带癌症的宿主中。用于过继性转移的淋巴细胞可以源自切除肿瘤(肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)的基质。ACT的TIL可以如本文所述制备。在一些实施例中，TIL是例如根据图1(具体地，例如，图1B)中描述的方法制备的。如果其被基因工程化以表达抗肿瘤T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)、富集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源性肽克隆，则其还可以源自或来自血液。淋巴细胞来源于待输注的携带癌症的宿主的ACT被称为自体ACT。美国公开第2011/0052530号涉及一种用于进行过继性细胞疗法以促进癌症消退的方法，所述方法主要用于治疗患有转移性黑素瘤的患者，所述美国公开通过引用整体并入本文。在一些实施例中，可以如本文所述施用TIL。在一些实施例中，可以以单剂量形式施用TIL。可以通过注射，例如静脉内注射进行这种施用。在一些实施例中，可以以多剂量形式施用TIL和/或细胞毒性淋巴细胞。给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或多于六次。给药可以是每月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。只要必要，可以继续TIL和/或细胞毒性淋巴细胞的施用。

[1571] 6.另外的治疗方法

[1572] 在另一个实施例中，本发明提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体。

[1573] 在另一个实施例中，本发明提供了一种用于治疗患有癌症的受试者的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物。

[1574] 在另一个实施例中，本发明提供了一种用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得在分别施用治疗有效剂量的如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体和TIL组合物之前，已经向受试者施用非清髓性淋巴细胞耗减方案。

[1575] 在另一个实施方案中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得非清髓性淋巴细胞耗减方案包括以下步骤：以60毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天，随后以25毫克/m^2/天的剂量施用氟

达拉滨持续五天。

[1576] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成进一步包括在向受试者施用TIL细胞后的那天开始用高剂量IL-2方案治疗受试者的步骤。

[1577] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得高剂量IL-2方案包括每八小时以15分钟团注静脉内输注施用600,000或720,000IU/kg，直到耐受为止。

[1578] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是实体瘤。

[1579] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌或肾细胞癌。

[1580] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是黑素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包含GBM)和胃肠癌。

[1581] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是黑素瘤。

[1582] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是HNSCC。

[1583] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是宫颈癌。

[1584] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是NSCLC。

[1585] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是成胶质细胞瘤(包含GBM)。

[1586] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是胃肠癌。

[1587] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是高突变癌症。

[1588] 在另一个实施例中，本发明提供了用于治疗患有如以上适用的前述段落中任一段所述的癌症的受试者的方法，所述方法被修改成使得癌症是小儿高突变癌症。

[1589] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体，其用于治疗患有癌症的受试者的方法中，所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群体。

[1590] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物，其用于治疗患有癌症的受试者的方法中，所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的TIL组合物。

[1591] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性

TIL群体或如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物，其被修改成使得在向受试者施用治疗有效剂量的如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物之前，已经向受试者施用非清髓性淋巴细胞耗减方案。

[1592] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得非清髓性淋巴细胞耗减方案包括以下步骤：以60毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天，随后以25毫克/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天。

[1593] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成进一步包括在向患者施用TIL细胞之后的那天开始用高剂量IL-2方案治疗患者的步骤。

[1594] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得高剂量IL-2方案包括每八小时以15分钟团注静脉内输注形式施用600,000或720,000IU/kg，直到耐受为止。

[1595] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是实体瘤。

[1596] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌或肾细胞癌。

[1597] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是黑素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包含GBM)和胃肠癌。

[1598] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是黑素瘤。

[1599] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是HNSCC。

[1600] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是宫颈癌。

[1601] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是NSCLC。

[1602] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是成胶质细胞瘤(包含GBM)。

[1603] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是胃肠癌。

[1604] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是高突变癌症。

[1605] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物，其被修改成使得癌症是小儿高突变癌症。

[1606] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体在治疗受试者的癌症的方法中的用途，所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群体。

[1607] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物在治疗受试者的癌症的方法中的用途，所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的TIL组合物。

[1608] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物在治疗受试者的癌症的方法中的用途，所述方法包括向受试者施用非清髓性淋巴细胞耗减方案，并且然后向受试者施用治疗有效剂量的如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或治疗有效剂量的如以上适用的前述段落中任一段所述的TIL组合物。

[1609] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得非清髓性淋巴细胞耗减方案包括以下步骤：以60毫克/m^2/天的剂量施用环磷酰胺持续两天，随后以25毫克/m^2/天的剂量施用氟达拉滨持续五天。

[1610] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成进一步包括在向患者施用TIL细胞之后的那天开始用高剂量IL-2方案治疗患者的步骤。

[1611] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得高剂量IL-2方案包括每八小时以15分钟团注静脉内输注形式施用600,000或720,000IU/kg，直到耐受为止。

[1612] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是实体瘤。

[1613] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人类乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌(包含头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、成胶质细胞瘤(包含GBM)、胃肠癌、肾癌或肾细胞癌。

[1614] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是黑素瘤、HNSCC、宫颈癌、NSCLC、成胶质细胞瘤(包含GBM)和胃肠癌。

[1615] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是黑素瘤。

[1616] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是HNSCC。

[1617] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是宫颈癌。

[1618] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是NSCLC。

[1619] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性

TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是成胶质细胞瘤(包含GBM)。

[1620] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是胃肠癌。

[1621] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是高突变癌症。

[1622] 在另一个实施例中，本发明提供了如以上适用的前述段落中任一段所述的治疗性TIL群体或TIL组合物的用途，其被修改成使得癌症是小儿高突变癌症。

[1623] 实例

[1624] 现在参考以下实例描述本文所涵盖的实施例。提供这些实例仅是为了说明目的，并且本文所涵盖的公开内容绝不应理解为限制于这些实例，而应理解为涵盖由于本文提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[1625] 实例1：用于REP前和REP工艺的培养基的制备

[1626] 本实例描述了用于制备组织培养基的方法，所述组织培养基用于涉及培养源自各种肿瘤类型的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方案，所述肿瘤类型包含但不限于转移性黑素瘤、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、三阴性乳腺癌和肺腺癌。此培养基可以用于制备在本申请和实例中描述的任一种TIL。

[1627] CM1的制备

[1628] 从冷藏中去除以下试剂并且将其在37℃水浴：(RPMI1640，人类AB血清，200mM L-谷氨酰胺)中温热。根据下表19通过将每种成分添加到适合于待过滤的体积的0.2μm过滤器单元的顶部部分中来制备CM1培养基。储存于4℃下。

[1629] 表19：CM1的制备

[1630]

成分	最终浓度	最终体积500ml	最终体积1L
RPMI1640	NA	450ml	900ml
人类AB血清，热灭活10%	50ml	100ml	
200mM L-谷氨酰胺	2mM	5ml	10ml
55mM BME	55μM	0.5ml	1ml
50mg/ml硫酸庆大霉素	50μg/ml	0.5ml	1ml

[1631] 在使用当天，在37℃水浴中预温热所需量的CM1并且添加6000IU/ml IL-2。

[1632] 视需要根据表20进行另外的补充。

[1633] 表20：视需要对CM1进行另外的补充。

[1634]

补充物	**储备浓度**	**稀释度**	**最终浓度**
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
青霉素/链霉素	10,000 U/ml 青霉素 10,000 μg/ml 链霉素	1:100	100 U/ml 青霉素 100 μg/ml 链霉素
两性霉素 B	250 μg/ml	1:100	2.5 μg/ml

[1635] CM2的制备

[1636] 根据上表19从冰箱中去除所制备的CM1或制备新鲜的CM1。从冰箱中去除AIM-V®并且通过将所制备的CM1与等体积的AIM-V®混合在无菌培养基瓶子中来制备所需量的CM2。在使用当天，将3000IU/ml IL-2添加到CM2培养基中。在使用当天，制得足够量的具有3000IU/ml IL-2的CM2。用CM2培养基瓶子的名称、制备者姓名的首字母、过滤/制备的日期、

两周有效期来标记所述培养基瓶子，并且储存在4℃下直到组织培养需要。

[1637] CM3的制备

[1638] 在需要使用的当天制备CM3。CM3与AIM-V®培养基相同，在使用当天补充有3000IU/mlIL-2。通过将IL-2储备溶液直接添加到AIM-V瓶子或袋子中来制备足以满足实验需要的一定量CM3。通过轻微振荡进行充分混合。在添加到AIM-V中之后立即用“3000IU/ml IL-2”标记瓶子。如果存在过量CM3，则将其存储在4℃的瓶子中，所述瓶子用培养基名称、制备者姓名的首字母、制备培养基的日期和其有效期(制备之后7天)进行标记。在4℃下存储7天之后，丢弃补充有IL-2的培养基。

[1639] CM4的制备

[1640] CM4与CM3相同，但另外补充有2mM GlutaMAX™(最终浓度)。对于每1L CM3，添加10ml的200mM GlutaMAX™。通过将IL-2储备溶液和GlutaMAX™储备溶液直接添加到AIM-V的瓶子或袋子中来制备足以满足实验需要的一定量CM4。通过轻微振荡进行充分混合。在添加到AIM-V中之后立即用“3000IL/ml IL-2和GlutaMAX”标记瓶子。如果存在过量CM4，则将其存储在4℃的瓶子中，所述瓶子用培养基名称、“GlutaMAX”和其有效期(制备之后7天)标记。在4℃下存储7天之后，丢弃补充有IL-2的培养基。

[1641] 实例2:IL-2、IL-15和IL-21细胞因子混合物的用途

[1642] 本实例描述了与实例A到G的TIL工艺组合使用IL-2、IL-15和IL-21细胞因子，其充当另外的T细胞生长因子。

[1643] 使用本文所述的工艺，在实验的一个组中在存在IL-2的情况下并且在启动培养时在另一个组中用IL-2、IL-15和IL-21的组合代替IL-2的情况下从结肠直肠肿瘤、黑素瘤肿瘤、宫颈肿瘤、三阴性乳腺肿瘤、肺肿瘤和肾肿瘤生长TIL。在完成REP前时，评估培养物的扩增、表型、功能(CD107a+和IFN-γ)和TCR Vβ库。IL-15和IL-21描述于本文中的其它地方和Gruijl等人，IL-21有助于具有高细胞毒性潜力的CD27+CD28+肿瘤浸润淋巴细胞的扩增和调节T细胞的低附带扩增;Santegoets,S.J.,《转化医学杂志(J Transl Med.)》,2013,11:37(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/)中。

[1644] 结果显示，相对于仅IL-2的条件，在多种组织学中观察到IL-2、IL-15和IL-21处理的条件下的$CD4^+$和$CD8^+$细胞两者中的TIL扩增增强(>20%)。相对于仅IL-2的培养，在从IL-2、IL-15和IL-21处理的培养中获得的TIL中，偏向存在具有偏向TCR Vβ库的主要$CD8^+$群体。相比仅IL-2处理的TIL，在IL-2、IL-15和IL-21处理的TIL中，IFN-γ和CD107a升高。

[1645] 实例3:IL-2储备溶液的制备(CELLGENIX)

[1646] 本实例描述了将纯化冻干的重组人白介素-2溶解到适用于进一步组织培养方案中的储备样品中的工艺，包含本申请和实例中描述的所有那些，包含涉及使用rhIL-2的那些。

[1647] 程序

[1648] 制备0.2%乙酸溶液(HAc)。将29mL无菌水转移到50mL锥形管中。将1mL 1N乙酸添加到50mL锥形管中。通过倒置试管2-3次进行充分混合。通过使用Steriflip过滤器过滤来对HAc溶液进行灭菌。

[1649] 制备含1%HSA的PBS。将4mL的25%HSA储备溶液添加到150mL无菌过滤器单元中的96mL PBS中。过滤溶液。储存于4℃下。对于所制备的rhIL-2的每个小瓶，填写表格。

[1650] 制备rhIL-2储备溶液(6×10^6IU/mL最终浓度)。每个批次的rhIL-2均不同,并且需要在制造商的分析证书(COA)中找到的信息,如:1)每小瓶rhIL-2的质量(mg)、2)rhIL-2的比活性(IU/mg)和3)建议的0.2%HAc重构体积(mL)。

[1651] 通过使用以下等式计算rhIL-2批次所需的1%HSA的体积:

[1652] $$\left(\frac{小瓶质量\ (mg)\ x\ 生物活性\ (\frac{IU}{mg})}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc体积\ (mL) = 1\%\ HSA体积\ (mL)$$

[1653] 例如,根据CellGenix's rhIL-2批次10200121 COA,1mg小瓶的比活性为25×10^6IU/mg。

[1654] 建议在2mL 0.2%HAc中重构rhIL-2。

[1655] $$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[1656] 用乙醇擦拭物擦拭IL-2小瓶的橡胶塞。使用连接到3mL注射器的16G针,将建议的0.2%HAc体积注射到小瓶中。注意不要在抽出针头时取出塞子。倒置小瓶3次并涡旋直到所有粉末溶解。小心地去除塞子并搁置在乙醇擦拭物上。将所计算的1%HSA体积添加到小瓶中。

[1657] 储存rhIL-2溶液。对于短期储存(<72小时),将小瓶储存在4℃下。对于长期储存(>72小时),将小瓶等分成较小体积并存储于-20℃下的低温瓶中直到准备使用。避免冷冻/解冻循环。记录的有效期为制备日期后6个月。Rh-IL-2标签包含供应商和目录号、批号、有效期、操作者姓名的首字母、等分试样的浓度和体积。

[1658] 实例4:低温保存工艺

[1659] 本实例描述了使用CryoMed控制速率冷冻柜,型号7454(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))对用实例G中描述的简化密闭程序制备的TIL的低温保存工艺方法。

[1660] 所使用的设备如下:铝盒支架(与CS750冷冻袋相容)、用于750mL袋的低温保存盒、低压(22psi)液氮罐、冰箱、热电偶传感器(袋子的带材类型)和CryoStore CS750冷冻袋(OriGen科技公司(OriGen Scientific))。

[1661] 冷冻工艺提供从成核到-20℃的0.5℃速率和达到-80℃终点温度的每分钟1℃冷却速率。程序参数如下:步骤1—在4℃下等待;步骤2:1.0℃/分钟(样品温度),达到-4℃;步骤3:20.0℃/分钟(腔室温度),达到-45℃;步骤4:10.0℃/分钟(腔室温度),达到-10.0℃;步骤5:0.5℃/分钟(腔室温度),达到-20℃;以及步骤6:1.0℃/分钟(样品温度),达到-80℃。

[1662] 实例5:GEN 3示例性工艺

[1663] 所述实例提供了Gen 2与Gen 3工艺之间的比较。本实例描述了稳固的TIL扩增平台的开发。对Gen 2工艺的修改通过减少操作员干预的次数降低了风险并简化了制造工艺、减少了制造的全部时间、优化了反应剂的使用,并且促使灵活的半封闭和半自动化细胞生产工艺适合于商业规模的高通量制造。

[1664] 工艺Gen 2和Gen 3 TIL是由通过手术切除肿瘤源自个别患者并且接着进行离体扩增的自体TIL构成。Gen 3工艺的引发第一扩增步骤是在存在白介素-2(IL-2)和单克隆抗体OKT3的情况下的细胞培养,所述单克隆抗体OKT3靶向辐照的外周血单核细胞(PBMC)的骨架上的T细胞共受体CD3。

[1665] Gen 2 TIL产物的制造由两个阶段组成:1)预快速扩增(REP前)和2)快速扩增方案(REP)。在REP前期间,将切除的肿瘤切成各尺寸为2-3mm的≤50个碎片,将所述碎片用含血清的培养基(含有补充的10%HuSAB的RPMI 1640培养基)和6,000IU/mL的白介素-2(IL-2)培养11天的时间段。在第11天,采集TIL并且将其引入大规模的二级REP扩增中。REP由以下组成:在装载有150ug单克隆抗CD3抗体(OKT3)的5×10^9个辐照的同种异体PBMC饲养细胞于5L体积的补充有3000IU/mL rhIL-2的CM2中的共培养中,活化来自REP前的≤200×10^6个活细胞,持续5天。在第16天,培养物的体积减少90%并且将细胞级分以每个烧瓶≥1×10^9个活淋巴细胞分开到多个G-REX-500烧瓶中,并且用CM4 QS至5L。将TIL温育另外6天。REP是在第22天采集,洗涤、调配并且低温保存,之后在-150℃下运送到临床部位进行输注。

[1666] Gen 3 TIL产物的制造由三个阶段组成:1)引发第一扩增方案、2)快速第二扩增方案(也称为快速扩增期或REP)和3)传代培养分开。为了实现引发第一扩增TIL增殖,将切除的肿瘤切成各尺寸为2-3mm的≤120个碎片。在引发第一扩增的第0天,在3个100MCS容器的每一个中,在约100cm^2的表面区域上确立约2.5×10^8个同种异体辐照的PBMC饲养细胞的饲养层。将肿瘤碎片分配并且培养在3个100MCS容器中持续7天的时间段,每个容器具有500mL含血清的CM1培养基和6,000IU/mL的白介素-2(IL-2)和15ug OKT-3。在第7天,通过将大约5×10^8同种异体辐照的PBMC饲养细胞的另外的饲养细胞层并入3个100MCS容器的每一个中的肿瘤碎裂培养期中并且用500mL CM2培养基和6,000IU/mL IL-2和30ug OKT-3进行培养来启动REP。通过使用装载有OKT3的饲养细胞到100MCS容器中的密闭系统流体转移而活化同一容器中的整个引发第一扩增培养来增强REP启动。对于Gen 3,TIL扩大或分开涉及以下工艺步骤,其中通过密闭系统流体转移将整个细胞培养规模扩大到较大容器中并进行转移(从100M烧瓶到500M烧瓶)并且添加另外4L的CM4培养基。REP细胞是在第16天采集,洗涤、调配并且低温保存,之后在-150℃下运送到临床部位进行输注。

[1667] 总体来说,Gen 3工艺是一种较短的更可扩大的并且易于修改的扩增平台,其将适应稳固的制造和工艺可比较性。

[1668] 表21:示例性Gen 2和示例性Gen 3制造工艺的比较。

[1669]

步骤	工艺（Gen 2）	工艺（Gen 3）
REP 前-第 0 天	最多 50 个碎片/1-G-Rex 100MCS—11 天 于 1 L 的 CM1 培养基 + IL-2（6000 IU/mL）中	整个肿瘤，最多 120 个碎片均匀地分配到最多 3 个烧瓶中。第 1 个烧瓶：1-60 个碎片 第 2 个烧瓶：61-89 个碎片 第 3 个烧瓶：90-120 个碎片 第 7 天，于 500 mL/烧瓶的 CM1 培养基 + IL-2（6000 IU/mL）中 2.5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 15 ug OKT-3/烧瓶
REP 启动	直接到 REP-第 11 天- < $200e^6$ 个 TIL （1）G-Rex 500MCS，5L CM2 培养基 IL-2（3000 IU/mL） 5×10^9 个饲养细胞 150 ug OKT-3	直接到 REP-第 7 天-所有细胞 TIL-相同的 G-Rex 100MCS 添加 500 mL/烧瓶 CM2 培养基 IL-2（6000 IU/mL） 5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 30 ug OKT-3/烧瓶
TIL 增殖或规模扩大	体积减少并且将细胞级分分开到 5 个 G-REX 500MCS 中 4.5 L CM4 培养基 + IL-2（3000 IU/mL） $\geq 1 \times 10^9$ 个 TVC/烧瓶 第 16 天分开	每个 G-REX 100MCS（1 L）转移到 1 个 G-REX 500MCS 中 添加 4L CM4 培养基 + IL-2（3000 IU/mL） 第 9 天到第 11 天，规模扩大
采集	第 22 天采集， LOVO-自动化细胞洗涤器	第 16 天采集 LOVO-自动化细胞洗涤器
最终调配	低温保存产物 含 300 IU/ml IL2- CS10 的 LN_2，多个等分试样	低温保存产物 含 300 IU/ml IL-2-CS10 的 LN_2， 多个等分试样
工艺时间	**22 天**	**16 天**

[1670] 在第0天,对于两种工艺,洗涤肿瘤3次并且将碎片随机且分成两个池;每种工艺一个池。对于Gen 2工艺,将碎片转移到一个GREX 100MCS烧瓶中,所述烧瓶具有1L含6,000IU/mL rhIL-2的CM1培养基。对于Gen 3工艺,将碎片转移到一个GREX100MCS烧瓶中,所述烧瓶具有500mL含6,000IU/mL rhIL-2、15ug OKT-3和2.5×10^8个饲养细胞的CM1。

[1671] 根据每种工艺,在不同天数进行Rep启动日的TIL接种。对于Gen 2工艺,其中G-REX 100MCS烧瓶减少90％体积,将收集的细胞悬浮液转移到新的G-REX 500MCS中以在第11天在含有IL-2(3000IU/mL)加5e9个饲养细胞和OKT-3(30ng/mL)的CM2培养基中开始REP启动。将细胞扩增并且根据方案在第16天分开到多个GREX 500MCS烧瓶中,所述烧瓶具有含IL-2(3000IU/mL)的CM4培养基。接着根据方案在第22天采集培养物并进行低温保存。对于Gen 3工艺,在第7天出现REP启动,其中使用相同的G-REX 100MCS进行REP启动。简言之,将500mL的含有IL-2(6000IU/mL)的CM2培养基和具有30ug OKT-3的5×10^8个饲养细胞添加到每个烧瓶。在第9-11天,规模扩大培养。将G-Rex100M的整个体积(1L)转移到G-REX 500MCS中并且添加4L含有IL-2(3000IU/mL)的CM4。将烧瓶温育5天。在第16天采集培养物并进行低温保存。

[1672] 比较中包含三种不同的肿瘤,两种肺部肿瘤(L4054和L4055)和一种黑素瘤肿瘤(M1085T)。

[1673] 针对L4054和L4055，预先制备CM1(培养基1)、CM2(培养基2)和CM4(培养基4)培养基，并且将其保持在4℃下。在不过滤的情况下制备CM1和CM2培养基以比较在过滤与不过滤培养基的情况下的细胞生长。

[1674] 在REP启动和规模扩大时，预先将L4055肿瘤的培养基在37℃下温热长达24小时。

[1675] 结果汇总

[1676] 对于获得的总活细胞，Gen 3下降到Gen 2的30％之内。Gen 3最终产物在再刺激之后展现出更高的INF-γ产生。Gen 3最终产物展现出增加的克隆多样性，如通过存在的总独特CDR3序列所测量。Gen 3最终产物展现出较长的平均端粒长度。

[1677] 获得的结果

[1678] 细胞计数和活力％

[1679] 关于Gen 2和Gen 3工艺的REP前和REP扩增遵循上文所描述的细节。

[1680] 表22:REP前细胞计数。对于每个肿瘤，两个池含有相等数量的碎片。由于小尺寸的肿瘤，未能达到每个烧瓶的最大碎片数量。对于Gen 2工艺在第11天，对于Gen 3工艺在第7天，采集总的REP前细胞(TVC)并进行计数。为比较两个REP前组，将细胞计数除以培养中提供的碎片数量，以便计算每个碎片的活细胞平均数。如下表所指示，与Gen 3工艺相比，Gen 2工艺的每个碎片始终生长更多的细胞。针对Gen 3工艺第11天预测的TVC数量的外推计算值是通过将REP前TVC除以7且接着乘以11来计算。

[1681] 表22:REP前细胞计数

[1682]

肿瘤 ID	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
工艺	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
碎片的数量	21	21	24	24	16	16
在 REP 前时，每个碎片的平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
在 REP 前第 11 天的 Gen 3 外推值	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

[1683] *L4055，未过滤的培养基。

[1684] 表23:关于TIL最终产物的总活细胞计数和扩增倍数:对于Gen 2和Gen 3工艺，根据工艺条件对TVC进行计数并且产生所述工艺的每一天的活细胞百分比。在采集时，收集第22天(Gen 2)和第16天(Gen 3)的细胞并且确定TVC计数。接着将TVC除以第0天提供的碎片数量，以计算每个碎片的活细胞平均数。通过将采集的TVC除以REP起始TVC来计算倍数扩增。如表中所示，将Gen 2与Gen 3进行比较，L4054的扩增倍数类似;在L4055的情况下，Gen 2工艺的扩增倍数更高。具体地，在这种情况下，在REP启动日之前，使培养基升温24。针对M1085T，另外观察到Gen 3中的扩增倍数更高。针对Gen 3工艺第22天预测的TVC数量的外推计算值是通过将REP TVC除以16且接着乘以22来计算。

[1685] 表23:关于TIL最终产物的总活细胞计数和扩增倍数

[1686]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
碎片数量	21	21	24	24	16	16
TVC/碎片（采集时）	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 启动	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
规模扩大	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
采集	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
采集/REP 启动的扩增倍数	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
REP 采集第 22 天的 Gen 3 外推值	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

[1687] *L4055,未过滤的培养基。

[1688] 表24:TIL最终产物的活力%:在采集时,将最终TIL REP产物与释放标准进行比较,得到活力%。Gen 2和Gen 3工艺的所有条件超过70%的存活率标准并且在工艺和肿瘤之间都是相当的。

[1689] 表24:REP的活力%

[1690]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 启动	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
规模扩大	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
采集	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

[1691] 表25:Gen 3工艺的每个另外的烧瓶的估算细胞计数。由于每个烧瓶的碎片数量低于最大所需数量,所以针对每个肿瘤计算在采集日的估算细胞计数。估算是基于临床肿瘤足够大以在第0天接种第2个或第3个烧瓶的期望。

[1692] 表25:对于Gen 3工艺中的全规模(full scale)第2个和第3个烧瓶的外推估算细胞计数计算

[1693]

肿瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen 3 工艺	第 2 个烧瓶	第 3 个烧瓶	第 2 个烧瓶	第 3 个烧瓶	第 2 个烧瓶	第 3 个烧瓶
估算采集	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

[1694] 免疫表型:

[1695] 关于TIL最终产物的表型标志物比较:

[1696] 在Gen 2和Gen 3工艺两者中,三个肿瘤L4054、L4055和M1085T均经历了TIL扩增。在采集时,对REP TIL最终产物进行流式细胞术分析以测试纯度、分化和记忆标志物。对于所有条件,TCR a/b+细胞的百分比超过90%。

[1697] 与从Gen 2工艺采集的TIL相比,从Gen 3工艺采集的TIL展示更高的CD8和CD28表达。Gen 2工艺展示更高的CD4+百分比。参见图3(A、B、C)。

[1698] 关于TIL最终产物的记忆标志物比较:

[1699] 与从Gen 2工艺采集的TIL相比,从Gen 3工艺采集的TIL在中央记忆区室上展示更高的表达。参见图4(A、B、C)。

[1700] 关于TIL最终产物的活化和耗尽标志物比较:

[1701] 在来自两个肿瘤L4054和L4055的TIL中分析活化和耗尽标志物,以比较Gen 2和Gen 3TIL扩增工艺的最终TIL产物。Gen 2与Gen 3工艺之间的活化和耗尽标志物是相当的。

参见图5(A、B);图6(A、B)。

[1702] 再刺激后的干扰素γ分泌:

[1703] 在采集的对于Gen 2的第22天和对于Gen 3的第16天,针对L4054和L4055,TIL经历了用涂覆的抗CD3板进行过夜再刺激。使用抗CD3、CD28和CD137珠粒对M1085T进行再刺激。在所有条件下再刺激24小时后收集上清液并将上清液冷冻。使用同一ELISA板同时对来自两种工艺的上清液的通过ELISA的IFNγ分析进行评估。在所分析的三个肿瘤中观察到来自Gen 3工艺的IFNγ的更高产生。参见图7(A、B、C)。

[1704] 培养基中的IL-2水平的量度:

[1705] 为比较Gen 2与Gen 3工艺之间的IL-2消耗,在REP启动、规模扩大和采集日,收集关于肿瘤L4054和L4055的细胞上清液。通过来自R&D的Quantitate ELISA试剂盒测量细胞培养上清液中的IL-2的量。总体趋势指示,当与Gen 2工艺相比时,Gen 3工艺中的IL-2浓度仍更高。这可能是因为Gen 3的REP起始时的更高IL-2浓度(6000IU/mL)结合整个工艺过程中的培养基残留。参见图8(A、B)。

[1706] 代谢底物和代谢物分析

[1707] 将例如D-葡萄糖和L-谷氨酰胺的代谢底物的水平测量为总培养基消耗的替代量。测量其互逆代谢物,如乳酸和氨。葡萄糖是培养基中的一种单糖,线粒体利用其来产生呈ATP形式的能量。当葡萄糖氧化时,产生乳酸(乳酸盐是乳酸的酯)。乳酸在很大程度上是在细胞指数生长期期间产生的。高水平的乳酸对细胞培养过程具有负面影响。参见图9(A、B)。

[1708] 针对工艺Gen 2和Gen 3两者,在REP启动、规模扩大和采集日,收集L4054和L4055的用过的培养基。针对Gen 2,在第11天、第16天和第22天进行用过的培养基收集;针对Gen 3,在第7天、第11天和第16天进行用过的培养基收集。在CEDEX生物分析仪上分析上清液的葡萄糖、乳酸、谷氨酰胺、glutamax和氨的浓度。

[1709] L-谷氨酰胺是细胞培养基调配物中需要的不稳定必需氨基酸。谷氨酰胺含有一种胺,并且这种酰胺结构基团可以将氮转运且递送到细胞。当L-谷氨酰胺氧化时,细胞会产生有毒的氨副产物。为抵消L-谷氨酰胺降解,Gen 2和Gen 3工艺的培养基补充有Glutamax,其在水溶液中更稳定并且不会自发地降解。在两种肿瘤株中,Gen 3组展示L-谷氨酰胺和Glutamax在所述工艺期间减少并且氨在整个REP中增加。在Gen 2组中,观察到L-谷氨酰胺和Glutamax的浓度不变,并且氨产生略有增加。Gen 2和Gen 3工艺的氨在采集日是相当的,并且展示在L-谷氨酰胺降解方面略有差异。参见图10(A、B、C)。

[1710] 通过Flow-FISH测量的端粒重复序列:

[1711] Flow-FISH技术用于测量L4054和L4055上的端粒重复序列在Gen 2和Gen 3工艺下的平均长度。相对端粒长度(RTL)的确定是使用来自DAKO的端粒PNA试剂盒/FITC进行流式细胞术分析来计算。Gen 3展示与Gen 2相当的端粒长度。

[1712] CD3分析

[1713] 为确定每个工艺中产生的细胞产物的克隆多样性,对针对L4054和L4055采集的TIL最终产物进行采样并且通过对T细胞受体的CDR3部分进行测序来检验克隆多样性分析。

[1714] 表26:TIL采集的细胞产物上关于L4054的共享的独特CDR3序列百分比的Gen 2与Gen3比较。Gen 3与Gen 2最终产物之间共享199个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的97.07%。

[1715] 表26:关于L4054的Gen 2与Gen 3工艺之间的共享uCDR3序列的比较。

[1716]

编号 uCDR3（重叠率%）	所有 uCDR3		前 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355（48.85%）	205	199（97.07%）
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

[1717] 表27:TIL采集的细胞产物上关于L4055的共享的独特CDR3序列百分比的Gen 2与Gen3比较。Gen 3最终产物与Gen 2最终产物之间共享1833个序列,对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80％独特CDR3序列的99.45％。

[1718] 表27:关于L4055的Gen 2与Gen 3工艺之间的共享uCDR3序列的比较。

[1719]

编号 uCDR3（重叠率%）	所有 uCDR3		前 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599（50.77%）	1843	1833（99.45%）
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

[1720] CM1和CM2培养基在无需过滤的情况下提前制备并且保持在4℃下直到用于肿瘤L4055,进而在Gen 2和Gen 3工艺上使用。

[1721] 在Gen 2和Gen 3工艺的REP启动日,提前将肿瘤L4055的培养基在37℃下升温24小时。

[1722] 在所述工艺收集的上清液中,未测量到LDH。

[1723] 用K2 cellometer细胞计数器进行M1085T TIL细胞计数。

[1724] 关于肿瘤M1085T,样品不可用,例如用于代谢分析的上清液,用于活化和耗尽标志物分析、端粒长度和CD3-TCR分析的TIL产物。

[1725] 结论

[1726] 本实例比较3个单独的供体肿瘤组织的功能性质量属性,以及在Gen 2和Gen 3工艺当中的扩展表型表征和培养基消耗。

[1727] 关于产生的总活细胞和总有核细胞群体的存活率,对Gen 2与Gen 3REP前和REP扩增比较进行评估。采集日的TVC细胞剂量在Gen 2(第22天)与Gen 3(第16天)之间是不相当的。Gen 3细胞剂量低于Gen 2,约为采集时收集的总活细胞的40％。

[1728] 针对Gen 3工艺,假设在第11天而非第7天进行REP前采集并且在第22天而非第16天进行REP采集,计算外推细胞数量。在两种情况下展示与Gen 2工艺相比,TVC的数量更接近,从而表明早期活化可以允许TIL生长的总体更好表现。表4和5的底部行。

[1729] 就Gen 3工艺的额外的烧瓶(2或3)的外推值来说,假设处理了更大尺寸的肿瘤,并且达到如所描述每个工艺所需的最大碎片数量。观察到,对于Gen 3工艺,在第16天采集时,TVC可以达到与Gen 2工艺的第22天相比类似的剂量。此观察结果非常重要并且只是培养的早期活化可以允许TIL在较少处理时间中的更好表现。

[1730] 关于产生的总活细胞和总有核细胞群体的存活率,对Gen 2与Gen 3REP前和REP扩增比较进行评估。采集日的TVC细胞剂量在Gen 2(第22天)与Gen 3(第16天)之间是不相当的。Gen 3细胞剂量低于Gen 2,约为采集时收集的总活细胞的40％。

[1731] 就表型表征来说,与Gen 2工艺相比,在Gen 3工艺中观察到三个肿瘤上的更高CD8+和CD28+表达。此数据指示,与Gen 2相比,Gen 3工艺具有改进的最终TIL产物属性。

[1732] 与Gen 2工艺相比,Gen 3工艺展示略微更高的中央记忆区室。

[1733] 尽管Gen 3工艺的持续时间较短，但Gen 2和Gen 3工艺展示相当的活化和耗尽标志物。

[1734] 在分析的三个肿瘤中，与Gen 2相比，Gen 3最终产物上的IFNγ(IFN gamma)产生高3倍。此数据指示，与Gen 2工艺相比，Gen 3工艺产生高度功能性且更有效的TIL产物，可能是由于Gen 3中的CD8和CD28表达更高。表型表征表明，与Gen 2工艺相比，Gen 3积极倾向于三个肿瘤上的CD8+、CD28+表达。

[1735] TIL最终产物上的端粒长度在Gen 2与Gen 3之间是相当的。

[1736] 葡萄糖和乳酸水平在Gen 2与Gen 3最终产物之间是相当的，从而表明Gen 3工艺的培养基中的营养物水平不受影响，这是因为与Gen 2相比，所述工艺的每一天未执行体积减少去除并且所述工艺中总体培养基体积较小。

[1737] 总的来说，与Gen 2工艺相比，Gen 3工艺展示处理时间减少几乎两倍，这将明显降低通过Gen 3工艺扩增的TIL产物的商品成本（COG）。

[1738] IL-2消耗指示Gen 2工艺中的IL-2消耗总体趋势，且在Gen 3工艺中，由于未去除旧的培养基而导致IL-2更高。

[1739] Gen 3工艺示出了通过CDR3 TCRab序列分析测量的克隆多样性更高。

[1740] 在REP前的第0天添加饲养细胞和OKT3允许使用Gen 3工艺进行TIL的早期活化和总体上更好的生长TIL性能。

[1741] 表28描述了Gen 3工艺与当前Gen 2工艺相比的各个实施例和结果：

[1742] 表28:示例性Gen 3工艺。

[1743]

步骤	工艺 Gen 2	优化的工艺 Gen 3
REP 前-第 0 天	≤50 个碎片 1X G-Rex 100MCS 1 L 培养基 IL-2（6000 IU/mL） 11 天	≤240 个碎片 ≤60 个碎片/烧瓶 ≤4 个烧瓶 ≤2 L 培养基（500 毫升/烧瓶） IL-2（6000 IU/mL） 2.5×10^8 个饲养细胞/烧瓶 15 ug OKT3/烧瓶
REP 启动	新鲜 TIL 直接到 REP 第 11 天 ≤$200e^6$ 个活细胞 5×10^9 个饲养细胞 G-Rex 500MCS 5 L CM2 培养基 + IL-2（3000 IU/mL） 150 ug OKT3	新鲜 TIL 直接到 REP 第 7 天 活化整个培养物 5×10^8 个饲养细胞 30 ug OKT3/烧瓶 G-Rex 100MCS 500 mL 培养基+ IL-2（6000 IU/mL）
TIL 传代培养或规模扩大	≤5 个 G-REX 500MCS ≤1 × 10 个活细胞/烧瓶 5 升/烧瓶 第 16 天	≤4 个 G-REX 500MCS 规模扩大整个培养物 4 升/烧瓶 第 10-11 天
采集	第 22 天采集， LOVO-自动化细胞洗涤器 2 个洗涤循环	第 16 天采集 LOVO-自动化细胞洗涤器 5 个洗涤循环
最终调配	低温保存产物 含 300 IU/ml IL2- CS10 的 LN_2， 多个等分试样	低温保存产物 含 300 IU/ml IL-2-CS10 的 LN_2， 多个等分试样
工艺时间	22 天	16 天

[1744] 实例6:直接体外选择和扩增PD-1+细胞:用于ACT疗法的增强肿瘤反应性TIL的方法介绍

[1745] 用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)进行的过继性T细胞疗法已经在患有转移性黑素瘤的患者的组群中证明了持久的应答率[1]。用于治疗的TIL产物包含识别肿瘤特异性抗原、突变源性患者特异性新抗原和非肿瘤相关抗原的异质T细胞[2、3]。研究已经证明,新抗原特异性T细胞显著有助于TIL的抗肿瘤活性[4]。预期针对肿瘤反应性富集TIL的策略产生更有效的治疗产物,尤其是在已知含有高比例的旁观者T细胞的上皮癌中[5]。若干研究已经证明,在TIL上PD1(通常与T细胞耗尽相关的标志物)的表达鉴定自体肿瘤反应性T细胞[6、7、8]。此处呈现的是一种新方案的开发,所述新方案被设计成选择PD1+细胞并且针对自体肿瘤反应性T细胞富集TIL产物。本实例提供了用于分选和扩增PD1+TIL并表征所得产物的方案。

[1746] 此方案涉及使用2-REP方案扩增来自黑素瘤、肺癌、乳腺癌(三阴性和ER/PR肿瘤)和肉瘤的离体分选的PD1+TIL。针对生长、活力、表型、功能(IFNγ分泌、CD107a动员)、肿瘤杀伤(X-CELLigence)和TCR Vβ库(通过流式细胞术和RNA测序)对扩增TIL进行评估。在图7中提供的图表中描述了示例性方法。

[1747] 本实例涵盖旨在针对TAA特异性TIL富集TIL产物的PD1选择程序。基于以下想法:

肿瘤/新抗原特异性T细胞负责TIL产物的治疗活性,并且TIL的PD1+亚群包括肿瘤反应性T细胞。

[1748] 方法-程序

[1749] 肿瘤制备

[1750] 从研究联盟(UPMC,Moffitt)和组织采购供应商(Biotheme和MTG集团)获得新鲜切除的肿瘤样品。将肿瘤在HypoThermosol(生物生命解决方案公司,华盛顿,目录号101104)(具有抗生素)或RPMI 1640(赛默飞世尔科技公司,宾夕法尼亚州,目录号11875-085)+雄性人类AB血清(Access Biologicals,加利福尼亚州,A13012)中运送过夜。

[1751] 从其一级和二级包装中去除肿瘤,对具有肿瘤和运送培养基的小瓶进行称重并且记录质量。从小瓶中去除肿瘤,并且对小瓶和运送培养基进行再称重。计算肿瘤的质量(小瓶质量+运送培养基+肿瘤)-(小瓶+运送培养基)。

[1752] 将整个肿瘤碎裂碎裂大约4-6-mm^3的碎片,以进行肿瘤消化。如果肿瘤足够大,则建立四个3mm^3的碎片进行处理。

[1753] 用于肿瘤消化的酶制剂

[1754] 以针对以下消化酶中的每种消化酶所指示的无菌HBSS的量重构冻干酶。这些酶被制备为10X。确保从瓶子的侧面和从瓶子开口上的保护箔捕获任何残留粉末。上下移液若干次并且涡旋以确保完全重构。

[1755] 在10-ml HBSS中重构1-g胶原酶IV(西格玛(Sigma),MO,C5138)(以制备100-mg/ml储备液)。通过上下移液进行混合以溶解。如果在重构后未溶解,则置于37℃H_2O浴中5分钟。等分到1-ml小瓶中。这是胶原酶的100-mg/ml 10X工作储备液。

[1756] 制备DNA酶(西格玛,MO,D5025)储备溶液(10,000-IU/ml)。在随附的数据表中提供了每个批次的DNA酶单位。计算适当体积的HBSS以重构100-mg冻干DNA酶储备液。例如,如果DNA酶储备液为2000-U/mg,则储备液中的总DNA酶为200,000-IU(2000-IU/mg X 100-mg)。为了稀释到工作储备液为10,000IU,将20-ml的HBSS添加到100mg的DNA酶中(200,000IU/20ml=10,000U/ml)。等分到1-ml小瓶中。这是DNA酶的10,000IU/ml 10X工作储备液。

[1757] 准备10-mg/ml的透明质酸酶(西格玛,MO,H2126)储备溶液。用50-ml的HBSS重构500-mg小瓶以制备10-mg/ml储备溶液。等分到1-ml小瓶中。这是透明质酸酶的10-mg/ml10X工作储备液。

[1758] 肿瘤处理和消化

[1759] 将储备液消化酶稀释到1X。为了制备1X工作溶液,向3.5-ml的HBSS中添加500-μl的胶原酶、DNA酶和透明质酸酶中的每一种。

[1760] 如果使用GentleMACS OctoDissociator将肿瘤碎片转移到上述5-ml的消化混合物(在HBSS中)中的GentleMACS C-管(C-管)或50-ml锥形管中。将2-3个碎片(4-6mm)转移到每个C管。

[1761] 将每个C管(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec),德国,130-096-334)转移到GentleMACS OctoDissociator(美天旎生物技术公司,德国,130-095-937)中。根据制造商的说明书使用。注意,每种肿瘤组织学具有建议的肿瘤解离程序。选择适当的程序用于相应的肿瘤组织学。解离将需要大约一小时。

[1762] 如果GentleMACS OctoDissociator不适用,则使用标准旋转器。将2-3个肿瘤碎片

置于50-ml锥形管(用石蜡膜密封以避免渗漏)中并固定到旋转器。将旋转器置于37℃、5% CO_2加湿的温育箱中持续旋转1-2小时。可替代地,肿瘤碎片可以在室温下消化过夜,也伴随有恒定旋转。

[1763] 消化后,从Octodissociator或旋转器中去除C管。将0.22-μm滤网连接到无菌Falcon锥形管。使用移液管,使来自C管或50-ml锥形管(5ml)中的所有内容物通过0.22-μm滤网进入50-ml锥形管中。用10-ml的HBSS洗涤C管/50-ml锥形管并且应用于滤网。使用无菌注射器柱塞的平端来通过过滤器解离任何剩余的未消化的肿瘤。添加CM1或HBSS直到50-ml并且对所述管进行加盖。

[1764] 在室温下通过以1500rpm离心5分钟将样品沉淀。小心地去除液体,将沉淀物重悬于5-ml的CM1中,用于细胞计数和活力评估。

[1765] 将全肿瘤消化物留出用于如下:1.细胞培养(PD1+和PD1-的对照);2.FMO流式细胞术对照;3.分选前全肿瘤消化表型分型测定;4.冷冻用于肿瘤反应性/细胞杀伤测定。留出的细胞数将取决于总消化产率和肿瘤组织学。

[1766] 细胞计数和活力

[1767] 已经描述了用于使用Nexcelom Cellometer K2(Nexcelom,马萨诸塞州)获得细胞和活力计数的程序。

[1768] 染色消化的肿瘤用于流式细胞术分析和细胞分选

[1769] 根据以下方法,用包含与纳武单抗温育并且用活/死紫、抗IgG4 Fc-PE(针对纳武单抗的第二抗体)和CD3-FITC染色的混合物对肿瘤消化物进行染色。

[1770] 计数后,将细胞重悬于10-ml HBSS中。在室温下通过以1500rpm离心5分钟将细胞沉淀(加减速度为9)。将沉淀物重悬于5ml的HBSS中。添加5-μl的活/死蓝色染料(赛默飞世尔,马萨诸塞州,目录号L23105),最终浓度为1/1000。在冰上温育20-30分钟。在室温下通过以1500rpm离心5分钟来将细胞沉淀。

[1771] 将沉淀物重悬于FACS缓冲液(1X HBSS,1mM EDTA,2%胎牛血清)中。添加到沉淀物中的FACS缓冲液的量基于沉淀物的大小。染色体积应为约沉淀物大小的约3倍。因此,如果存在300-μl的细胞,则缓冲液的体积应为至少900-μl。添加1μg/ml的纳武单抗(创造性生物学实验室公司,纽约,目录号TAB-770)。稀释将取决于抗体储备液。在4℃下温育30分钟。将沉淀物重悬于5ml的冷HBSS中。

[1772] 在室温下通过以1500rpm离心5分钟将细胞沉淀(加减速度为9)。重复洗涤2X。将沉淀物重悬于5ml的冷HBSS中。添加5-μl的活/死蓝色染料(赛默飞世尔,马萨诸塞州,目录号L23105),最终浓度为1/1000。在4℃下温育20-30分钟。

[1773] 在室温下通过以1500rpm离心5分钟将细胞沉淀(加减速度为9)。如上所述,将沉淀物重悬于FACS缓冲液(1X HBSS、1mM EDTA、2%胎牛血清)中。添加到沉淀物中的FACS缓冲液的量基于沉淀物的大小。染色体积应为约沉淀物大小的约3倍。因此,如果存在300-μl的细胞,则缓冲液的体积应为至少900-μl。

[1774] 对于抗体添加,每个100-μl的体积相当于一个测试(抗体的滴定量)。即,如果存在1-ml的体积,则需要10X滴定的抗体的量。每100-μl的样品添加3-μl的抗CD3-FITC(BD生物科学公司,新泽西州,目录号561807)。以1:500添加抗IgG4 Fc-PE(南方生物技术公司(Southern Biotech),亚拉巴马州,目录号9200-09)。因此,对于每500μl的FACS缓冲液,添

加1μl的抗IgG4 Fc-PE。在冰上温育细胞30分钟。温育期间避光。温育期间搅拌几次。将细胞重悬于20-ml的FACS缓冲液中。使溶液通过70-μm细胞滤网进入新的50-ml锥形管中。在室温下以1500rpm离心5分钟(加减速度为9)。抽吸。将细胞重悬于FACS缓冲液中的高达$10e^6$的TOTAL(活+死)中。最小体积为300-μl。

[1775] 转移到无菌聚丙烯FACS管中。3毫升/管用于FACS分选。

[1776] FACS分选(FX500启动)

[1777] 在设置系统并且等待校准完成时,制备以下:

[1778] • 用10-ml无菌去离子水制备五个无菌15-ml锥形管。

[1779] • 用4-ml无菌去离子水制备五个无菌5-ml FACS管。

[1780] • 用12-ml的70%EtOH制备五个无菌15-ml锥形管。

[1781] • 用12-ml的10%次氯酸钠制备五个无菌15-ml锥形管。

[1782] 样品收集

[1783] 证实样品腔室和收集腔室处于5℃并且选择涡旋作为搅拌样品。根据需要调整PD1门。

[1784] 当门令人满意时,记录尽可能多的事件(或最多20,000个CD3事件)。可以将样品压力设置为10以加速此收集。停止收集并去除管。

[1785] 打开样品腔室门,并且将15-ml收集腔室块装载到所述腔室中。将含有收集缓冲液的收集管装载到腔室块中。调整样品压力以维持至少85%的分选效率。记录50,000个CD3事件。如果任一级分中所收集的细胞超过4.5×10^6个,则将需要更换一个或多个收集管。继续分选,直到所有样品都从样品管中取出。

[1786] REP1启动(启动引发第一扩增步骤)

[1787] 具有最少细胞数(PD1+或PD1-)的条件用于确定用于REP1启动的CD3+细胞数。CD3细胞的%(在分选期间确定)将用于计算用与PD1+和PD1-样品相同数量的CD3细胞启动REP1所需的整个消化物中的细胞总数。REP 1启动的全消化细胞的总数=接种在REP1/%的CD3细胞中的分选细胞数。

[1788] 将大约1000-100,000个细胞CD3+细胞置于G-Rex 24或G-Rex10中,分别用7-ml或40-ml CM2(50%RPMI 1640+10%人血清、glutamax、庆大霉素和50%AimV)和3000-IU/ml IL-2处理,持续11天。针对PD1+和PD1-分选的群体和全肿瘤消化物,启动至少一个G-Rex烧瓶。在培养启动时,向每个烧瓶中添加抗CD3(克隆:OKT3)(30-ng/ml)和饲养细胞(比率为1:100(TIL:饲养细胞))。

[1789] 将细胞在板/烧瓶中温育11天,不进行培养基更换(REP1)。

[1790] 在完成REP1时,对于G-Rex 24去除大约5-ml的培养基并且对于G-Rex 10去除30-ml的培养基。通过上下移液,将细胞重悬于剩余培养基中。将细胞置于50-ml锥形管中并且以1500rpm离心5分钟。

[1791] 抽吸培养基并且将细胞重悬于10-20-ml的CM2中用于计数和活力评估。

[1792] REP2启动(第二快速扩增的启动)

[1793] 对于mini-REP2启动,将1e5细胞置于具有40-ml的CM2培养基和3000-IU/ml的IL-2的G-Rex 10中。在培养启动时,添加抗CD3(克隆:OKT3)(30-ng/ml)和饲养细胞(比率为1:100,TIL:饲养细胞)。

[1794] 对于“全规模运行”,2e6-30e6细胞在1-L的CM2培养基和3000-IU/m的IL-2中的G-Rex100M中扩增。在培养启动时,添加抗CD3(克隆:OKT3)(30-ng/ml)和饲养细胞(比率为1:100,TIL:饲养细胞)。

[1795] 在REP2的第5天(工艺的第16天)进行培养基更换(对于小规模)或培养基更换+分开(“全规模运行”)。将烧瓶的体积减小到大约10-ml(G-Rex 10)或100-ml(G-Rex 100M)并且用CM2或AimV+3000-IU/ml IL-2补充到40-ml(G-Rex 10)或1-L(G-Rex 100M)。对于“全规模运行”,将烧瓶以1:2分开。

[1796] 在REP2的第11天(或工艺的第22天),将烧瓶的体积减小,在室温下以1500rpm离心5分钟。

[1797] 评估最终产物的细胞计数、活力、表型(TIL1、TIL2(TIL的表面抗原染色的TIL2组)、TIL3和功能(CD107a(通过CD107a动员和IFNγ测定评估TIL功能))。根据制造商的说明书,通过FACS(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter),加利福尼亚州,目录号IM3497)评估Vβ库,所述FACS评估24种特异性(总Vβ家族的70%)。将另外的细胞(1e6-5e6细胞)沉淀并且冷冻用于RNA测序和分析。还在共培养测定中对最终产物的肿瘤反应性进行评估并且对IFNγ进行评估。当可能时,将解冻的全肿瘤消化物与TIL共培养,并且使用xCELLigence系统(ACEA生物科学有限公司,加利福尼亚州)通过共培养和/或杀伤(细胞溶解%)对肿瘤反应性进行评估。

[1798] 材料与方法

[1799] 通过流式细胞术直接从新鲜肿瘤消化物中分选PD1阳性(PD1+)细胞并且体外扩增。

[1800] 评估来自六种黑素瘤、三种肉瘤、六种乳腺癌和八种肺癌的样品。

[1801] 研究了3个群体:

[1802] • $PD1^{+}$分选的TIL;

[1803] • PD-分选的TIL;

[1804] • 本体TIL(整个肿瘤未经分选的消化物)。

[1805] 对TIL的产率(细胞计数)、表型(流式细胞术)、TCR Vβ库(RNA测序)、非特异性功能(抗CD3和PMA)以及肿瘤反应性和杀伤(共培养测定)进行评估。

[1806] 已经开发了一种方案用于将经PD1选择的TIL从黑素瘤、肺癌、乳腺癌和肉瘤扩增到临床上相关的数量。

[1807] 经PD1选择的TIL的体外扩增导致表型上与本体TIL相当的产物。

[1808] T细胞标志物相对于预分选TIL上调,这表明高活化水平。相对于分选前TIL,在经扩增的PD1+TIL的表面处调节的T细胞标志物包含PD1和CD25并且表明高活化水平。重要的是,PD1+TIL的体外扩增导致在表型上与本体TIL相当的产物,这表明强大的治疗潜力。通过响应于非特异性刺激的稳健的IFNγ和CD107a表达来确认扩增的PD1+TIL的功能性。与PD1-源性TIL和本体TIL相比,经扩增的PD1+TIL表现出寡克隆性,这是肿瘤位点处的抗原驱动的克隆扩增的迹象。初步数据证明,自体肿瘤细胞被PD1+而不是PD1-源性TIL杀伤。

[1809] 与PD1-源性TIL和本体TIL相比,PD1+源性TIL表现出寡克隆性。

[1810] 如通过非特异性刺激评估的,所有TIL产物是功能性的。

[1811] 在PD1+源性TIL中观察到自体黑素瘤细胞杀伤,但是在PD1源性TIL和本体TIL中未

观察到自体黑素瘤细胞杀伤。

[1812] 结果和接受标准

[1813] PD1+分选的细胞将显示增殖能力的缺陷。最终产物的产率将>或＝1e9。与PD1-相比,PD1+细胞将是寡克隆的。基于PD1+细胞更可能是抗原特异性的前提,与其PD1-对应物相比,PD1+细胞将可能表现出增强的肿瘤特异性杀伤能力。

[1814] 参考文献

[1815] 1.Rosenberg,S.A.等人,使用T细胞转移免疫疗法在严重预处理的患有转移性黑素瘤的患者中持久的完全应答(Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy).《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》,2011.17(13):第4550-7页。

[1816] 2.Kvistborg,P.等人,TIL疗法拓宽了黑素瘤患者的肿瘤反应性CD8(+)T细胞区室(TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+)T cell compartment in melanoma patients).《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》,2012.1(4):第409-418页。

[1817] 3.Simoni,Y.等人,旁观者CD8(+)T细胞在人肿瘤浸润中是丰富的并且在表型上不同(Bystander CD8(+)T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates).《自然(Nature)》,2018.557(7706):第575-579页。

[1818] 4.Schumacher,T.N.和R.D.Schreiber,癌症免疫疗法中的新抗原(Neoantigens in cancer immunotherapy).《科学(Science)》,2015.348(6230):第69-74页。

[1819] 5.Turcotte,S.等人,来自胃肠癌和黑素瘤的浸润内脏转移的T细胞的表型和功能:过继性细胞转移疗法的暗示(Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma:implications for adoptive cell transfer therapy).《免疫学杂志(J Immunol)》,2013.191(5):第2217-25页。

[1820] 6.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞(Selection of CD8+PD-1+lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells).《免疫治疗学杂志(J Immunother)》,2010.33(9):第956-64页。

[1821] 7.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤(PD-lidentifies the patient-specific CD8(+)tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors).《临床研究杂志(J Clin Invest)》,2014.124(5):第2246-59页。

[1822] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池(A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+)CD8(+)T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade).《自然医学(Nat Med)》,2018。

[1823] 9.Cohen等人,从肿瘤和外周淋巴细胞中分离新抗原特异性T细胞(Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes)《临床研究杂志》.2015;125(10):3981-3991。

[1824] 实例7:用于直接体外选择和扩增PD-1+细胞的另外的实施例:用于ACT疗法的增强肿瘤反应性TIL的方法

[1825] 研究:用M1H4和EH12.2H7克隆检测PD1

[1826] 基于先前数据,将抗PD1 MIH4 mAb用于早期研究工作。使用M1H4分选的细胞证实了经PD1选择的TIL扩增的可行性和产物的功能性:

[1827] 制备染色方案以:

[1828] • 确保所有PD1+TIL的染色。

[1829] • 并入缀合的抗IgG4用于检测结合前的受体。

[1830] • 使用抗PD1 EH12.2H7 mAb的方案。

[1831] PD1分选方案的进一步表征以便证实选择适当的PD1+群体,已经启动新的分选策略以使用以下选择PD1^{高}TIL。

[1832] 策略:

[1833] a)H&N(n=4)、黑素瘤(n=4)和肺(n=7)中有16个肿瘤

[1834] o5个实验是直接比较(即,PD1^{+}相对于PD1^{高})。

[1835] b)分析(包含功能和TCRvβ库)

[1836] 表29:方案比较

[1837]

步骤	其它方案	用于本发明实例的示例性方案
消化程序	GentleMACS 解离器	进行 GentleMACS 解离，然后进行 Ficoll（如有必要）
消化混合物	未知	Iovance 开发的 GMP 消化混合物 无 Ficoll 步骤
细胞分选器	MACSQuantTyto	索尼 FX500
用于分选的 PD1 克隆	PD1.3.1（美天旎）	EH12.2H7（BioLegend 公司）+ IgG4
PD1+分选策略	PD1+	PD1+或 PD1^{高}
培养方法	REP（14 天）	2-REP 工艺（各自 11 天）

[1838] 初步结果和汇总:

[1839] 经扩增的TIL(在REP1和REP2之后)相对于经分选的PD1高群体的表型和功能性的差异提供了一种新颖的选择/分选策略。

[1840] 研究已经证明,来自肺和黑素瘤中的PD1^{+}选择的TIL是抗原特异性的并且具有更大的效应子功能。

[1841] 不具有PD1活性(PD1/PD-L1轴)的冷肿瘤”不适合于PD1选择。

[1842] 由于PD1^{高}细胞与新抗原/肿瘤特异性的关联,PD1^{高}TIL肿瘤对于选择是理想的。

[1843] 进一步分析将包含表型、功能性、生理学、克隆性以及针对杂质的分析。

[1844] 表型:

[1845] T细胞亚群(记忆/α-β相对于γ-δ)

[1846] 功能性

[1847] • IFNg和颗粒酶(珠粒刺激)

[1848] • CD107a(PMA/IO刺激)

[1849] • IFNg或CD107a/TNF或颗粒酶B的肿瘤反应性

[1850] o-(肿瘤消化物或HLA匹配的或HLA错配的或其它癌症抗原)

[1851] • 肿瘤杀伤测定(Xcelligence)

[1852] • 多功能性(IsoLight)?

[1853] 生理学

[1854] • 端粒长度

[1855] • 细胞扩增倍数

[1856] • 细胞周期分析,有丝分裂指数

[1857] • 耗尽/衰老/活化标志物

[1858] 克隆性

[1859] • 多样性(独特克隆的数量)

[1860] • 独特克隆iREP的同一性重叠

[1861] • 香农熵指数

[1862] 杂质

[1863] • 污染肿瘤细胞、NK细胞、其它细胞、工艺残留物

[1864] 实例8:具有确定成分培养基的肿瘤扩增工艺。

[1865] 在实例1到7中公开的工艺通过用根据本发明的确定成分培养基(例如,CTS™ OpTmizer™ T细胞扩增SFM,赛默飞世尔,包含例如DM1和DM2)取代CM1和CM2培养基来进行。

[1866] 实例9:用于全规模制造的PD-1+TIL的选择和扩增

[1867] 目的

[1868] 本实例描述了在如本实例中描述的小规模和全规模制造实验中来自PD-1+TIL的选择和扩增的结果。

[1869] 信息

[1870] 若干研究已经证明,PD-1(通常与T细胞耗尽相关的标志物)的表面表达鉴定肿瘤微环境中的自体肿瘤反应性T细胞。方案被设计成从肿瘤消化物中选择PD-1阳性(PD-1+)细胞,以富集自体肿瘤反应性T细胞的TIL产物。方案被适配和修改成用于小规模和全规模制造两者。

[1871] 范围

[1872] 使用小规模PD-1+选择的Gen2工艺(PD-1+Gen2)从一种肺肿瘤消化物和一种黑素瘤肿瘤消化物中扩增PD-1+选择的TIL。根据方案TP-19-004表征TIL最终产物。

[1873] 使用全规模PD-1+选择的Gen2工艺(PD-1+Gen2)从两个头颈肿瘤消化物和一个黑素瘤肿瘤消化物中扩增PD-1+选择的TIL。根据方案TP-19-004表征TIL最终产物。

[1874] 实验设计

[1875] 小规模和全规模制造工艺的描述示出于下表30、31中。

[1876] 小规模研究(第1期)是将TIL扩增工艺规模扩大并且优化到临床规模的可行性研究。对另外的条件进行测试,以探索在PD-1+TIL扩增中使用确定成分培养基和早期REP(Shorted REP 1)。

[1877] 表30.用于PD-1+TIL培养的小规模工艺的概述(研究/PD-1+Gen 2/确定成分培养基/早期REP)

[1878]

条件	PD-1+研究	PD-1+ Gen 2*	PD-1+确定成分培养基 Gen 2δ	PD-1+早期 REP
REP-1 **TIL** **饲养细胞** **CM2** **IL-2** **OKT3（30 ng/mL）** **G-Rex**	**第 0 天：** REP-1 10%的 PD-1+分选计数 以 1:100 改变 TIL:饲养细胞 50 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10	**第 0 天：** REP-1 10%的 PD-1+分选计数 10e6 100 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10 M	**第 0 天：** REP-1 10%的 PD-1+分选计数 10e6 100 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10 M	**第 0 天：**REP-1 10%的 PD-1+分选计数 10e6 100 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10 M
REP-2 **TIL** **饲养细胞** **CM2** **IL-2** **OKT3（30 ng/mL）** **G-Rex**	**第 11 天：** REP-2 100,000 TVC 10e6 50 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10	**第 11 天：**REP-2 20% TVC 100e6 100 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10 M	**第 11 天：** REP-2 20% TVC 100e6 100 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10 M	**第 7 天：**REP-2 20% TVC 100e6 100 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 10 M
规模扩大	无规模扩大	**第 16 天：** 体积减小和分开（TVC/20e6，向上舍入）高达 5 10 M 烧瓶	**第 16 天：**体积减小和分开（TVC/20e6，向上舍入）高达 5 10 M 烧瓶	**第 12 天：**体积减小和分开（TVC/20e6，向上舍入）高达 5 10 M 烧瓶
REP-2 采集	**第 22 天：** REP-2 采集	**第 22 天：**REP-2 采集	**第 22 天：** REP-2 采集	**第 17 天：** REP-2 采集
外推计算： **REP-1** **REP-2**	由采集 TVC 乘以 10 由采集 TVC 乘以 REP-2 TVC/1e5	由 REP-1 采集 TVC 乘以 10 由 REP-2 采集乘以 50 x 分开烧瓶的数量	由 REP-1 采集 TVC 乘以 10 由 REP-2 采集乘以 50 x 分开烧瓶的数量	由 REP-1 采集 TVC 乘以 10 由 REP-2 采集乘以 50 x 分开烧瓶的数量

[1879] *PD-1^{阴性}Gen 2和PD-1本体TIL Gen 2使用与PD-1+Gen 2相同的小规模培养的条件。

[1880] δ确定成分培养基条件使用具有3%CTS免疫细胞血清替换的CTS OpTmizer。

[1881] 表31.用于PD-1+TIL培养(PD-1+Gen 2)的全规模工艺的概述

[1882]

条件	PD-1+ Gen 2
REP-1 **TIL** **饲养细胞** **CM2** **IL-2** **OKT3（30 ng/mL）** **G-Rex**	**第 0 天：**REP-1 PD-1+分选计数 100e6 1000 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 100MCS
REP-2 **TIL** **饲养细胞** **CM2** **IL-2** **OKT3（30 ng/mL）** **G-Rex**	**第 11 天：**REP-2 5e6-200e6 TVC 5e9 5 L 3000 IU/mL 30 ng/mL 500MCS
规模扩大	**第 16 天：**在 CM4 + 3000 IU/mL 的 IL-2 中体积减小并且分开到 5 个 G-Rex500 MCS
REP-2 采集	**第 22 天：**REP-2 采集

[1883] 下表31列出了本研究中使用的肿瘤和相关的组织学。

[1884] 表31:研究中使用的肿瘤

[1885]

实验	组织学	ID	另外的肿瘤信息
第 1 期：小规模（预期临床制造工艺的 1/10/1/50 规模）			
小规模 1	肺	L4093	供应商 ID：535-C055，0.5gms
小规模 2	黑素瘤	M1135	供应商 ID：061-Y025，淋巴结
第 2 期：全规模（预期临床制造工艺）			
全规模 1	头颈	H3032	供应商 ID：M4190034 A4，口腔，0.35 gms
全规模 2	黑素瘤	M1137	供应商 ID：093-Y032
全规模 3	头颈	H3034	供应商 ID：747048A1，0.3 gms

[1886] 接受标准

[1887] 针对下表3和4中列出的参数进行这些批次的表征测试,仅供参考。

[1888] 下表33规定了用于评估第2期/全规模批次的性能的接受标准。

[1889] 表33.采集产品测试和接受标准

[1890]

测试类型	方法	接受标准
工艺中测试		
分选后纯度（PD1+%）	流式细胞术	≥ 80%
释放测试		
外观	目视检查	袋子完好，无团块迹象
细胞活力	荧光	≥ 70%
总活细胞计数	荧光	1×10^9 到 150×10^9
同一性（%CD45+CD3+）	流式细胞术	≥ 90% CD45+CD3+细胞
IFNg（经刺激的-未经刺激的）	珠粒刺激和 ELISA	≥ 500 pg/mL

[1891] 下表34规定了针对第2期全规模批次进行的另外的最终产品表征测试,仅供参考。

[1892] 表34.最终产物表征(仅供参考)

[1893]

测试类型	方法	报告结果
纯度和记忆 T 细胞亚群表型	流式细胞术（LAB-055）	报告结果
活化和耗尽标志物表型	流式细胞术（LAB-061）	报告结果
端粒长度	Flow FISH（附件-1）	报告结果
颗粒酶 B	珠粒刺激和 ELISA（LAB-064）	报告结果
CD107A	有丝分裂原刺激和流式细胞术（LAB-061）	报告结果
TCR Vβ 测序	深度测序（健谱生物科技公司（Irepertoire,Inc））	报告结果（如果可用的话）
代谢物分析	Cedex 生化分析仪	报告结果

[1894] 结果

[1895] 第1期小规模可行性结果

[1896] 在第1期研究中使用肺肿瘤(L4093)和黑素瘤(M1135)肿瘤。简言之,酶消化每个肿瘤,通过FACS分选PD-1+细胞,并且在第0天确定以下培养作为测试条件:

[1897] (1)PD-1+研究

[1898] (2)PD-1+Gen 2

[1899] (3)PD-1+确定成分培养基

[1900] (4)PD-1+早期REP。

[1901] 还从每个肿瘤启动两种另外的培养物作为对照。将这两种条件与PD-1+条件针对扩增动力学和TCR-Vβ克隆型进行比较。

[1902] (5)PD-$1^{阴性}$Gen 2

[1903] (6)本体TIL Gen 2

[1904] 在第17天采集PD-1+早期REP切片,而在第22天采集所有其它培养物(参见表-1a)。

[1905] 细胞分选输出

[1906] 第1期研究中使用的两个肿瘤的FACS的输出汇总于下表35中。

[1907] 表35:通过流式细胞术分选前和分选后PD-1+TIL的纯度。

[1908]

属性	肺(L4093)	黑素瘤(M1135)
CD3+%	8.17%	1.77%
PD-1+%(CD3+的)	79%	65%
估算TVC分选前(CD3+PD-1+%)	5.6e5(6.5%)	4.88e4(1.2%)
所分选的TVC(产率%)	4.5e5(80.7%)	4.8e4(98.4)
分选后纯度(PD-1+%)**	94%	88%

[1909] *纯度是基于FSC/CD3+/PD-1+而不是基于活细胞,因为在用于后续培养的细胞的流式分选期间不添加活力染料。

[1910] PD-1+细胞的产率%和分选后纯度对于两个肿瘤都是高的。这些结果表明,用于小规模可行性研究的实验参数是令人满意的。

[1911] REP1和REP2输出

[1912] 在REP-1和REP-2之后使用NC 200测量总活细胞(TVC),并且示出于下表36中。使用

因子将TVC的表中表示的数字外推到全规模工艺。

[1913] 表36:小规模制造和产物属性的汇总

[1914]

REP	所测量的属性	肿瘤 ID							
		L4093				M1135			
		PD1+研究	*PD-1+Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+早期REP*	*PD1+研究*	*PD-1+Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+早期REP*
REP-1	所接种的 TVC（外推）	4.48e5	4.48e5	4.48e5	4.48e5	4.8e4	4.8e4	4.8e4	4.8e4
	所采集的 TVC（外推）	599e6	560e6	225e6	44e6	34e6	272e6	256e6	46e6
	REP-1 扩增倍数	1336	1249	503	99	705	5670	5334	958
REP-2	所接种的 TVC（外推）	599e6	200e6	200e6	44e6	34e6	200e6	200e6	44e6
	所采集的 TVC（外推）	24e9	97e9	64e9	55e9	4.3e9	99e9	97e9	37e9
	REP-2 扩增倍数	40	483	318	1235	128	497	483	811
	活力%	96	98	95	92	95	98	94	93
	CD45+CD3+%	98.5	96.8	98.2	99.1	88.2	94.3	90.4	98.7
	IFNγ（pg/mL）	4005	4446	5646	14009	1784	3147	2757	4458
	颗粒酶 B（pg/mL）	8397	7903	10387	46654	3642	3428	6336	25194
	CD4+CD107A%（刺激）	NT	40	44	42	NT	40	38	55
	CD8+CD107A%（刺激）	NT	68	43	66	NT	42	47	82

[1915] 扩增倍数＝所采集的TVC/所接种的TVC

[1916] 从CD3+CD4+或CD3+CD8+门控群体计算CD107A%

[1917] 工艺产率:实验的PD-1+Gen 2组在REP-1采集时产生超过200e6,并且在REP-2采集时产生超过90e9 TIL(具有活力>98%和94%CD45+CD3+细胞),这表明PD1+Gen 2是产生足够的细胞用于全规模制造的可行工艺。当与PD-1^{阴性}或本体TIL条件相比时,从PD-1+Gen2条件采集的REP-1显示出更低的扩增倍数。这一发现与先前的研究发现一致。

[1918] 功能:从PD-1+Gen 2工艺扩增的TIL以与使用研究工艺响应于抗CD3/CD28/CD137珠粒刺激产生的TIL类似的水平释放IFNγ和颗粒酶B(表34)。在所有测试的参数中,来自PD-1+确定成分培养基条件的REP-1和REP-2产物与用于PD-1+Gen 2条件的对应产物类似。有趣的是,总培养持续时间为17天的PD-1+早期REP条件(与PD-1+Gen 2工艺的22天)产生57%(Rep-1)和37%(REP-2)的对应PD-1+Gen 2条件。进一步地,当与其它条件相比时,PD-1+早期REP TIL产生的IFNγ和颗粒酶B水平高2倍多,这表明PD-1+早期REP TIL可能比使用其它条件产生的TIL更活跃地生长并且代谢更活跃。鉴于TIL在培养中的倍增时间通常<1天,这一起表明相当的细胞输出(相对于细胞数)和更高的功能性(相对于IFNγ和颗粒酶B释放)可以通过将PD-1+早期REP培养持续时间略微增加到18或19天相对于PD-1+Gen 2的22天来实现。在活化的T细胞表面上的CD107A表达是T淋巴细胞功能的量度。当用PMA/IO(CD4+和CD8+TIL两者)刺激时,所有PD1+TIL表达高水平CD107A。

[1919] TIL寿命:表37描述了如通过荧光原位杂交流式细胞术(FISH Flow)确定的REP-2采集的TIL端粒长度。

[1920] 表37:与对照(1301)细胞系相比的相对端粒长度(RTL)的汇总

[1921]

TIL 表征	L4093		M1135	
	PD-1+ Gen 2	*本体 TIL Gen 2*	*PD-1+ Gen 2*	*本体 TIL Gen 2*
相对端粒长度	8.1	5.2	6.5	7.5

[1922] 将L4093和M1135的样品中的端粒长度与对照细胞系(1301白血病)进行比较。对照是具有长的稳定端粒的四倍体细胞系,所述四倍体细胞系允许计算相对端粒长度。当与本体TIL相比时,PD1+TIL的端粒在一种情况下更长并且在另一种情况下略微更短,这表明PD-1+TIL相对于本体TIL维持其寿命。

[1923] TIL克隆性:表38描述了如通过TCR Vβ库测量的来自REP 2采集的TIL的克隆性。

[1924] 表38:L4093和M1135的TCR Vβ库汇总

[1925]

TIL 表征	L4093		M1135	
	PD-1+ Gen 2	*本体 TIL Gen 2*	*PD-1+ Gen 2*	*本体 TIL Gen 2*
uCDR3	2886	6537	2371	7128
香农熵指数	5.7	8.1	5.5	8.6
与本体条件共享的部分	46	n/a	12	n/a

[1926] 肺和黑素瘤TIL两者的PD-1+Gen2条件的独特CDR3序列的数量是相当的。另外,PD-1+Gen 2条件的TCR Vβ库显示出与本体TIL的对应库超过10%的重叠。PD1+Gen 2条件的多样性指数(香农熵)小于本体TIL的多样性指数,这表明与本体TIL的对应库相比,PD1+Gen2条件的TCR Vβ库的多克隆少且寡克隆多。

[1927] 经扩展的表型:表39-41描述了来自TIL的经扩展的表型分析的结果。使用多色流式细胞术来表征REP-2 TIL的TIL纯度、同一性、记忆亚群、活化和耗尽状态。

[1928] 表39:TIL纯度、同一性和记忆表型表征

[1929]

表征(%)	L4093				M1135			
	PD1+ 研究	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+ 早期 REP*	*PD1+ 研究*	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+ 早期 REP*
NK 细胞	0	0	0.1	0	0	0	0.3	0.1
B 细胞 (CD3-CD19+)	0	0	0	0	0	0	0	0
单核细胞 (CD14+)	0.1	0.1	0	0	0.1	0	0	0
TCRαβ	98.8	97.9	99.2	99.3	98.7	95.6	98.8	98.8
TCRγδ	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0	0	0
$TCR\alpha\beta^{+}$ $CD4^{+}$	91.1	79.6	77.8	89.1	75.8	90.6	86.1	90.4
$TCR\alpha\beta^{+}$ $CD8^{+}$	8.5	20.2	21.8	10.5	17.4	9	11.1	8.5
原初: CCR7+CD45RA+	0	0	0	0	0	0	0	0
T-EM: CCR7-CD45RA	99.9	99.6	99.7	99.8	99.8	99.9	99.7	99.6
T-CM: CCR7+CD45RA	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0	0.1	0.4
T-CM: CD62L+CD45RA	0	0.1	2	1.3	0	0.6	0.9	7.4
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+	0	0.3	0.2	0	0.1	0	0.1	0

[1930] NK细胞:对活/CD14-/CD3-/CD19-/CD56+和/或CD16+进行门控的天然杀伤细胞,B

细胞;对活/CD14-/CD3-/CD19+,单核细胞进行门控;活/CD14+、TCRα/β;对活/CD14-/CD3+/TCRγ/δ-,记忆细胞进行门控;对活/CD14-/CD3+/TCRγ/δ-、T-EM进行门控;效应子,T-CM;中央记忆,T-EFF/TEMRA;效应子/RA+效应子记忆。

[1931] 表40:CD4+TIL的活化和耗尽状态

[1932]

对活/CD3+/CD4+进行门控的特性(CD4+)(%)	L4093				M1135			
	PD-1+研究	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+早期REP*	*PD-1+研究*	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+早期REP*
CD27+	2	2.8	1.5	6.3	2.2	3.8	2.1	3.8
CD28+	99.2	95.7	94.8	98.9	97.9	95.2	93.4	99
CD57+	31	23.1	29.8	14.1	11.4	15.7	13.8	6.7
2B4+	10.1	7.7	13.7	10.8	4.3	1.2	0.8	1.4
BTLA4+	99.7	99.5	99.9	99.9	99.6	99.8	99.8	99.8
*CCR4+	94.2	85.7	81.7	91.9	99	96	94.8	96.1
CD25+	2.6	2.6	12.3	11.3	35.6	2.5	4.8	45.9
CD69+	31.6	40.2	25	23.6	41.7	28.9	24.2	25.9
CD95+	99.9	99.2	99.8	99.7	99.9	99.2	99	99.9
CD103+	3.6	0.7	1	1.7	1	0.4	0.5	0.7
**CXCR3+	10.7	12.3	20.2	9.4	4.7	22	6.1	5.5
KLRG1+	6.7	14.7	1.4	11.8	2	1.7	1.1	1.8
LAG3+	10	14.7	4.4	14.3	10.4	15.7	4.3	15.5
PD1+	6.5	1.8	0.4	3.4	7.5	2.4	0.5	4.1
TIGIT+	13.2	9.2	17	36.7	50.8	18	43.6	44.6
TIM3+	93.4	95.7	92.5	98.4	88.3	80.7	86.1	96.9

[1933] *百分比是根据(CXCR3+CCR4+和CXCR3-CCR4+)计算出的。

[1934] **百分比是根据(CXCR3-CCR4-和CXCR3+CCR4-)计算出的。

[1935] 表41:CD8+TIL的活化和耗尽状态

[1936]

对活/CD3+/CD8+进行门控的特性(CD8+)	L4093				M1135			
	PD-1+研究	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+早期REP*	*PD-1+研究*	*PD-1+ Gen 2*	*PD-1+确定成分培养基*	*PD-1+早期REP*
CD27+(%)	5.1	6.8	3.7	10.8	2.1	6	13.8	5.4
CD28+(%)	97.6	93	91.7	96.4	95.8	95.5	88.7	94.6
CD57+(%)	11.5	4.6	7.1	6.5	12.8	4.8	9	4.5
2B4+(%)	37.2	17.1	32.9	29.5	0.8	0.8	10.4	1.2
BTLA4+(%)	99.9	99.8	99.9	100	99.8	100	99.7	99.8
*CCR4+(%)	84.1	79.8	67.4	88.7	97.1	86.6	89.1	96.1
CD25+(%)	1.8	0.7	3.7	9.9	33.8	3.6	1.1	58.2
CD69+(%)	68.3	52	60.7	52.2	74.2	59	85.2	80.3
CD95+(%)	99.8	99.2	99.7	99.5	99.9	99.2	99.1	99.5
CD103+(%)	1.9	17.2	2.9	17.4	0.1	0.4	0.4	1.1
**CXCR3+(%)	12.4	18.1	33.7	15.4	5.7	24.4	17.1	6.7
KLRG1+(%)	24.8	3.5	3.2	15.3	2.8	3.0	1.2	2.8
LAG3+(%)	34.8	46.2	30.3	45.7	29.6	40.3	28.3	58.2
PD1+(%)	8.8	5.2	1	4	4.5	1.9	0.4	4
TIGIT+(%)	77.4	77.6	71.3	91.2	99.3	79.6	86.8	92.9
TIM3+(%)	90.9	92.8	93.2	97.7	96.5	88.6	96.8	99.2

[1937] *百分比是根据(CXCR3+CCR4+和CXCR3-CCR4+)计算出的。

[1938] **百分比是根据(CXCR3-CCR4-和CXCR3+CCR4-)计算出的。

[1939] PD-1+Gen 2 TIL主要包含TCRαβ与小于0.2%TCRγδ细胞。包含B细胞、单核细胞和NK细胞的非T细胞群体各自<0.3%。包含PD-1+Gen 2 TIL的所有条件主要是效应子记忆表型并且用高水平的CD28+、BTLA+、CD95+表达较少分化。

[1940] PD-1+条件的TIL的活化(CD69+)和耗尽(KLRG1+)状态与使用Gen 2制造工艺产生的黑素瘤TIL的历史结果是相当的。

[1941] 基于工艺产率、功能、表型,当与PD-1+确定成分培养基和PD-1+早期REP相比时,PD-1+Gen 2显示出有希望的质量属性。

[1942] 第2期全规模实验结果

[1943] 在第2期研究中使用一个黑素瘤(M1137)和两个头颈(H3032和H3034)肿瘤。简言之,将每个肿瘤进行酶消化,对PD-1+细胞进行流式分选,并且使用表31中描述的PD-1+Gen 2工艺在第0天以全规模启动培养。

[1944] 流式分选输出

[1945] 第2期研究中使用的三个肿瘤的流式分选的输出汇总于下表42中。

[1946] 表-42:通过流式细胞术分选前和分选后PD-1+TIL的纯度。

[1947]

肿瘤 (ID)	接受标准	头颈 (H3032)	黑素瘤 (M1137)	头颈 (H3034)
CD3+%	N/A	24	13	9
PD-1+%(CD3+的)	N/A	65	45	77
TVC 分选前	N/A	5.6e5	7e5	2e5
所分选的 TVC(产率%)	N/A	1.13e5(20%)	1.9e5(25%)	5e4(25%)
*分选后纯度(PD-1%)	≥80%	90%	87%	86%

[1948] *纯度是基于FSC/CD3+/PD1+而不是基于活细胞,因为在用于后续培养的细胞的流式分选期间不添加活力染料。

[1949] 所有三个肿瘤分选后纯度(PD-1+%)均满足>80%的标准。相对于头颈肿瘤,观察到黑素瘤肿瘤的纯度略微更低,这很有可能是由于在分选时PD-1+细胞的表达较低(附录-1)。

[1950] REP-1和REP-2输出

[1951] 表43汇总了来自三个全规模实验的总活细胞计数和产物属性。

[1952] 表43:全规模制造和产物属性的汇总

[1953]

	肿瘤 (ID)	接受标准	头颈 (H3032)	黑素瘤 (M1137)	头颈 (H3034)
REP-1	所接种的 TVC	N/A	8.5e4	1.4e5	3.7e4
	所采集的 TVC	N/A	1.48e8	7.11e8	8.2e7
	REP-1 扩增倍数	N/A	1748	5097	2172
REP-2	所接种的 TVC	5 - 200e6*	148e6	200e6	82e6
	所采集的 TVC-LOVO 前	N/A	32e9	72e9	27e9
	TVC LOVO 后 (恢复%)	1 - 150e9 (N/A)	29e9 (90%)	69e9 (95.9%)	26e9 (99%)
	REP-2 扩增倍数	N/A	195	343	324
	活力%	≥ 70%	94%	95%	92%
	CD45+/CD3+%	> 90%	94%	93%	96%
	IFNγ (pg/mL)	≥ 500	8673	11347	21345
	颗粒酶 B (pg/mL)	N/A	32229	14652	37412
	CD4+CD107A%（刺激）	N/A	52	74	59
	CD8+CD107A%（刺激）	N/A	66	88	90

[1954] *基于Gen 2REP工艺的当前确立的范围在REP-2处接种的TVC的范围，并且在方案中不是正式接受标准

[1955] 扩增倍数＝所采集的TVC/所接种的TVC

[1956] 从CD3+CD4+或CD3+CD8+门控群体计算CD107A%

[1957] 工艺产率：在REP-1结束时，所有三种PD-1+TIL扩增到大于80e6(>1500倍扩增)，具有足够的产率来启动REP-2培养。在REP-2处接种的5-200e6 TVC的范围是基于当前的Gen 2REP工艺。在REP-2采集时，所有培养物产生均>26e9 TVC，其中Lovo后的恢复>90%。

[1958] 剂量：最终产物剂量>26e9 TVC(具有活力>94%和93%CD45+CD3+细胞)，即，高度富集的TIL群体。

[1959] 功能：基于用Dynabeads过夜再刺激PD-1+TIL来表征TIL的功能。再刺激24小时后收集上清液并冷冻。在上清液上进行IFNγ和颗粒酶B ELISA。IFNγ释放满足接受标准，并且所有三种TIL培养物在刺激时分泌高水平的颗粒酶B。与第1期研究中产生的TIL产物类似，当用PMA/IO(CD4+和CD8+TIL两者)刺激时，所有三种PD1+TIL表达深远的CD107A。

[1960] TIL寿命：H3032、M1137、H3034的PD-1+TIL的相对端粒长度分别是7、4.1和5.2，并且与Gen 2(QP-17-011R01)是相当的。

[1961] TIL克隆性：数据是未决的。

[1962] 经扩展的表型：表44和45描述了TIL的经扩展的表型分析。使用多色流式细胞术来表征REP-2 TIL的TIL纯度、同一性、记忆亚群、活化和耗尽状态。

[1963] 表44：TIL纯度、同一性和记忆表型表征

[1964]

表征(%)	H3032	M1137	H3034
NK细胞(CD3-CD56+)	0.1	0	0.1
B细胞(CD3-CD19+)	0	0	0
单核细胞(CD14+)	0	0	0
TCRαβ	92.2	97	97.8
TCRγδ	0.5	0.3	0.3
TCRαβ+CD4+	93.7	89.1	92.9

TCRαβ+CD8+	5.7	10.1	2.1
原初:CCR7+CD45RA+	0	0	0
T-EM:CCR7-CD45RA-	96.4	97.3	99.3
T-CM:CCR7+CD45RA-	2.5	2.6	0.6
T-EFF/TEMRA:CCR7-CD45RA+	1.1	0.1	0.1
T-CM:CD62L+CD45RA-	7.6	11.7	3.5

[1965] 表45:TIL的活化和耗尽状态

[1966]

表征（%）	CD4+			CD8+		
	H3032	M1137	H3034	H3032	M1137	H3034
CD27+	15.6	20.4	6	10.3	20.3	4.9
CD28+	76.4	78.6	83.9	90	90	76.9
CD57+	27.7	35.2	22.3	12.7	22	10.5
2B4+	3.4	4.1	0.6	4.3	4	0.7
BTLA4+	83.4	91.1	83.6	88.7	87	68.3
*CCR4+	29.4	17.4	17.3	16.1	10.2	2.3
CD25+	30.1	4.2	17.3	23.1	2.3	7.8
CD69+	14	9.8	39.7	26.7	18.5	75
CD95+	98.9	99.2	99.8	99.5	98.3	99.7
CD103+	5.7	3.8	7.9	0	0	0.1
**CXCR3+	86.3	92.8	80.3	7.3	8.1	1.5
KLRG1+	6	23.5	6.9	10.2	12.1	10.1
LAG3+	8.3	5.4	1.5	21.2	10.5	5.4
PD1+	6	1.4	0.9	14.7	5.6	1.3
TIGIT+	5.9	0.4	10.1	34.4	18.7	20.9
TIM3+	79.6	84.3	77	73.5	86.1	60

[1967] *百分比是根据(CXCR3+CCR4+和CXCR3-CCR4+)计算出的。**百分比是根据(CXCR3-CCR4-和CXCR3+CCR4-)计算出的。

[1968] 在最终采集的TIL中不存在可检测的B细胞、单核细胞或NK细胞(表-14)。REP TIL主要由TCRαβ与效应子记忆分化组成。

[1969] 所有三种PD-1+TIL似乎是CD4显性表型,具有效应子记忆表型和高CD27表达(表44)。

[1970] 耗尽标志物KLRG1小于13%,除了M1137之外(表45)。CD57、BTLA4、LAG3、PD1+、TIGIT水平类似于使用Gen 2制造工艺产生的黑素瘤TIL的历史结果。

[1971] 代谢物分析:对于所有条件,在采集的最后一天收集用过的培养基。在CEDEX生物分析仪上分析上清液的葡萄糖、乳酸盐、氨、谷氨酰胺、Glutamax和胆固醇水平(附录3)。PD-1+Gen 2条件的葡萄糖、谷氨酰胺和胆固醇水平与本体TIL条件相当。PD-1+Gen 2条件的Glutamax水平略高于本体TIL,这表明营养物的可用性不限制培养物的生长。副产物,如乳酸盐和氨与本体TIL相当。

[1972] 差异和偏差

[1973] 将来自全规模实验的PD-1+TIL最终产物样品送到iRepertoire进行TCR Vβ测序。一旦数据可用,就修改报告。

[1974] 由于材料限制,对L4093和M1135进行的小规模是在第1/50规模而非第1/100规模下进行的。不是将10%的体积、最大2e6细胞转移到G-Rex 5M烧瓶中,而是转移20%的体积、最大4e6细胞。通过将规模扩大公式从TVC/10e6(向上舍入,最大5)改变为TVC/20e6(向上舍

入,最大5)来影响规模扩大。这些变化使最终外推为50X而不是100X,以外推到全规模。本报告前面部分的细节反映了这种变化。

[1975] 结论

[1976] 以全规模开发PD-1+Gen 2工艺,以在22天内将PD-1+TIL扩增到>25e9。使用PD-1+Gen2工艺产生的所有质量属性,如表型表征(包含纯度、记忆、活化、耗尽标志物和TIL的功能)与黑素瘤Gen 2相当。

[1977] 汇总表46:

[1978]

测试参数	接受标准	H&N 3032	M1137	H&N 3034
外观	袋子完好,无团块迹象	合格	合格	合格
细胞活力	≥70%	合格	合格	合格
总活细胞计数	1×10e9到150×10e9	合格	合格	合格
同一性(CD3/%CD45+%)	>90%CD3+CD45+细胞	合格	合格	合格
IFNγ(经刺激的-未经刺激的)	≥500pg/mL	合格	合格	合格

[1979] 选择PD-1+Gen2工艺用于进一步开发PD-1选择的TIL产物。

[1980] 基于小规模下获得的结果,用PD-1+早期REP条件进行另外的实验,以将PD-1+扩增工艺表征为17-19天的较短持续时间,而不损害剂量或产物功能。参见图156。

[1981] 实例10的参考文献:

[1982] 1.Rosenberg,S.A.等人,使用T细胞转移免疫疗法在严重预处理的患有转移性黑素瘤的患者中持久的完全应答.《临床癌症研究》,2011.17(13):第4550-7页。

[1983] 2.Kvistborg,P.等人,TIL疗法拓宽了黑素瘤患者的肿瘤反应性CD8(+)T细胞区室.《肿瘤免疫学》,2012.1(4):第409-418页。

[1984] 3.Simoni,Y.等人,旁观者CD8(+)T细胞在人肿瘤浸润中是丰富的并且在表型上不同.《自然》,2018.557(7706):第575-579页。

[1985] 4.Schumacher,T.N.和R.D.Schreiber,癌症免疫疗法中的新抗原.《科学》,2015.348(6230):第69-74页。

[1986] 5.Turcotte,S.等人,来自胃肠癌和黑素瘤的浸润内脏转移的T细胞的表型和功能:过继性细胞转移疗法的暗示.《免疫学杂志》,2013.191(5):第2217-25页。

[1987] 6.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[1988] 7.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[1989] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[1990] 表47:L4093的TIL扩增(外推到全规模)的汇总

[1991]

L4093 条件	REP1-第 0 天	REP1-第 7 天	REP1-第 11 天（扩增倍数）	REP2-第 17 天	REP2-第 22 天
研究	448000	NA	5.99E+08（1336）	NA	2.42E+10
Gen 2.1 样 PD-1+	448000	NA	5.60E+08（1249）	NA	9.66E+10
Gen 2.1 样 PD-1+（DM）	448000	NA	2.25E+08（503）	NA	6.37E+10
Gen 2.1 样 PD-1-	448000	NA	8.75E+08（1954）	NA	7.16E+10
Gen 2.1 样本体 TIL	448000	NA	1.80E+09（4022）	NA	8.58E+10
17 天早期 REP	448000	4.43E+07	NA	5.5E+10	NA

[1992] 表48:M1135的TIL扩增(外推到全规模)的汇总

[1993]

M1135 条件	REP1-第 0 天	REP1-第 7 天	REP1-第 11 天（扩增倍数）	REP2-第 17 天	REP2-第 22 天
研究	48000	NA	3.38E+07（705）	NA	4.34E+09
Gen 2.1 样 PD-1+	48000	NA	2.72E+08（5670）	NA	9.94E+10
Gen 2.1 样 PD-1+（DM）	48000	NA	2.56E+08（5334）	NA	9.65E+10
Gen 2.1 样 PD-1-	48000	NA	2.73E+08（5693）	NA	2.10E+09
Gen 2.1 样本体 TIL	48000	NA	1.52E+09（31604）	NA	9.16E+10
17 天早期 REP	48000	4.60E+07	NA	3.7E+10	NA

[1994] 表49:H3032、M1137和H3034的本体TIL扩增(外推到全规模)的汇总

[1995]

条件	REP1-第 0 天	REP1-第 7 天	REP1-第 11 天（扩增倍数）	REP2-第 17 天	REP2-第 22 天
本体 TIL H3032	84700	NA	1.61E+08（1905）	NA	7.78E+10
本体 TIL M1137	140000	NA	3.84E+08（2752）	NA	6.89E+10
本体 TIL H3034	37600	NA	4.16E+07（1105）	NA	5.21E+10

[1996] NA—不适用

[1997] 表50:用过的培养基中的代谢物水平的汇总

[1998]

肿瘤	代谢物	基线（CM4）	研究	Gen 2 PD-1（+）	Gen 2 PD-1（-）	本体 TIL	第17天 ER
L4093	葡萄糖（g/L）	3.01	0.11	0.98	1.11	0.97	0.95
M1135			0.14	1.21	1.26	1.04	1.06
H3032			---	1.44	---	1.3	---
M1137			---	1.48	---	1.46	---
H3034			---	1.35	---	1.78	---
L4093	乳酸盐（g/L）	0	1.5	1.72	1.6	1.72	1.78
M1135			1.67	1.49	1.5	1.66	1.67
H3032			---	1.27	---	1.39	---
M1137			---	1.28	---	1.26	---
H3034			---	1.4	---	1.07	---
L4093	氨（mmol/L）	0.57	2.96	2.12	2.13	2.18	2.47
M1135			2.95	2.06	2.06	2.22	2.31
H3032			---	2.19	---	2.29	---
M1137			---	2.24	---	2.22	---
H3034			---	1.95	---	1.62	---
L4093	谷氨酰胺（mmol/L）	1.83	0.03	1.84	1.84	1.84	1.45
M1135			0.03	2.01	2.04	1.79	1.66
H3032			---	1.96	---	1.85	---
M1137			---	2.01	---	1.89	---
H3034			---	2.09	---	0.67	---
L4093	Glutamax（mmol/L）	4.11	0.01	1.99	1.98	1.98	1.56
M1135			0.02	2.18	2.21	1.95	1.79
H3032			---	2.12	---	2	---
M1137			---	2.15	---	2.02	---
H3034			---	2.25	---	0.71	---
L4093	胆固醇（g/L）	0.02	0.17	0.02	0.02	0.02	0.03
M1135			0.15	0.02	0.02	0.02	0.03
H3032			---	0.02	---	0.02	---
M1137			---	0.02	---	0.02	---
H3034			---	0.02	---	0.02	---

[1999] 表51

[2000]

材料/试剂/设备	样品 ID									
	L4093		M1135		H3032		M1137		H3034	
	批号/资产号/不适用（N/A）	有效期/不适用（N/A）	批号/资产号/不适用（N/A）	有效期/不适用（N/A）	批号/资产号/不适用（N/A）	有效期/不适用（N/A）	批号/资产号/不适用(N/A)	有效期/不适用（N/A）	批号/资产号/不适用（N/A）	有效期/不适用（N/A）
抗 CD3 抗体	B2499555	10/31/2024	B2499555	10/31/2024	B2499555	10/31/2024	B2499555	10/31/2024	B2499555	10/31/2024
抗 IgG4 抗体	10817T998B	2019 年 10 月	10817T998B	2019 年 10 月	10817T998B	2019 年 10 月	10817T998B	2019 年 10 月	10817T998B	2019 年 10 月
抗 PD1 抗体	B252643	12/31/2022	B252643	12/31/2022	B252643	12/31/2022	B252643	12/31/2022	B252643	12/31/2022
DNA 酶 1	35999731	2020 年 1 月	35999731	2020 年 1 月	35999731	2020 年 1 月	35999731	2020 年 1 月	35999731	2020 年 1 月
胶原酶	10000015	02/28/2023	10000015	02/28/2023	10000015	02/28/2023	10000015	02/28/2023	10000015	02/28/2023
中性蛋白酶	10020005	12/31/2020	10020005	12/31/2020	10020005	12/31/2020	10020005	12/31/2020	10020005	12/31/2020
C 管	5180621392	06/28/2021	5180621392	06/28/2021	5180621392	06/28/2021	5180621392	06/28/2021	5180621392	06/28/2021
具有加热器的 Octo 解离器	1573	n/a	1573	n/a	1573	n/a	1573	n/a	1573	n/a
细胞滤网	154246	n/a	154246	n/a	154246	n/a	154246	n/a	154246	n/a
自动设置珠粒	T1804148	04/11/2019	T1804148	04/11/2019	T1804148	04/11/2019	T1804148	04/11/2019	T1804148	04/11/2019
PBS-EDTA 袋子	5180904466	08-14-2021	5180904466	08-14-2021	5180904466	08-14-2021	5180904466	08-14-2021	5180904466	08-14-2021
PEEK 样品线	*	n/a	*	n/a	PKSLR1S-000555	n/a	PKSLR1S-000538	n/a	PKSLR1S-001286	n/a
护套线	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
分选芯片	T1810151	10/09/2019	T1810151	10/09/2019	T1810151	10/09/2019	T1810151	10/09/2019	T1810151	10/09/2019
BSC	126112	n/a	126112	n/a	126112	n/a	126112	n/a	126112	n/a
索尼 FX500	500708	n/a	500708	n/a	500708	n/a	500708	n/a	500708	n/a

[2001] 实例10:直接体外选择和扩增PD1^{高}细胞:用于ACT疗法的增强肿瘤反应性TIL的方法

[2002] 介绍

[2003] 用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)进行的过继性T细胞疗法已经在患有转移性黑素瘤的患者的组群中证明了持久的应答率[1]。用于治疗的TIL产物包含识别肿瘤特异性抗原、突变源性患者特异性新抗原和非肿瘤相关抗原的异质T细胞[2、3]。研究已经证明,新抗原特异性T细胞显著有助于TIL的抗肿瘤活性[4]。预期针对肿瘤反应性富集TIL的策略产生更有效的治疗产物,尤其是在已知含有高比例的旁观者T细胞的上皮癌中[5]。若干研究已经证明,在TIL上PD1(通常与T细胞耗尽相关的标志物)的表达鉴定自体肿瘤反应性T细胞[6、7、8]。本实例中呈现的是一种新方案的开发,所述新方案被设计成选择PD1^{高}细胞并且针对自体肿瘤反应性T细胞富集TIL产物。

[2004] 目的

[2005] 本实例提供了用于分选和扩增PD1^{高}TIL并表征所得产物的方案。

[2006] 范围

[2007] 这项研究涉及使用2-REP方案从黑素瘤、肺癌和头颈癌扩增离体分选的PD1^{高}TIL。针对生长、活力、表型、功能(IFNγ分泌、CD107a动员)、肿瘤杀伤和反应性(X-CELLigence)和TCRvβ库(通过流式细胞术和RNA测序)对扩增TIL进行评估。图131中提供了方案方法概述。

[2008] 材料

[2009] 肿瘤组织

[2010] 从UPMC、Moffitt、Biotheme和MT基团获得各种组织学的肿瘤。

[2011] 用于TIL生长的标准试剂,其包含:G-Rex 24孔板,以及10和100M烧瓶(威尔森沃尔夫公司(Wilson Wolf),明尼苏达州,目录号P/N 80192M;目录号80040S;目录号P/N 80500);CM2培养基;RPMI 1640培养基(生命技术公司,加利福尼亚州,目录号11875093);AIMV培养基(Gibco,马萨诸塞州,目录号0870112-DK);谷氨酸盐(Gibco,马萨诸塞州,目录号30050-061);β-巯基乙醇(Gibco,马萨诸塞州,目录号21985-023);人类AB血清(双子座(Gemini),加利福尼亚州,目录号100-512);0.5mg/ml庆大霉素(Gibco,马萨诸塞州,目录号15750-060);和GMP重组IL-2(Cell-Genix,德国,目录号1020-1000)。

[2012] 分析试剂

[2013] 流式细胞术补偿珠粒:胺反应性补偿珠粒试剂盒(ARC)(生命技术公司,加利福尼亚州,目录号A10346)和VersaComp抗体捕获试剂盒(贝克曼库尔特公司,加利福尼亚州,目录号B22804)。

[2014] 流式细胞术抗体(TIL1、TIL2(用于TIL、v1和v2的表面抗原染色的TIL2组))、TIL3和(CD107a(通过CD107a动员评估TIL功能));ArC胺反应性补偿珠粒试剂盒(飞世尔科技公司(Fisher Scientific),马萨诸塞州,目录号A10346);佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)(西格玛,密苏里州,目录号P1586);康宁Bio-Coat T细胞活化板抗CD3(飞世尔科技公司,马萨诸塞州,目录号NC9937781);康宁Bio-Coat T细胞活化对照板抗CD3(飞世尔科技公司,马萨诸塞州,目录号NC1108453);R&D系统公司人类IFNγQuantikine试剂盒(R&D系统公司,明尼苏达州,目录号SIF50);碎片去除溶液(美天旎生物技术公司,德国,目录号130-109-398);和R&D系统公司人类IFNγQuantikine试剂盒(R&D系统公司,明尼苏达州,目录号SIF50)。

[2015] 程序

[2016] 肿瘤制备

[2017] 从研究联盟(UPMC,Moffitt)和组织采购供应商(Biotheme和MTG集团)获得新鲜切除的肿瘤样品。将肿瘤在HypoThermosol(生物生命解决方案公司,华盛顿,目录号101104)(含抗生素)中运送过夜。

[2018] 从其一级和二级包装中去除肿瘤,对具有肿瘤和运送培养基的小瓶进行称重并且记录质量。从小瓶中去除肿瘤,并且对小瓶和运送培养基进行再称重。计算肿瘤的质量(小瓶质量+运送培养基+肿瘤)-(小瓶+运送培养基)。

[2019] 将整个肿瘤碎裂为大约4-6-mm^{3}的碎片,以进行肿瘤消化。如果肿瘤足够大,则针对Gen2建立四个3mm^{3}的碎片。可以使用本文所述的任何质子消化肿瘤。

[2020] 用于肿瘤消化的酶制剂(使用研究级DNA酶、胶原酶和透明质酸酶)

[2021] 以针对以下消化酶中的每种消化酶所指示的无菌HBSS的量重构冻干酶。这些酶被

制备为10X。上下移液若干次并且涡旋以确保完全重构。

[2022] 在10-ml HBSS中重构1-g胶原酶IV(西格玛,MO,C5138)(以制备100-mg/ml储备液)。通过上下移液进行混合以溶解。如果在重构后未溶解,则置于37℃H_2O浴中5分钟。等分到1-ml小瓶中。这是胶原酶的100-mg/ml 10X工作储备液。

[2023] 制备DNA酶(西格玛,MO,D5025)储备溶液(10,000-IU/ml)。在随附的数据表中提供了每个批次的DNA酶单位。计算适当体积的HBSS以重构100-mg冻干DNA酶储备液。例如,如果DNA酶储备液为2000-U/mg,则储备液中的总DNA酶为200,000-IU(2000-IU/mg X 100-mg)。为了稀释到工作储备液为10,000IU,将20-ml的HBSS添加到100mg的DNA酶中(200,000IU/20ml=10,000U/ml)。等分到1-ml小瓶中。这是DNA酶的10,000IU/ml 10X工作储备液。

[2024] 准备10-mg/ml的透明质酸酶(西格玛,MO,H2126)储备溶液。用50-ml的HBSS重构500-mg小瓶以制备10-mg/ml储备溶液。等分到1-ml小瓶中。这是透明质酸酶的10-mg/ml10X工作储备液。

[2025] 将储备液消化酶稀释到1X。为了制备1X工作溶液,向3.5-ml的HBSS中添加500-ml的胶原酶、DNA酶和透明质酸酶中的每一种。将消化混合物直接添加到C管中。

[2026] 用于肿瘤消化的酶制剂(使用GMP胶原酶和中性蛋白酶)

[2027] 以针对以下消化酶中的每种消化酶所指示的无菌HBSS的量重构冻干酶。上下移液若干次并且涡旋以确保完全重构。

[2028] 在10-ml无菌HBSS中重构胶原酶AF-1(Nordmark,瑞典,N0003554)。冻干的储备酶的浓度为2892PZ U/小瓶。因此,重构之后,胶原酶储备液为289.2PZ U/ml。注意,酶的储备液可以改变,从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量。

[2029] 在1-ml无菌HBSS中重构中性蛋白酶(Nordmark,瑞典,N0003553)。冻干的储备酶的浓度为175DMC U/小瓶。因此,重构之后,中性蛋白酶储备液为175DMC/ml。注意,酶的储备液可以改变,从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量。

[2030] 在1-ml无菌HBSS中重构DNA酶I(罗氏公司(Roche),瑞士,03724751)。冻干的储备酶的浓度为4KU/小瓶。因此,重构之后,DNA酶储备液为4KU/小瓶。注意,酶的储备液可以改变,从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量。

[2031] 准备工作的GMP消化混合物。将10.2-μl的中性蛋白酶(0.36DMC U/ml)、21.3-μl的胶原酶AF-1(1.2PZ/ml)和250-μl的DNA酶I(200U/ml)添加到4.7-ml的无菌HBSS中。将消化混合物直接置于C管中。

[2032] 肿瘤处理和消化

[2033] 如果使用GentleMACS OctoDissociator将肿瘤碎片转移到上述5-ml的消化混合物(在HBSS中)中的GentleMACS C-管(C-管)或50-ml锥形管中。将2-3个碎片(4-6mm)转移到每个C管。

[2034] 将每个C管(美天旎生物技术公司,德国,130-096-334)转移到GentleMACS OctoDissociator(美天旎生物技术公司,德国,130-095-937)中。根据制造商的说明书使用。注意,每种肿瘤组织学具有建议的肿瘤解离程序。选择适当的程序用于相应的肿瘤组织学。解离需要大约一小时。

[2035] 如果GentleMACS OctoDissociator不适用,则使用标准旋转器。将2-3个肿瘤碎片

置于50-ml锥形管(用石蜡膜密封以避免渗漏)中并固定到旋转器。将旋转器置于37℃、5％ CO_2加湿的温育箱中持续旋转1-2小时。可替代地,肿瘤碎片可以在室温下消化过夜,也伴随有恒定旋转。

[2036] 消化后,从Octodissociator或旋转器中去除C管。将0.22-μm滤网连接到无菌Falcon锥形管。使用移液管,使来自C管或50ml锥形管(5ml)中的所有内容物通过0.22-μm滤网进入50ml锥形管中。用10-ml的HBSS洗涤C管/50-ml锥形管并且应用于滤网。使用无菌注射器柱塞的平端来通过过滤器解离任何剩余的未消化的肿瘤。添加CM1或HBSS直到50-ml并且对所述管进行加盖。

[2037] 在室温下通过以1500rpm离心5分钟将样品沉淀(其中加减速度为9)。

[2038] 小心地去除液体,将沉淀物重悬于5-ml的CM1中,用于细胞计数和活力评估。

[2039] 将全肿瘤消化物留出用于如下:1.细胞培养(未经选择的TIL对照);2.FMO流式细胞术对照;3.分选前全肿瘤消化表型分型测定;4.冷冻用于肿瘤反应性/细胞杀伤测定。留出的细胞数取决于总消化产率和肿瘤组织学。

[2040] 使用碎片去除试剂盒清理消化物

[2041] 根据制造商的说明书,使用碎片去除溶液(美天旎生物技术公司,德国,目录号130-109-398)从肿瘤消化物中去除碎片。在4℃下,以300Xg离心肿瘤细胞悬浮液10分钟,并且完全抽吸上清液。根据下表,用适当体积的冷缓冲液小心地重悬细胞悬浮液,并且将细胞悬浮液转移到15ml锥形管中。没有涡旋。

[2042] 表52:溶液

[2043]

	重悬浮液(PBS)	碎片去除溶液	覆盖层(PBS)
0.5-1g组织	6200-ul	1800-ul	4-ml
,>0.5g组织	3100-ul	900-ul	4-ml

[2044] 添加适当体积的冷碎片去除溶液并且通过使用5-ml移液管缓慢上下移液10-20次来充分混合。用4-ml的冷缓冲液非常轻轻地覆盖。倾斜管并非常缓慢地移液以确保PBS/D-PBS相覆盖细胞悬浮液,并且各相不混合。在4℃下以3000Xg离心肿瘤细胞悬浮液10分钟,同时完全加速且完全中断。形成三个阶段。完全抽吸这两个顶部相并且丢弃所述两个顶部相。底部相含有碎片去除溶液和细胞。留下至少与添加的碎片去除溶液一样多的底部体积。(即,如果添加1ml溶液,则在管的底部留下至少1-ml溶液)。用冷缓冲液培养高达15-ml并且将管倒置至少三次。没有涡旋。在4℃和1000Xg下离心10分钟,同时完全加速且完全中断。将细胞重悬于HBSS或培养基中用于细胞计数。

[2045] 染色消化的肿瘤用于流式细胞术分析和细胞分选

[2046] 根据以下方案,用包含染色PD1-PE、抗IgG4 Fc-PE(针对纳武单抗和派姆单抗的二级抗体)和CD3-FITC的混合物对肿瘤消化物进行染色。计数后,将细胞重悬于10-ml HBSS中。

[2047] 将沉淀物重悬于FACS缓冲液(1X HBSS,1mM EDTA,2％胎牛血清)中。添加到沉淀物中的FACS缓冲液的量基于沉淀物的大小。染色体积应为约沉淀物大小的约3倍(300-μl的细胞,缓冲液的体积应为至少900-μl)。

[2048] 对于抗体添加,每个100-μl的体积相当于一个测试(抗体的滴定量)。即,如果存在1-ml的体积,则需要10X滴定的抗体的量。

[2049] 每100-μl体积添加3-μl抗CD3-FITC(BD生物科学公司,新泽西州,目录号561807)、2.5-μl抗PD1-PE(Biolegend公司,加利福尼亚州,目录号329906)。还以1:500添加抗IgG4Fc-PE(南方生物技术公司,亚拉巴马州,目录号9200-09)。对于每500μl的FACS缓冲液,添加1μl的抗IgG4 Fc-PE。

[2050] 在冰上温育细胞30分钟。温育期间避光。温育期间搅拌几次。将细胞重悬于20-ml的FACS缓冲液中。使溶液通过70-μm细胞滤网进入新的50-ml锥形管中。在室温下以400Xg离心5分钟(加减速度为9)。抽吸。将细胞重悬于FACS缓冲液中的高达10e^6/ml TOTAL(活+死)中。最小体积为300-μl。转移到无菌聚丙烯FACS管或15-ml锥形管。3毫升/管用于FACS分选。为分选群体制备15-ml收集管。将2ml的FACS缓冲液置于管中。

[2051] 细胞计数和活力

[2052] 使用Nexcelom Cellometer K2(Nexcelom,马萨诸塞州)获取细胞和活力计数。

[2053] FACS分选(FX500启动)

[2054] 打开机器并运行细胞分选器软件。运行自动校准。

[2055] 用10-ml无菌去离子水制备五个无菌15-ml锥形管。用4-ml无菌去离子水制备五个无菌5-ml FACS管。用12-ml的70%EtOH制备五个无菌15-ml锥形管。用12-ml的10%次氯酸钠制备五个无菌15-ml锥形管。

[2056] 样品收集

[2057] 证实样品腔室和收集腔室处于5℃并且选择搅拌样品图标。用样品收集软件程序进行。

[2058] 将含有PBMC对照的管置于样品收集平台上。

[2059] 针对以上看到的两个下拉菜单选择100,000个细胞集合。证实细胞群体被正确门控。通过使用PBMC、FMO对照和样品本身来区分三个群体,将门设置在高、中(也称为中间体)和低(也称为阴性)。参见图132。

[2060] 可能需要调整BSC或FSC设置。未调整任何其它通道的电压。装载PE FMO对照管并且运行样品。根据需要调整PD1门。参见图133。

[2061] 当门令人满意时,记录尽可能多的事件(或最多20,000个CD3事件)。可以将样品压力设置为10以加速此收集。停止收集并去除管。将先前制得的15-ml无菌dH20锥形管装载到样品平台上。选择10作为样品压力。运行软件。收集样品持续一分钟。重复直到CD3门为空的事件。去除dH20样品管并丢弃。在弯月面的底部和中间点处,用永久性标志物在待收集的管上画一条线。将待收集的样品添加到装载平台上。注意:存在总计四个待收集的级分—阴性、中、高和CD3。首先收集PD-1级分。然后最后收集CD3级分。

[2062] 选择4作为样品压力。运行软件。等待细胞出现在屏幕上。约15秒。当3个PD-1级分为可见时,按暂停。首先收集3个级分中的最低2个级分。

[2063] 打开样品腔室门,并且将15-ml收集腔室块装载到所述腔室中。将含有收集缓冲液的收集管装载到腔室块中。将加盖的管倒置若干次,以用收集缓冲液涂覆管的顶部。将管轻拍在BSC的表面上,以从管和盖的顶部去除多余的缓冲液。用样品名称和neg、中或高标记两个管。选择具有最低百分比的PD-1细胞的级分。去除盖并将管置于样品腔室块中。选择正确的右/左朝向以与管位置相匹配。继续进行装载收集。调整样品压力,使得每秒总事件低于5,000。调整样品压力以维持至少85%的分选效率。记录50,000个CD3事件。

[2064] 当样品达到大约2/3的空值时停止分选。去除含有最多事件的所收集样品。重新加盖并且置于冰上或在4℃下。将具有较低量的样品留在收集腔室中，使得在收集最高百分比PD-1样品期间可以收集更多的细胞。标记收集管并去除盖。将其置于收集腔室中。选择分选收集的适当左/右朝向。装载收集管。按压播放、记录和开始分选。当样品达到大约三分之一空值时。停止分选。去除所收集的级分。重新加盖并且置于冰上或在4℃下，并且将CD3收集管置于固持器的左侧。使左侧为CD3，并且右侧为分选空白。继续分选，直到所有样品都从样品管中取出。如果所述管“干燥”运行，也是可以的。从样品腔室中去除样品管。丢弃。从收集腔室中去除所分选的级分。对所述管进行加盖并且轻轻地倒置若干次以便将所述管的顶部附近的液滴并入到溶液中。轻轻地将管轻拍在BSC的表面上，以从管和盖的顶部去除多余的溶液。将管置于冰上。证实PD1级分的纯度百分比。将14-ml无菌dH2O锥形管置于样品腔室上。洗涤。重复。去除dH2O管，并且添加阳性级分管。将样品压力值更改为10。记录75个CD3阳性事件。立即停止管，并且将其从样品腔室中卸载。对剩余样品进行重复。导出数据并关闭仪器。

[2065] REP1启动

[2066] 具有最少细胞数(PD1高、PD1中间体或PD1阴性)的条件用于确定用于REP1启动的细胞数。CD3细胞的％(在分选期间确定)用于计算在未经选择的TIL条件下，用与PD1高、PD1中间体或PD1阴性样品相同数量的CD3细胞启动REP1所需的整个消化物中的细胞总数。REP1启动的全消化细胞的总数＝接种在REP1/％的CD3细胞中的分选细胞数。

[2067] 将大约1000-100,000个细胞CD3+细胞置于G-Rex10中，分别用7-ml或40-ml CM2(50％RPMI 1640+10％人血清、glutamax、庆大霉素和50％AimV)和3000-IU/ml的IL-2处理，持续11天。针对PD1高、PD1中间体和PD1阴性分选的群体和未经选择的TIL，启动至少一个G-Rex烧瓶。在培养启动时，向每个烧瓶中添加抗CD3(克隆:OKT3)(30-ng/ml)和饲养细胞(比率为1:100(TIL:饲养细胞))。

[2068] 将细胞在板/烧瓶中温育11天，不进行培养基更换(REP1)。

[2069] 在完成REP1时，对于G-Rex 10去除大约30-ml的培养基。通过上下移液，将细胞重悬于剩余培养基中。将细胞置于50-ml锥形管中并且以1500rpm离心5分钟(加减速度为9)。

[2070] 抽吸培养基并且将细胞重悬于10-20-ml的CM2中用于计数和活力评估。

[2071] REP2启动

[2072] 对于mini-REP2启动，将1e5细胞置于具有40-ml的CM2培养基和3000-IU/ml的IL-2的G-Rex 10中。在培养启动时，添加抗CD3(克隆:OKT3)(30-ng/ml)和饲养细胞(比率为1:100,TIL:饲养细胞)。

[2073] 对于“全规模运行”，2e6-30e6细胞在1-L的CM2培养基和3000-IU/m的IL-2中的G-Rex100M中扩增。在培养启动时，添加抗CD3(克隆:OKT3)(30-ng/ml)和饲养细胞(比率为1:100,TIL:饲养细胞)。

[2074] 在REP2的第5天(工艺的第16天)进行培养基更换(对于小规模)或培养基更换+分开(“全规模运行”)。将烧瓶的体积减小到大约10-ml(G-Rex 10)或100-ml(G-Rex 100M)并且用CM2或AimV+3000-IU/ml IL-2补充到40-ml(G-Rex 10)或1-L(G-Rex 100M)。对于“全规模运行”，将烧瓶以1:2分开。

[2075] 在REP2的第11天(或工艺的第22天)，将烧瓶的体积减小，在室温下以1500rpm离心

5分钟(加减速度为9)。

[2076] 对最终产物的细胞计数、活力、表型(TIL1、DIG1)和功能(IFNγ和CD107a)进行评估。为了进行Vβ库分析,将1e6-5e6细胞沉淀并冷冻。RNA测序由iRepertoire进行。还在共培养测定中对最终产物的肿瘤反应性进行评估并且对IFNγ进行评估。将解冻的全肿瘤消化物与TIL共培养,并且使用xCELLigence系统(ACEA生物科学有限公司,加利福尼亚州)对肿瘤反应性(通过IFNγ分泌)和杀伤(细胞溶解%)进行评估。

[2077] 结果

[2078] PD1高分选的细胞显示出增殖能力的缺陷。预期的最终产物产率预期>或=1e9。与PD1中间体、PD1阴性和未经选择的TIL相比,经扩增的PD1高细胞也是寡克隆的。基于PD1+/PD1高细胞更可能是抗原特异性的前提,PD1高细胞展现出与其未经选择的TIL对应物相比增强的肿瘤特异性杀伤能力。

[2079] 实例10的参考文献

[2080] 1.Rosenberg,S.A.等人,使用T细胞转移免疫疗法在严重预处理的患有转移性黑素瘤的患者中持久的完全应答.《临床癌症研究》,2011.17(13):第4550-7页。

[2081] 2.Kvistborg,P.等人,TIL疗法拓宽了黑素瘤患者的肿瘤反应性CD8(+)T细胞区室.《肿瘤免疫学》,2012.1(4):第409-418页。

[2082] 3.Simoni,Y.等人,旁观者CD8(+)T细胞在人肿瘤浸润中是丰富的并且在表型上不同.《自然》,2018.557(7706):第575-579页。

[2083] 4.Schumacher,T.N.和R.D.Schreiber,癌症免疫疗法中的新抗原.《科学》,2015.348(6230):第69-74页。

[2084] 5.Turcotte,S.等人,来自胃肠癌和黑素瘤的浸润内脏转移的T细胞的表型和功能:过继性细胞转移疗法的暗示.《免疫学杂志》,2013.191(5):第2217-25页。

[2085] 6.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2086] 7.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2087] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2088] 实例11:经PD1选择的TIL中的TCR库的分析

[2089] 目的

[2090] 为了确定程序性细胞死亡蛋白1(PD1)选择的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的多克隆性和多样性,并且为了将其与未经选择的TIL进行比较。

[2091] 范围

[2092] 分析了从人头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和非小细胞肺癌(NSCLC)样品产生的七对匹配的PD1选择的和未经选择的TIL的T细胞受体(TCR)库。

[2093] 信息

[2094] 癌症免疫疗法利用免疫系统来识别和破坏肿瘤细胞。靶向细胞毒性T淋巴细胞抗原4和PD1的免疫检查点抑制剂(CPI)所达到的成功已经改变了癌症治疗,并且将免疫疗法连同外科手术、化学疗法和放射疗法一起确立为标准治疗方法之一。CPI疗法导致显著持久

的临床应答,但仅在患有某些类型癌症的患者子集中,并且通常以严重副作用为代价[1、2]。

[2095] 利用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的过继性细胞疗法(ACT)已经作为针对若干癌症的强大且潜在治愈性疗法出现(Geukes Foppen等人,《分子肿瘤学(Mol Oncol)》2015)。用于ACT的TIL产物是未经选择的、非基因操作的直接从肿瘤组织恢复并且大量离体扩增的多克隆T细胞的制剂[3]。这个过程确保患者肿瘤特异性记忆T细胞的潜在多样库的恢复,而无需抗原的性质或同一性的先验知识[4]。总而言之,与其它细胞疗法(如靶向单一组织特异性或肿瘤特异性抗原并且需要插入转基因的嵌合抗原受体(CAR)和TCR T细胞)相比,ACT是更简单、偏倚更少、更安全并且可能更有效的方法。然而,当前的TIL工艺还可以允许与癌症(所谓的旁观者TIL)无关并且识别抗原,如来自爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、人巨细胞病毒(CMV)或流感病毒的抗原的T细胞的可变级分的恢复和扩增[5]。

[2096] 多系证据支持新抗原识别,随后肿瘤细胞杀伤作为TIL疗法的主要作用机制[6]。富集肿瘤新抗原特异性T细胞的TIL同时保持无偏倚以保持一定程度的多样性并且避免对抗原鉴定的需要表示一种用于优化产物的有吸引力的手段。

[2097] 作为活化诱导的T细胞调节剂,PD1已经显示响应于最近的抗原遭遇而特异性表达,并且在浸润癌组织的T细胞的情况下,特异性地标记新抗原特异性细胞[7、8]。因此实施了一种方法,通过所述方法在离体扩增之前选择TIL进行PD1表达,以相对于旁观者TIL富集相关TIL。

[2098] 在当前实例中,将经PD1选择的TIL的T细胞克隆组成与匹配的未经选择的TIL的T细胞克隆组成进行比较,以证实选择过程产生具有不同组成并且对应于未经选择的本体TIL群体的子集的患者特异性TIL产物。

[2099] 实验设计

[2100] 通过对TCRβ亚基可变区(vβ)的互补决定区3(CDR3)进行RNA测序,建立7对经PD1选择的和未经选择的TIL的克隆组成。TIL产物中的每个T细胞克隆表达可通过其CDR3vβ鉴定的独特TCR。因此,独特的CDR3vβ序列提供了克隆同一性,通过所述克隆同一性可以定义和研究TIL产物的T细胞库。

[2101] 材料

[2102] 表53中描述了这项工作中使用的肿瘤样品和TIL产物。

[2103] 表53:研究中使用的PD1选择的和未经选择的TIL的描述

[2104]

样品 ID	组织学	制备日期	REP1 扩增倍数	REP2 扩增倍数
H3035 经 PD1 选择的 TIL	HNSCC	03/15/19	350	2166
H3035 未经选择的 TIL			869	1385
H3039 经 PD1 选择的 TIL	HNSCC	04/09/19	654	1082
H3039 未经选择的 TIL			123	893
L4089 经 PD1 选择的 TIL	NSCLC	03/22/19	1502	2106
L4089 未经选择的 TIL			2821	1416
L4096 经 PD1 选择的 TIL	NSCLC	04/04/19	582	788
L4096 未经选择的 TIL			1749	919
L4097 经 PD1 选择的 TIL	NSCLC	03/22/19	230	1982
L4097 未经选择的 TIL			1147	2455
L4100 经 PD1 选择的 TIL	NSCLC	03/26/19	536	997
L4100 未经选择的 TIL			1498	900
L4106 经 PD1 选择的 TIL	NSCLC	03/29/19	1179	1367
L4106 未经选择的 TIL			4500	1912

[2105] 根据程序实例10,从2个HNSCC和5个NSCLC样品中获得经PD1选择的TIL。简言之,使用DNA酶、透明质酸酶和胶原酶IV的混合物消化全肿瘤活检。将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD1进行染色,并且在FX500仪器(索尼,总部,纽约)上进行分选。使经PD1分选的细胞和未经选择的全肿瘤消化物经受两个11天快速扩增期(REP)以分别获得经PD1选择的TIL和未经选择的TIL。在使用之前按照以下程序,将TIL产物冷冻储存并且解冻。

[2106] 方法

[2107] RNA提取

[2108] 根据制造商的方案(凯杰公司(QIAGEN),日耳曼敦,马里兰州),使用RNeasy®迷你试剂盒,从1-2e6 TIL中提取总RNA。

[2109] RNA测序

[2110] 使用iRepertoire专有的臂式PCR(扩增子拯救的多重PCR)技术与其HTBIvc测定(iRepertoire,亨茨维尔,亚拉巴马州)以半定量方式扩增CDR3vβ。HTBIvc测定是嵌套的逆转录多重PCR测定,其捕获来自白细胞的VDJ重排,特别是来自T细胞的β链VDJ重排。使用依诺米那下一代测序(NGS)平台(依诺米那(Illumina),圣地亚哥,加利福尼亚州)以大约1百万读段每文库的标准读段深度对从输入RNA产生的所得文库进行测序。最终数据覆盖了从框架3内到恒定基因起点的可变基因区,如图134所示。可变基因区的CDR3部分对应于在基因组水平的“DJ”重排位点。依诺米那的MiSeq平台用于所有样品。所有实验均由iRepertoire进行。

[2111] 测序数据分析

[2112] 测序结果的初步分析由iRepertoire使用管道进行,以过滤测序和扩增误差并且鉴定每个样品的CDR3vβ序列及其频率(iRepertoire,亨茨维尔,亚拉巴马州)。使用用Python编写的定制脚本来对数据进行归一化,并且进行独特CDR3vβ谱的另外的分析,包含鉴定重叠的CDR3克隆。

[2113] 独特的CDR3vβ的数量被定义为样品内独特的肽CDR3的数量。通过对含有独特克隆型的测序读段的数量进行计数来计算每个单独克隆型的频率,所述克隆型通过文库内的多路分解和过滤器。香农多样性指数(H)是使用公式$H = -\sum_{j=1}^{S} p_j \ln p_j$计算的,其中S是群落

中克隆的总数(丰度),并且p_i是由克隆i构成的S的比例。通过鉴定在两种样品中发现的克隆确定来自同一肿瘤样品的经PD1选择的与未经选择的TIL之间的重叠并且以两种方式报告:通过将共享的克隆的数量除以每种类型的产物中报告的总独特克隆的数量来报告共享的克隆的百分比;通过归一化样品之间的频率并且对每个TIL产物的共享克隆的频率求和来确定所共享的总TCR群体的百分比。

[2114] 预期结果

[2115] 预期配对经PD1选择的和未经选择的TIL的TCR库的比较分析揭示选择的TIL表示未经选择的TIL的一部分并且是寡克隆的。预期在经PD1选择的与未经选择的产物之间共享的TIL克隆在2种产物中显示出不同的频率,这反映了改变的竞争动力学。

[2116] 获得的结果

[2117] 经PD1选择的和未经选择的TIL中的独特CDR3vβ的数量和多样性

[2118] 体内TIL包含不仅对肿瘤特异性抗原(例如,新抗原)具有特异性,而且识别与癌症无关的广泛范围的表位(如来自EBV、CMV或流感病毒的表位)的T细胞[5]。这些非癌症相关或旁观者TIL可以在广泛的体外培养期期间过度生长肿瘤特异性细胞,所述体外培养期是产生用于患者治疗的足够的T细胞数所需的,并且可能导致产生具有低频率的肿瘤反应性T细胞的TIL产物[9]。

[2119] 为了测试在体外扩增之前分选表达PD1的TIL是否允许恢复含有与非预分选TIL的T细胞库不同的T细胞库的产物,将这两种方法的产物的TCR组成进行比较。如在实例中所述,在14个样品上进行CDR3vβ的测序。根据所描述的方法分析数据,以产生每个样品的独特CDR3vβ的数量和多样性指数。结果示出于图134和表54中。

[2120] 在经PD1选择的和未经选择的TIL中,独特CDR3vβ的数量分别从1,027到2,778和648到1,975不等(图134A)。没有注意到HNSCC相对于HNSCC的特异性模式。7个PD1选择的样品中有4个样品呈现出比其匹配的未经选择的样品更少的独特CDR3vβ克隆,这表明相对于未经选择的TIL,经PD1选择的TIL的多克隆性有降低的趋势,这将需要对待确认的另外的样品进行测试。类似于独特CDR3vβ克隆的数量,表示经PD1选择的和未经选择的TIL的克隆多样性的指数没有显著不同(图134B)。

[2121] 报告了黑素瘤和NSCLC的体内PD1+TIL的寡克隆性,并且被认为反映了新抗原特异性TIL在肿瘤微环境内的选择性扩增[7、8]。这些结果与那些报告部分一致,可能是因为在测序之前来自此研究的TIL经受的扩增阶段允许低频克隆的出现,所述低频克隆在扩增之前将是不可检测的。在所发布的报告中分析的TIL均未扩增,因此最低频率的克隆可能未被考虑。本实例中的观察结果的潜在暗示是在TME中可能存在比初始假定的更多的PD1+或肿瘤特异性T细胞。在原始7个肿瘤消化物中检测到的相对较高(平均38.4%,范围位21到78%)的PD1+TIL与这一假设一致(报告SR-19-009-000)。可替代地,经PD1选择的TIL产物的表观多克隆性可能起因于污染性PD1-TIL的扩增。分选纯度为约93%(研究数据),并且鉴于初始增殖优势,在扩增期间很少的PD1-TIL可能已经增殖到可检测水平[8、10、11]。

[2122] 因为在PD1选择的和未经选择的TIL中独特CDR3vβ克隆的数量和频率在体外培养期间可能已经达到水平,所以提出比较包括PD1选择的和未经选择的TIL的T细胞克隆型的同一性。

[2123] 经PD1选择的与未经选择的TIL之间的重叠T细胞克隆的数量和百分比

[2124] 在TME中，显示PD1特异性地鉴定识别肿瘤抗原的TIL，其表示浸润组织的T细胞的一部分[7、8]。如上所述，在任何给定时间，TME中也可以存在广泛范围的非癌症相关T细胞，所述非癌症相关T细胞预期最近不会上调PD1表达并且PD1分选策略旨在针对其进行选择。因此，想要确定未经选择的产物中存在的TIL克隆型的哪一部分包括PD1选择的产物。为此，对于每对TIL样品，评估经PD1选择的与未经选择的产物之间的克隆重叠的程度。分析中显示表示为重叠克隆的数量、百分比和部分的结果。

[2125] 在经PD1选择的TIL和未经选择的TIL中，对构成总CDR3vβ读段的26.9％和26.23％的5.4％和5.36％所共享的uCDR3vβ克隆的平均数进行编号(图2)。这些数字表明，PD1选择的克隆的库仅与未经选择的克隆的库部分重叠，并且在经PD1选择的TIL中鉴定存在显著群体的在匹配的未经选择的TIL中未检测到的克隆型。由于PD1选择的和未经选择的TIL最初来自同一肿瘤消化物，因此重叠分析的结果表明：1)大概旁观者TIL的相当大的部分未使其成为经PD1选择的TIL产物，以及2)将可能包含肿瘤特异性细胞的TIL的可变部分在PD1选择的产物中进行恢复，所述产物在未经选择的TIL的扩增期期间丢失。在培养启动时出现的旁观者TIL可能能够超过未经选择的细胞池中的低增殖PD1+TIL，而当在经PD1选择的条件下在不存在旁观者的情况下培养时，给予这些相同的PD1+TIL扩增的机会。在此处研究的2种组织学之间注意到显著差异。尽管对于所有5个NSCLC样品，PD1选择的产物中共享的克隆型的部分相对于未经选择的产物有所增加，但是对于2个HNSCC样品却观察到相反的情况。另外，对应于这2个样品的未经选择的制剂由相对高比例的共享TIL构成。鉴于样品大小有限，这种差异可以是轶事的；所述差异还可以反映在那些潜在的HPV相关癌症中存在的肿瘤抗原类型的差异。总体来说，所述结果与选择步骤对经扩增的TIL产物的组成的深远影响一致，并且表明所得经PD1选择的TIL可以极大地富集以其它方式在扩增期期间将减少的肿瘤特异性TIL。参见图135。

[2126] 在PD1选择的和未经选择的产物中的顶部经PD1选择的TIL克隆的比较频率

[2127] 两项先前评估的结果均指出，表达PD1的肿瘤特异性TIL易受非肿瘤相关的旁观者T细胞克隆的竞争，并且具有从池中分离肿瘤相关TIL的益处。为了进一步评估PD1选择的和未经选择的TIL中的肿瘤特异性T细胞的差异表示，在未经选择的TIL中确定前10个最高频率的经PD1选择的TIL克隆的排名。结果示出于图136和表56中。

[2128] 在所有配对TIL产物中，大部分高度表示的经PD1选择的TIL克隆在未经选择的产物中低程度地表示或不表示，这证实了选择步骤对扩增产物的最终组成和在经PD1选择的TIL中可能富集肿瘤特异性T细胞的显著影响。

[2129] 结论和建议

[2130] 所评估的经PD1选择的TIL的独特CDR3vβ序列的数量和多样性指数与匹配的未经选择的TIL相当，这表明可以在PD1分选后扩增多克隆且高度多样化的产物。

[2131] 经PD1选择的TIL克隆的库与未经选择的TIL的库部分重叠，这表明当使用选择过程时可能恢复更大数量的肿瘤特异性TIL。

[2132] 高频率经PD1选择的TIL克隆在未经选择的TIL产物中以较低频率出现，再次支持肿瘤特异性TIL在新产物中的富集。

[2133] 总体的说，这项研究表明，由经PD1分选的TIL的扩增产生的TIL产物在其组成上与未经选择的TIL有所不同。这种差异可能反映了肿瘤特异性TIL的适度表现和旁观者TIL的

外生长,这是在不存在PD1选择的情况下发生的。

[2134] 实例11的参考文献

[2135] 1.Sharma,P.和J.P.Allison,免疫检查点疗法的未来(The future of immune checkpoint therapy).《科学》,2015.348(6230):第56-61页。

[2136] 2.Michot,J.M.等人,具有免疫检查点阻断的免疫相关不良事件:全面综述(Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade:a comprehensive review).《欧洲癌症杂志(Eur J Cancer)》,2016.54:第139-148页。

[2137] 3.Wardell,S.等人,用适合于高通量商业制造展示用于过继性细胞转移的有利质量属性的缩写方法产生的低温保存的TIL产物LN-144(A Cryopreserved TIL Product,LN-144,Generated with an Abbreviated Method Suitable for High Throughput Commercial Manufacturing Exhibits Favorable Quality Attributes For Adoptive Cell Transfer).《癌症免疫疗法杂志(Journal for ImmunoTherapy of Cancer)》,2017.5((增刊2))。

[2138] 4.Gontcharova,V.等人,在晚期转移性黑素瘤的C-144-01研究中低温保存的肿瘤浸润淋巴细胞产物lifileucel(LN-144)的持久性(Persistence of cryopreserved tumor-infiltrating lymphocyte product lifileucel(LN-144)in C-144-01 study of advanced metastatic melanoma).《癌症研究(Cancer Res)》,2019.79((13增刊))。

[2139] 5.Simoni,Y.等人,旁观者CD8(+)T细胞在人肿瘤浸润中是丰富的并且在表型上不同.《自然》,2018.557(7706):第575-579页。

[2140] 6.Schumacher,T.N.和R.D.Schreiber,癌症免疫疗法中的新抗原.《科学》,2015.348(6230):第69-74页。

[2141] 7.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2142] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。24(7):第994-1004页。

[2143] 9.Yossef,R.等人,用于个性化癌症免疫疗法的靶向独特和共享癌基因的新抗原反应性T细胞的增强检测(Enhanced detection of neoantigen-reactive T cells targeting unique and shared oncogenes for personalized cancer immunotherapy).《临床调查洞察杂志(JCI Insight)》,2018.3(19)。

[2144] 10.Zhang,Y.等人,程序性死亡1上调与人非小细胞肺癌中肿瘤浸润CD8+ T淋巴细胞的功能障碍相关(Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer).《细胞与分子免疫学(Cell Mol Immunol)》,2010.7(5):第389-95页。

[2145] 11.Fernandez-Poma,S.M.等人,表达PD-1的肿瘤浸润CD8(+)T细胞的扩增改善了过继性T细胞疗法的功效(Expansion of Tumor-Infiltrating CD8(+)T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy).《癌症研究》,2017.77(13):第3672-3684页。

[2146] 表54:未经选择的和经PD1选择的TIL产物的独特CDR3序列的计数和香农多样性指数。

[2147]

	uCDR3 计数		香农多样性指数	
对象	未经选择的 TIL	经 PD1 选择的 TIL	未经选择的 TIL	经 PD1 选择的 TIL
H3035	648	1397	1.9	3.3
H3039	1975	2032	2.1	3.9
L4089	1917	1713	5.3	5.3
L4096	1747	2778	2.2	3.9
L4097	1668	1177	5.8	3.8
L4100	1389	1027	3.8	3.2
L4106	1624	1621	5.4	3.6

[2148] 表55:经PD1选择的与未经选择的TIL之间的克隆重叠

[2149]

		未经选择的 TIL			经 PD1 选择的 TIL		
对象	共享的 uCDR3 计数	uCDR 3 计数	共享的 uCDR3 克隆%	共享的总 TCR 群体%	uCDR3 计数	共享的 uCDR3 克隆%	共享的总 TCR 群体%
H3035	32	648	4.94	74.65	1397	2.29	1.18
H3039	91	1975	4.61	46.45	2032	4.48	3.47
L4089	90	1917	4.69	10.17	1713	5.25	24.46
L4096	108	1747	6.18	0.42	2778	3.89	38.27
L4097	91	1668	5.46	7.96	1177	7.73	58.05
L4100	98	1389	7.06	30.58	1027	9.54	43.91
L4106	75	1624	4.62	13.35	1621	4.63	18.94

[2150] 表56:前10个最频繁检测到的克隆在经PD1分选的和未经分选的TIL产物中的经PD1分选的TIL产物中的频率。

[2151]

对象	CDR3 序列	经 PD1 分选的 TIL 中的频率	未经分选的 TIL 中的频率
H3035	ASSQLPLIGTGDSPLH	39.33	0.00
	ASRPGVAGNTDTQY	18.13	0.00
	ASSPDVGADTQY	13.45	0.00
	ASRIGSWSNQPQH	6.12	0.00
	ASSQTSNEQY	5.27	0.00
	ASSLGHRDHTGELF	2.39	0.00
	ASSPSLSSSNQPQH	1.30	0.00
	ATASGGTNEKLF	1.28	0.00
	SAAKGSSGANVLT	0.96	0.00
	ASSTRGSYGYT	0.92	0.20
H3039	ASSPMTSSDTQY	37.32	0.00
	ASMRGLRTEAF	21.96	0.00
	ASSPQRGNQPQH	5.46	0.00
	ASSLVALPGSVYGYT	2.64	0.00
	ASSTRDPDRYGYT	1.93	0.00
	ASSSPKGLTDTQY	1.86	0.00
	SAKMTGTGLINQPQH	1.59	0.00
	ASSQAAHQPQH	1.55	0.00
	ASTTQRGGFGNEQF	1.41	0.00
	ASSLGQVYGYT	1.41	0.16
L4089	ASSHEQAFAYGYT	16.01	0.00
	ASSSRDLGETQY	10.60	0.00
	ASSQTSGRLDNEQF	9.19	0.28
	ATSDLRTSGRANEQF	5.01	0.16
	ASSFWENNSPLH	4.86	0.00
	ASRGTVNSPLH	4.78	0.00
	ASSFGGNRNQPQH	3.31	0.00
	ASSYQGNTEAF	2.67	0.01
	ASSSSGGITEAF	2.55	0.00
	SARDPGTYGYT	2.27	0.00
L4096	ATRRAARTGELF	38.05	0.10
	ASRAGRVADTQY	14.67	0.00
	ATSWGLRASSYNEQF	7.76	0.00
	SAISDRETQY	5.73	0.00
	ATTPLTSGANVLT	4.89	0.00
	ASSSRTTLNEQF	3.66	0.00
	ASSPSTDTQY	2.40	0.00
	SAREGGDYGYT	1.74	0.00
	ASSIRFSNEQF	1.42	0.00
	ASSFQFNNQPQH	1.33	0.00
L4097	ASSLDKRANYGYT	30.14	0.02
	ASSLGGNGNQPQH	15.12	0.00
	SASPLVSGGGSYNEQF	9.73	0.56
	ASKIATGPNQPQH	8.86	0.00
	SASLAGALTDTQY	7.00	0.00

[2152]

	ASSPEGGPNQPQH	6.78	0.00
	ASGKITGVSNYGYT	4.84	0.85
	ASSFGGWGTDTQY	2.21	0.00
	ASGHIGLAEAF	1.63	1.82
	ASSRSGTGSNQPQH	1.00	0.00
L4100	ASSPRGNTEAF	34.73	0.00
	SARDSTQSPQH	25.00	0.00
	SARDPGQGTSGNTIY	13.12	0.00
	ASSWDTDTQY	4.29	0.00
	ATSIPTGGSVKETQY	3.36	0.00
	ATSNPDRFFYNEQF	2.44	0.01
	ATRNLSTQY	2.12	0.33
	ASSPGQWVTEEQY	1.80	0.00
	ASDALGGPVTGANVLT	1.45	0.02
	ASSVGQVSNQPQH	1.17	0.00
L4106	ASKRSFRANQPQH	38.16	0.00
	ASSSGQAYSYEQY	21.79	0.00
	ASSSRSSGYTDTQY	6.43	0.00
	ASSYSAGTNYEQY	5.05	0.00
	ASSRSGENYNEQF	4.22	1.02
	ASRGGLSSGNTIY	3.60	0.82
	AGQDTNNEKLF	1.91	0.00
	ASNEGGGNTEAF	1.84	0.00
	SALNIGGYEQY	1.05	0.09
	ASSQDGQGVEDYGYT	0.91	0.00

[2153] 实例12:PD1在肿瘤消化物中表达细胞

[2154] 目的

[2155] 本实例评估了程序性细胞死亡蛋白1(PD1)在全肿瘤消化物中的表达。

[2156] 范围

[2157] 评估全肿瘤消化物以下肿瘤组织学的PD1;黑素瘤、非小肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌(OC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、前列腺癌(PC)和结肠直肠癌(CRC)。

[2158] 信息

[2159] PD1是多维表型标志物,其与活化、抗原特异性和耗尽相关。其在活化后被快速诱导并且在慢性疾病环境,包含癌症中在经历抗原的细胞上维持[1、2]。分子地,PD1是调节细胞表面受体的CD28家族的成员并且在慢性活化的T细胞、NKT细胞、B细胞和单核细胞上表达[3-5]。与其配体PD-L1和PD-L2的接合会诱导导致T细胞活化、增殖、存活和细胞因子产生减少的信号传导级联[6]。

[2160] 尽管PD1具有免疫抑制作用,但是表达PD1的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的存在已经与头部以及HNSCC和NSCLC中的有利临床结果相关,这表明这些TIL可能涉及控制肿瘤进展[7][8、9]。

[2161] 黑素瘤和NSCLC中的研究已经证明,大多数肿瘤反应性TIL包括在PD1+ T细胞亚群内[4、8、10]。

[2162] 基于PD1+TIL是新抗原/肿瘤特异性淋巴细胞的观念,Iovance正在开发一种新型经PD1选择的TIL产物LN-145-S1,其富集从全肿瘤消化物中直接分选的PD1+TIL。

[2163] 尽管PD1表达对于对抗PD1疗法的应答是必需的,但是单独的PD1表达并不预测对疗法的应答性。作为实例,PD1存在于OC中的TIL上并且其表达与存活相关[11]。然而,OC中的最近临床试验证明抗PDL1药物阿维鲁单抗(Avelumab)与化学疗法组合并未增强无进展

存活[12]。这项研究连同在肿瘤微环境中表达PD1+的对抗PD1疗法有抗性的大量患者一起显示,PD1/PDL1轴的体内阻断不足以控制大多数癌症。

[2164] 使用lifileucel的过继性T细胞疗法已经在对抗PD1难治的黑素瘤患者中证明显著的功效,这表明TIL工艺扩增了未被体内PD1阻断复原的T细胞群体[13]。

[2165] 在所有PD1+癌症组织学中,在离体扩增之前分选PD1+TIL可以进一步改进对TIL疗法的应答率。

[2166] 本实例的目的是针对PD1+TIL的存在调查多种肿瘤组织学,以支持其在临床上用这些TIL进行靶向。

[2167] 实验设计

[2168] 通过流式细胞术评估来自多种肿瘤组织学的肿瘤消化物的PD1表达。

[2169] 材料

[2170] 图137中描述了本实例中使用的肿瘤消化物。

[2171] 方法

[2172] 肿瘤处理

[2173] 将重量为0.2g到1.5g的组织样品部分切成4-6mm的碎片,并且消化成包含肿瘤、基质和免疫细胞的单细胞悬浮液。使用包含DNA酶(500IU/ml)、透明质酸酶(1mg/ml)和胶原酶IV(10ng/ml)的三重酶混合物在37℃下在温和搅拌下消化组织1小时。

[2174] PD1染色

[2175] 根据下表对全肿瘤消化物进行染色。将细胞在100μl/1e6细胞中进行染色。

[2176] 表57:PD1流式细胞术染色板

[2177]

抗体/染色	克隆	荧光染料	制造商	量(μl/1e6细胞)
7-AAD	N/A	N/A	BD生物科学公司	20
CD3	UCHT1	FITC	BD生物科学公司	3
CD4	OKT4	PE/Cy	BioLegend公司	1
PD1	EH12.2H7	PE	BioLegend公司	2.5

[2178] PD1选择和门控策略

[2179] 将染色细胞置于FX500细胞分选仪(索尼,纽约)或ZE5细胞分析仪(伯乐公司(BioRad),加利福尼亚州)上,并且基于以下门控策略进行分析。首先,基于正向和反向或侧向散射鉴定单细胞。接下来,基于阴性/低7-AAD或活死蓝色荧光对活细胞进行门控。使用CD3鉴定TIL。使用正常供体外周血(ND-PBL)作为对照鉴定PD1细胞。将PD1的选择门置于ND-PBL中PD1表达的基线之上。

[2180] 使用FlowJo v8.1软件执行数据分析(FlowJo有限公司(FlowJo LLC),俄勒冈州)。使用GraphPad v8对结果进行绘图。

[2181] 预期结果

[2182] 预期PD1在所测定的大多数肿瘤消化物中表达。预期PD1的百分比在每个肿瘤亚型内和在不同的肿瘤组织学之间是可变的。

[2183] 获得的结果

[2184] PD1在肿瘤消化物中的表达

[2185] 为了鉴定哪些组织学是PD1选择的候选物,使用流式细胞术在来自若干癌症组织

学的多个肿瘤样品中评估PD1的表达。根据程序TMP-18-015(缩写为章节5.2)测试了总共4个黑素瘤、7种NSCLC、5种HNSCC、3种OC、5种TNBC、2种PC和8种CRC。CRC由微卫星稳定(MSS)(n＝6)和微卫星不稳定(MSI)(n＝2)肿瘤构成。在消化之后,将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD1进行染色,通过流式进行分析,并且在>5e6细胞可用时,进行分选以获得PD1+细胞。使经PD1分选的细胞经受两个11天的快速扩增期(REP)以获得经PD1选择的TIL。肿瘤ID、组织学和实验命运列于图137中。流式分析的结果示出于图138中。

[2186] 所测定的所有肿瘤消化物均表达CD3群体内PD1+细胞的百分比。PD1％是可变的并且范围为11％到78％,其中在所测定的组织学中平均值为35％。黑素瘤(n＝4)和PC(n＝2)产生PD1表达的最低平均值分别为27％和21％。PD1表达的平均百分比与观察到的那些组织学的临床应答率不相关。与对抗PD1阻断(即,OC和PC)没有反应的组织学相比,对如黑素瘤和NSCLC等抗PD1阻断有反应的组织学并没有具有更高的PD1水平/表达。

[2187] 重要的是,在可以启动培养的所有情况下,通过PD1+细胞在体外扩增后可以获得经PD1选择的产物(图138)。因此,基于PD1的表达,所有所测定的组织学是用于PD1选择的潜在候选物。

[2188] 结论

[2189] 在所有所测定的肿瘤消化物中,PD1在CD3细胞上表达。

[2190] 在PD1表达中存在广泛的瘤内和瘤间变异性。

[2191] PD1表达与已证明对抗PD1疗法有响应的组织学不相关。

[2192] 实例12的参考文献

[2193] 1.Simon,S.和N.Labarriere,肿瘤特异性T细胞上的PD-1表达:免疫疗法的朋友或敌人?(PD-1expression on tumor-specific T cells:Friend or foe for immunotherapy?)《肿瘤免疫学》,2017.7(1):p.e1364828。

[2194] 2.Simon,S.等人,PD-1表达条件抗原特异性库内的T细胞亲合力(PD-1expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire).《肿瘤免疫学》,2016.5(1):p.e1104448。

[2195] 3.Ahmadzadeh,M.等人,浸润肿瘤的肿瘤抗原特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1并且是功能受损的(Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1and are functionally impaired).《血液(Blood)》,2009.114(8):第1537-44页。

[2196] 4.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2197] 5.Melssen,M.M.等人,人转移性黑素瘤中表达CD49a、CD49b和CD103的CD8 T细胞群体的形成和表型表征(Formation and phenotypic characterization of CD49a,CD49b and CD103 expressing CD8 T cell populations in human metastatic melanoma).《肿瘤免疫学》,2018.7(10):p.e1490855。

[2198] 6.Lee,J.等人,通过阻断PD-1途径复原耗尽的T细胞(Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1Pathway).《用于免疫病理学疾病疗法(For Immunopathol Dis Therap)》,2015.6(1-2):第7-17页。

[2199] 7.Badoual,C.等人,表达PD-1的肿瘤浸润T细胞是HPV相关头颈癌中有利的预后生

物标志物(PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer).《癌症研究》,2013.73(1):第128-38页。

[2200] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2201] 9.Kansy,B.A.等人,CD8(+)T细胞中的PD-1状态与头颈癌中的存活和抗PD-1治疗结果相关(PD-1Status in CD8(+)T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer).《癌症研究》,2017.77(22):第6353-6364页。

[2202] 10.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2203] 11.Webb,J.R.、K.Milne和B.H.Nelson,PD-1和CD103在人卵巢癌中在预后有利的上皮内CD8 T细胞上广泛共表达(PD-1and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer).《癌症免疫学研究(Cancer Immunol Res)》,2015.3(8):第926-35页。

[2204] 12.Columbus,G.阿维鲁单抗错过III期卵巢癌试验中的主要终点(Avelumab Misses Primary Endpoints in Phase III Ovarian Cancer Trial).2018;可从以下网站获得:https://www.onclive.com/web-exclusives/avelumab-misses-primary-endpoints-in-phase-iii-ovarian-cance r-trial。

[2205] 13.Sarniak,A.用于评估自体肿瘤浸润淋巴细胞(LN-144)用于治疗患有转移性黑素瘤的患者的功效和安全性的2期多中心研究(A phase 2,multicenter study to assess the efficacy and safety of autologous tumor-infiltrating lymphocytes(LN-144) for the treatment of patients with metastatic melanoma).2018;可从以下网站获得:https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS9595。

[2206] 实例13:经PD1选择的TIL的扩增

[2207] 目的

[2208] 本实例评估了与匹配的未经选择的TIL相比,经程序性细胞死亡蛋白1(PD1)分选的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的扩增。

[2209] 范围

[2210] 使用两个周期的Iovance快速扩增方案(REP)扩增来自黑素瘤(n=4)、非小细胞肺癌(NSCLC)(n=7)和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)(n=2)的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL。评估经选择的和未经选择的TIL在完成REP1(第11天)和REP2(第22天)时的扩增。

[2211] 信息

[2212] PD1是CD28家族的成员并且在慢性活化的T细胞、NKT细胞、B细胞和单核细胞上表达[1、2]。在T细胞中PD1的表达已经得到最佳表征,其中其在TCR刺激时被诱导[2,3],并且在慢性疾病环境中在抗原特异性细胞上维持[4、5]。

[2213] 在与其配体PD-L1和PD-L2接合时,通过PD1的信号传导导致T细胞增殖、存活和细胞因子产生的抑制。慢性疾病模型(包含HIV、丙型肝炎和癌症)中的若干研究已经证明,与PD1-TIL相比,PD1+细胞的扩增倍数的显著降低[1、6、7]。在鼠类多发性骨髓瘤模型中,当与

其PD1对应物相比时，经PD1选择的TIL增殖效率较低，如通过低10倍的扩增率所证明的。

[2214] 尽管经PD1选择的TIL的增殖能力降低，但是已经显示PD1+细胞在存在抗CD3和具有IL-2的同种异体饲养细胞的情况下体外增殖[5-7]。此外，在小鼠中PD1+TIL体外杀死自体肿瘤，并且在体内产生抗肿瘤应答[8]。

[2215] 使用两个连续的11天REP扩增经PD1+分选的TIL(经PD1选择的)和源自全肿瘤消化物的TIL(未经选择的TIL)。计算TIL扩增倍数以确定经PD1选择的TIL是否可以扩增以及这与匹配的未经选择的TIL相比如何。基于初始CD3接种计数和采集时的细胞数，在REP1(第11天)和REP2(第22天)完成时计算扩增倍数。

[2216] 实验设计

[2217] 经PD1选择的和未经选择的TIL在22天过程中扩增，采用两步扩增过程，其包含11天活化步骤，随后是11天REP。计算扩增倍数，以获得两种TIL产物的增殖能力。

[2218] 材料

[2219] 图139中描述了这项工作中使用的肿瘤样品和TIL产物。

[2220] 根据实例10，从4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC获得经PD1选择的和未经选择的TIL产物。简言之，使用DNA酶、透明质酸酶和胶原酶IV的混合物消化全肿瘤活检。将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD1进行染色，并且在FX500仪器(索尼，总部，纽约)上进行分选。使经PD1分选的细胞和未经选择的全肿瘤消化物经受22天扩增过程以分别获得经PD1选择的TIL和未经选择的TIL。

[2221] 方法

[2222] 肿瘤处理

[2223] 将重量为0.2g到1.5g的组织样品部分切成4-6mm的碎片，并且消化成包含肿瘤、基质和免疫细胞的单细胞悬浮液。使用包含DNA酶(500IU/ml)、透明质酸酶(1mg/ml)和胶原酶IV(10ng/ml)的三重酶混合物在37℃下在温和搅拌下消化组织1小时。为了确保捕获原位表型，在消化后直接选择PD1细胞[2]。

[2224] PD1染色

[2225] 根据下表对全肿瘤消化物进行染色。将细胞在100μl/1e6细胞中进行染色。

[2226] 表58:PD1流式细胞术染色板

[2227]

抗体/染色	克隆	荧光染料	制造商	量(μl/1e6细胞)
7-AAD	N/A	N/A	BD生物科学公司	20
CD3	UCHT1	FITC	BD生物科学公司	3
CD4	OKT4	PE/Cy	BioLegend公司	1
PD1	EH12.2H7	PE	BioLegend公司	2.5

[2228] PD1选择和门控策略

[2229] 将染色细胞置于FX500细胞分选仪(索尼，纽约)上，并且基于以下门控策略进行分析。首先，基于正向散射和反向散射对单细胞进行门控，然后基于阴性或低7-AAD荧光的活细胞，随后是CD3和PD1表达。使用正常供体外周血(ND-PBL)作为对照鉴定PD1细胞。将PD1的选择门置于ND-PBL中PD1表达的基线之上。

[2230] 经PD1选择的TIL快速扩增方案

[2231] 使用两步过程扩增经PD1选择的和未经选择的TIL，所述两步过程包含11天活化步

骤,随后是11天REP,总共22天。使用OKT3(30ng/ml,美天旎生物技术公司)和同种异体辐照的外周血单核细胞(1:100的TIL:饲养细胞比率)扩增TIL。接种的TIL的数量的范围在5,000-100,000个CD3+之间,并且取决于预分选细胞数、CD3浸润和PD1表达。

[2232] 计算TIL扩增倍数

[2233] 在第11天(活化采集)和第22天(REP采集)时,采集TIL并且使用Cellometer K2荧光活力细胞计数器(Nexcelom,马萨诸塞州)进行计数。基于所接种的CD3计数和采集细胞计数(即,活化扩增倍数=第11天细胞计数/第0天细胞计数并且REP扩增倍数=第22天细胞计数/第11天接种计数)计算经PD1选择的和未经选择的群体的扩增倍数。将在未经选择的TIL条件下用于活化步骤的接种细胞数归一化为第0天在经PD1选择的中的CD3细胞数。使用GraphPad Prism v8对数据进行绘制。

[2234] 结果

[2235] 经PD1选择的TIL在存在抗CD3和饲养细胞的情况下扩增,但是程度比匹配的未经选择的TIL低。

[2236] 获得的结果

[2237] 经PD1选择的和未经选择的TIL中的扩增倍数

[2238] 经典地,PD1+细胞已经显示细胞因子产生受损和增殖减少[3、4]。已经显示原位阻断PD1或其配体PD-L1部分地逆转TIL中的增殖性功能障碍[2、9]。在体外,在存在IL2的情况下[1],在用抗CD3和同种异体饲养细胞刺激时,PD1+细胞可以增殖,但未达到PD1-TIL的程度[8]。

[2239] 为了确定经PD1选择的TIL是否能够体外增殖并且产生用于输注的治疗适当数量的TIL,使用具有11天活化步骤的两步过程扩增来自4种黑素瘤、7种NSCLC和2种HNSCC的经PD1选择的和未经选择的TIL,随后是11天REP,并且评估扩增倍数。

[2240] 在活化步骤期间,与未经选择的TIL相比,经PD1选择的TIL的扩增水平有所降低。活化步骤平均扩增倍数为833,而未经选择的TIL的扩增倍数为2650。有趣的是,对于REP步骤,经PD1选择的TIL克服了活化步骤中的初始增殖缺陷,因为经PD1选择的TIL(1308)的扩增倍数类似于未经选择的TIL(1418)的扩增倍数。在黑素瘤和NSCLC两者中均观察到活化步骤EP1中R的增殖减少,但在HNSCC中未观察到。然而,所测定的HNSCC肿瘤的数量低(n=2)。此外,跨越三种组织学的REP中的增殖能力在TIL群体之间是类似的。

[2241] 结论

[2242] 经PD1选择的TIL成功地从黑素瘤、NSCLC和HNSCC的肿瘤消化物中扩增。参见图141。

[2243] 与未经选择的TIL相比,经PD1选择的TIL在REP1中的扩增显著减少。

[2244] 在REP2期间,在经PD1选择的TIL中不存增殖减少。

[2245] 尽管源自经分选的消化物,但是经PD1选择的TIL在Iovance的第2代产物lifileucel的REP扩增倍数范围(54-28,214)内良好地扩增。

[2246] 尽管在REP1期间经PD1选择的TIL的增殖能力降低,但是使用2-REP过程产生的13/13经PD1选择的TIL超过输注的lifileucel阈值(即,>1e9)。

[2247] 因为PD1+TIL富集肿瘤/新抗原特异性细胞,因此其以相当大数量存在于最终产物中是必要的[10、11]。经PD1选择的TIL的增殖能力较低表明其在未经选择的TIL制剂中将是

胜过竞争的,这进一步强化了用于在扩增之前选择的基本原理。

[2248] 实例13的参考文献

[2249] 1.Ahmadzadeh,M.等人,浸润肿瘤的肿瘤抗原特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1并且是功能受损的.《血液》,2009.114(8):第1537-44页。

[2250] 2.Lee,J.等人,通过阻断PD-1途径复原耗尽的T细胞.《用于免疫病理学疾病疗法》,2015.6(1-2):第7-17页。

[2251] 3.Virgin,H.W.、E.J.Wherry和R.Ahmed,减少慢性病毒感染(Redefining chronic viral infection).《细胞(Cell)》,2009.138(1):第30-50页。

[2252] 4.Simon,S.和N.Labarriere,肿瘤特异性T细胞上的PD-1表达:免疫疗法的朋友或敌人?《肿瘤免疫学》,2017.7(1):p.e1364828。

[2253] 5.Simon,S.等人,PD-1表达条件抗原特异性库内的T细胞亲合力.《肿瘤免疫学》,2016.5(1):p.e1104448。

[2254] 6.Boussiotis,V.A.、P.Chatterjee和L.Li,PD-1在T细胞上的生物化学信号传导及其功能含义(Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications).《癌症杂志(Cancer J)》,2014.20(4):第265-71页。

[2255] 7.Petrelli,A.等人,PD-1+CD8+ T细胞是人慢性炎症中的克隆扩增效应子(PD-1+ CD8+ T cells are clonally expanding effectors in human chronic inflammation).《临床研究杂志》,2018.128(10):第4669-4681页。

[2256] 8.Fernandez-Poma,S.M.等人,表达PD-1的肿瘤浸润CD8(+)T细胞的扩增改善了过继性T细胞疗法的功效.《癌症研究》,2017.77(13):第3672-3684页。

[2257] 9.Tumeh,P.C.等人,PD-1阻断通过抑制过继性免疫抗性诱导应答(PD-1blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance).《自然》,2014.515(7528):第568-71页。

[2258] 10.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2259] 11.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2260] 实例14:经PD1选择的TIL的功能评估

[2261] 目的

[2262] 本实例评估经扩增的程序性细胞死亡蛋白1(PD1)选择的TIL的效应子功能,并且与未经选择的TIL进行比较。

[2263] 范围

[2264] 响应于非特异性刺激,评估来自黑素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC)和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的IFNγ分泌、颗粒酶B释放和CD107a动员。

[2265] 信息

[2266] PD1是多维表型标志物,其与活化、抗原特异性和耗尽相关。其在活化后被快速诱导并且在慢性疾病环境,包含癌症中在抗原特异性细胞上维持[1、2]。分子地,PD1是调节细胞表面受体的CD28家族的成员并且在慢性活化的T细胞、NKT细胞、B细胞和单核细胞上表达

[3-5]。与其配体PD-L1和PD-L2的接合会诱导导致T细胞活化、增殖、存活和细胞因子产生减少的信号传导级联[6]。

[2267] 尽管PD1具有免疫抑制作用，但是表达PD1的TIL的存在已经与在HNSCC[7]、NSCLC[8]和卵巢癌[9]中有利的临床结果相关。在肿瘤微环境中遇到抗原导致PD1上调。若干研究已经证明，新抗原/肿瘤反应性TIL主要包括在PD1+ T细胞亚群内[3、10]。因此，选择用于表达PD1的TIL预期富集肿瘤/新抗原特异性T细胞的TIL产物。

[2268] 已经针对响应于非特异性刺激的功能性评估从肿瘤病灶恢复的经选择的PD1+TIL。相对于其PD1对应物，未培养的分选的PD1+TIL显示IFNγ产生显著减少[3、8、11]。然而，在体外培养时，经扩增的PD1+TIL的效应子功能恢复[4、8]。

[2269] 基于PD1表达(经PD1选择的)，开发TIL产物以富集肿瘤特异性T细胞。使用两步过程扩增经PD1选择的TIL和源自全肿瘤消化物的TIL(未经选择的TIL)，采用11天活化步骤，随后是11天快速扩增方案(REP)。为了确定所得经扩增的经PD1选择的TIL是否表现出效应子功能，在一系列体外功能测定中评估TIL并且将其与匹配的未经选择的TIL进行比较。

[2270] 实验设计

[2271] 经PD1选择的和未经选择的TIL在22天过程中扩增，采用具有11天活化步骤，随后是11天REP的两步过程。就IFNγ和颗粒酶B分泌而言，评估最终TIL产物对非特异性刺激的功能性。

[2272] 材料

[2273] 图14中描述了这项工作中使用的肿瘤样品和TIL产物。

[2274] 方法

[2275] 肿瘤处理

[2276] 将重量为0.2g到1.5g的组织样品部分切成4-6mm的碎片，并且消化成包含肿瘤、基质和免疫细胞的单细胞悬浮液。使用包含DNA酶(500IU/ml)、透明质酸酶(1mg/ml)和胶原酶IV(10ng/ml)的三重酶混合物在37℃下在温和搅拌下消化组织1小时。为了确保捕获原位表型，在消化后直接选择PD1细胞[2]。

[2277] PD1染色

[2278] 根据下表对全肿瘤消化物进行染色。将细胞在100μl/1e6细胞中进行染色。以上实例13中的表58中提供了PD-1流式细胞术染色组。

[2279] PD1选择和扩增

[2280] 使用FX500细胞(索尼，纽约)选择PD1+细胞。使用具有11天活化步骤，随后是11天REP的两步过程扩增经PD1选择的和未经选择的TIL。使用OKT3(30ng/ml，美天旎生物技术公司)和同种异体辐照的外周血单核细胞(1:100的TIL:饲养细胞比率)扩增TIL。

[2281] IFNγ和颗粒酶B分泌

[2282] 将TIL以5e5细胞/每孔接种在1ml的48孔板+300IU/ml IL2(CellGenix，新泽西州)中。将TIL刺激+/-100μl/孔的αCD3/αCD28/α41BB珠粒(赛默飞世尔科技公司，马萨诸塞州)，持续12-18小时。采集上清液并且通过ELISA针对IFNγ(R&D系统公司，明尼苏达州)和颗粒酶B(生命技术公司，加利福尼亚州)进行评估。在美国伯腾酶标仪(美国伯腾公司(BioTek)，佛蒙特州)上读取ELISA板，并且使用Gen5数据分析软件进行评估。使用GraphPad Prism v8对数据进行绘制。

[2283] CD107动员

[2284] 在存在莫能菌素(monensin)的情况下,将经PD1选择的TIL和未经选择的用PMA/离子霉素(Biolegend公司,加利福尼亚州)刺激2小时(以防止蛋白质分泌)。然后用活/死染料和抗CD3和CD107a的抗体对TIL进行染色。通过流式细胞术检测染色细胞。使用FlowJo软件(贝克曼迪金森公司)来分析CD107a在CD3+细胞中的表达。门控策略如下:单细胞(singlet)(FSC和SSC)、活细胞、CD3和CD107。使用GraphPad Prism v8对所有数据进行绘制。

[2285] 结果

[2286] 响应于非特异性刺激,经扩增的经PD1选择的TIL产生IFNγ和颗粒酶B。

[2287] 经PD1选择的和未经选择的TIL中的IFNγ和颗粒酶B分泌

[2288] 先前的报道已经证明,PD1+/PD1高细胞响应于PMA和离子霉素[4]或抗CD3/抗CD28刺激[8、11]减少或完全无法产生IFNγ。这些研究是用未经培养的PD1+TIL进行的,其除了PD1之外还表达高水平的共抑制受体LAG3和Tim3[8、10、12]。由于其"耗尽"表型(即,抑制性受体的高表达)以及其无法产生效应子功能,因此预培养的PD1+被认为是"功能障碍的"。然而,一旦PD1+/PD1高细胞在体外扩增(通过抗CD3和同种异体饲养细胞),TIL就恢复其产生IFNγ的能力[3、4、8]。增强的效应子功能还与PD1表达的显著降低相关[3、4、8、13]。这些研究表明,在未经培养的PD1+/PD1高TIL中观察到的无反应性可以用体外培养逆转。

[2289] 为了评估PD1+TIL在扩增后的细胞因子产生方面是否具有功能,用αCD3/αCD28/α41BB活化珠粒非特异性地刺激来自13个肿瘤的经PD1选择的和匹配的未经选择的TIL,并且评估IFNγ和颗粒酶B分泌。

[2290] 经PD1选择的TIL响应于非特异性刺激(αCD3/αCD28/αCD137珠粒)分泌相当可观水平的IFNγ和颗粒酶B,这表明这些确实在扩增后具有功能。参见图143。

[2291] 尽管其能够在扩增后产生IFNγ,但是与未经选择的TIL相比,经PD1选择的TIL分泌的IFNγ显著更少。因此,响应于非特异性刺激,经PD1选择的TIL产生IFNγ的能力降低。然而,当与自体肿瘤共培养时,与PD1-TIL[3、8、13]相比,经PD1选择的TIL已经显示产生显著更高水平的IFNγ。将经扩增的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL与自体肿瘤共培养并且评估IFNγ。与未经选择的TIL相比,经PD1选择的TIL分泌更高水平的IFNγ,这不仅表明其分泌IFNγ的能力,而且以肿瘤特异性方式进行分泌。

[2292] 当与未经选择的TIL相比时,经PD1选择的TIL产生类似水平,但颗粒酶B水平略微升高,这与HNSCC[11]中的先前研究一致。由于颗粒酶B被认为是活化的标志物,这些结果进一步表明经扩增的经PD1选择的TIL在扩增后不处于耗尽或无反应状态。

[2293] 通过PMA/离子霉素刺激在经PD1选择的TIL和未经选择的TIL中的CD107a动员

[2294] CD107a细胞表面表达被认为是TIL效应子功能的可靠标志物。CD107a(LAMP1)在刺激后被移动到细胞表面,并且用作细胞脱粒能力的量度。脱粒化是穿孔素颗粒酶介导的杀伤的先决条件,并且是由应答抗原特异性CD8+T细胞[14、15]介导的立即裂解功能所需的。

[2295] 为了进一步评估经PD1选择的TIL的功能能力,针对CD107a动员评估10个扩增后TIL,并且将其与匹配的未经选择的TIL进行比较。

[2296] 当与未经选择的TIL相比时,CD107表达在经PD1选择的TIL中是类似的。参见图144。这些结果进一步支持以下概念:经PD1选择的TIL扩增后是高度功能性的并且不指示耗尽的细胞群体。

[2297] 结论

[2298] 响应于非特异性刺激,经PD1选择的TIL产生IFNγ和颗粒酶B和动员的CD107a。

[2299] 与对于未经培养的PD1+/PD1高细胞已经证明的相反,经扩增的经PD1选择的TIL是高度活化和功能性的,并且因此一旦在体内就能够产生抗肿瘤作用。

[2300] 实例14的参考文献

[2301] 1.Simon,S.和N.Labarriere,肿瘤特异性T细胞上的PD-1表达:免疫疗法的朋友或敌人?《肿瘤免疫学》,2017.7(1):p.e1364828。

[2302] 2.Simon,S.等人,PD-1表达条件抗原特异性库内的T细胞亲合力.《肿瘤免疫学》,2016.5(1):p.e1104448。

[2303] 3.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2304] 4.Ahmadzadeh,M.等人,浸润肿瘤的肿瘤抗原特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1并且是功能受损的.《血液》,2009.114(8):第1537-44页。

[2305] 5.Melssen,M.M.等人,人转移性黑素瘤中表达CD49a、CD49b和CD103的CD8 T细胞群体的形成和表型表征.《肿瘤免疫学》,2018.7(10):p.e1490855。

[2306] 6.Lee,J.等人,通过阻断PD-1途径复原耗尽的T细胞.《用于免疫病理学疾病疗法》,2015.6(1-2):第7-17页。

[2307] 7.Badoual,C.等人,表达PD-1的肿瘤浸润T细胞是HPV相关头颈癌中有利的预后生物标志物.《癌症研究》,2013.73(1):第128-38页。

[2308] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2309] 9.Webb,J.R.、K.Milne和B.H.Nelson,PD-1和CD103在人卵巢癌中在预后有利的上皮内CD8 T细胞上广泛共表达.《癌症免疫学研究(Cancer Immunol Res)》,2015.3(8):第926-35页。

[2310] 10.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2311] 11.Kansy,B.A.等人,CD8(+)T细胞中的PD-1状态与头颈癌中的存活和抗PD-1治疗结果相关.《癌症研究》,2017.77(22):第6353-6364页。

[2312] 12.Jing,W.等人,使用PD-1(+)骨髓瘤反应性T细胞的过继性细胞疗法消除了小鼠中建立的骨髓瘤(Adoptive cell therapy using PD-1(+)myeloma-reactive T cells eliminates established myeloma in mice).《免疫治疗学癌症杂志》,2017.5:第51页。

[2313] 13.Fernandez-Poma,S.M.等人,表达PD-1的肿瘤浸润CD8(+)T细胞的扩增改善了过继性T细胞疗法的功效.《癌症研究》,2017.77(13):第3672-3684页。

[2314] 14.Betts,M.R.和R.A.Koup,T细胞脱粒化的检测:CD107a和b(Detection of T-cell degranulation:CD107a and b).《细胞生物学方法(Methods Cell Biol)》,2004.75:第497-512页。

[2315] 15.Rubio,V.等人,肿瘤细胞溶解性T细胞的离体鉴定、分离和分析(Ex vivo identification,isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells).《自然医学》,2003.9(11):第1377-82页。

[2316] 实例15:经PD1选择的TIL中的自体肿瘤反应性

[2317] 目的

[2318] 本实例评估了与匹配的未经选择的TIL相比,经扩增的程序性细胞死亡蛋白1(PD1)分选的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的自体肿瘤反应性/杀伤。

[2319] 范围

[2320] 评估来自黑素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的十三个匹配的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL响应于自体肿瘤刺激的反应性和杀伤能力。反应性和细胞毒性分别被测量为IFNγ分泌和肿瘤细胞死亡(细胞毒性%)。

[2321] 信息

[2322] 用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的过继性T细胞疗法(ACT)被认为是转移性黑素瘤和其它实体瘤的有效治疗,甚至在重度预处理的患者中也能引起持久和完全的应答[1-6]。在肿瘤发生期间,恶性肿瘤获得非同义突变,表示为新抗原[7、8]。最近的研究已经突出了肿瘤新抗原在肿瘤识别中的重要性,以及体内有效的抗肿瘤T细胞应答[8、9]。肿瘤特异性T细胞的存在与肿瘤消退和对TIL疗法的临床功效相关[10]。具体地,所选的新抗原反应性T细胞的ACT已经在患有结肠癌[8]和乳腺癌[11]的患者中介导了实质性客观的临床消退。

[2323] 直到最近,关于肿瘤中肿瘤特异性TIL的所有库和频率的知识有限[12、13]。ACT的关键目标是获得富集肿瘤反应性T细胞克隆的多克隆TIL产物。最近的研究已经证明,TIL中的PD1表达可以用作鉴定新抗原特异性淋巴细胞的标志物和选择工具。PD1在抗原遇到时表达并且在对肿瘤抗原有反应的T细胞上调,并且在肿瘤部位经历克隆扩增[13-20]。

[2324] 基于PD1+TIL是新抗原特异性淋巴细胞的观念,已经评估了PD1+TIL离体识别自体肿瘤系的能力。为了测定肿瘤反应性,将TIL与自体肿瘤细胞系共培养并且测定IFNγ。IFNγ是肿瘤微环境(TME)中的必需效应细胞因子,其被认为是用于鉴定抗原特异性T细胞的替代标志物。有趣的是,当与自体消化物[14、17]共培养时,与NSCLC和黑素瘤两者中的其PD1对应物相比,PD1+TIL分泌更高水平的IFNγ。

[2325] 肿瘤细胞溶解/杀伤也已经用于鉴定抗原特异性T细胞,然而,由于衍生和维持自体活肿瘤细胞系的问题,这些测定不是经常进行的。一项黑素瘤研究评估了分选的PD1+TIL的杀伤,并且证明与PD1-TIL相比,PD1+TIL具有更高的裂解自体肿瘤系的能力[13]。

[2326] 基于以上讨论的证据,选择用于表达PD1表达的TIL预期富集肿瘤/新抗原特异性T细胞,其证明在体外表现出更大的自体反应性。为了捕获肿瘤特异性细胞,在扩增之前使用荧光活化细胞分选(FACS)从新鲜消化的肿瘤(经PD1选择的)中分选PD1+TIL。使用两个连续的11天REP扩增经PD1选择的TIL和未经选择的TIL。

[2327] 评估肿瘤反应性和细胞溶解,以确定选择PD1+是否将富集抗原特异性T细胞。将经PD1选择的TIL与自体肿瘤细胞共培养并且评估IFNγ产生和肿瘤细胞死亡。将结果与匹配的未经选择的TIL制剂进行比较。

[2328] 实验设计

[2329] 使用TIL和自体肿瘤的共培养物来评估13个配对的经PD1选择和未经选择的TIL中的肿瘤细胞杀伤和反应性。肿瘤溶解和IFNγ分泌用于测量TIL产物中的抗原特异性。

[2330] 材料

[2331] 图145中描述了这项工作中使用的肿瘤样品和TIL产物。

[2332] 根据程序TMP-18-015,从4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC获得经PD1选择的和未经选择的TIL产物。简言之,使用DNA酶、透明质酸酶和胶原酶IV的混合物消化全肿瘤活检。将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD1进行染色,并且在FX500仪器(索尼,总部,纽约)上进行分选。在用于以下指出的测定之前,将剩余的消化物冷冻并解冻。使经PD1分选的细胞和未经选择的全肿瘤消化物经受两个11天快速扩增期(REP)以分别获得经PD1选择的TIL和未经选择的TIL。

[2333] 方法

[2334] 肿瘤处理和电镀

[2335] 使用死细胞去除试剂盒(美天旎,德国)处理自体全肿瘤消化物。将1e5活细胞铺板在96孔板的每个孔中,并且允许在37℃下在xCELLigence仪器(ACEA生物科学有限公司,加利福尼亚州)中粘附18小时。

[2336] 共培养设置

[2337] 将1e5经PD1选择的TIL和未经选择的TIL源性自体TIL添加到其相应的孔中,从而产生1:1(TIL:靶标)细胞比率,并且温育48小时。

[2338] 肿瘤细胞裂解量化

[2339] 自体靶细胞的杀伤被记录为由细胞脱离引起的阻抗增加。使用公式细胞溶解%=[1-(NCIst)/(AvgNCIRt)]×100计算细胞杀伤(细胞溶解%),其中NCIst是样品的归一化细胞指数,并且NCIRt是匹配的参考孔(单独消化)的归一化细胞指数的平均值。使用RTCA软件Pro(ACEA生物科学有限公司,加利福尼亚州)计算细胞溶解%。

[2340] IFNγ分泌

[2341] 在TIL添加后24小时采集上清液并且通过ELISA(R&D系统公司)评估IFNγ释放。在美国伯腾酶标仪(美国伯腾公司,佛蒙特州)上读取ELISA板,并且使用Gen5数据分析软件进行评估。使用GraphPad Prism v8对数据进行绘制。

[2342] 结果

[2343] 本实例检查了当与自体肿瘤消化物共培养时,经PD1选择的TIL是否比未经选择的TIL具有更大的杀伤能力和分泌IFNγ的能力。

[2344] 获得的结果

[2345] 经PD1选择的TIL中的肿瘤反应性和杀伤

[2346] 在小鼠和人类两者的临床前数据已经证明,PD1在肿瘤内的T细胞上的表达可以鉴定新抗原特异性淋巴细胞的库[13、14、17-20]。若干研究已经证明,当与自体肿瘤共培养时,与PD1-TIL相比,体外扩增的纯化的PD1+TIL分泌显著更大量的IFNγ[14、17]。基于这些研究,选择用于表达PD1表达的TIL预期富集肿瘤/新抗原特异性T细胞,当在体外评估时其将表现出更大的自体反应性。

[2347] 评估十三个匹配的经PD1选择的TIL和未经选择的TIL的自体肿瘤反应性和杀伤。使用肿瘤细胞指数测量肿瘤细胞溶解。细胞指数是由孔的细胞表面阻抗计算的细胞附着的量度。在肿瘤细胞粘附时,阻抗增加,细胞指数也增加。当肿瘤细胞死亡并脱离时,由于阻抗的降低,细胞指数降低。因此,如果TIL裂解肿瘤细胞,则细胞指数将下降,并且所计算的细胞裂解百分比将增加。然而,如果在共培养期间的任何时间,细胞指数下降到零以下,则不能计算所述样品的细胞溶解。

[2348] 在所评估的13个肿瘤中，由于肿瘤细胞活力差且肿瘤细胞对板的粘附不足，因此评估仅一种黑素瘤肿瘤的肿瘤细胞溶解。可评估的黑素瘤的细胞指数和肿瘤细胞的细胞溶解％分别显示在下面的图146A和146B中。

[2349] 针对IFNγ，对来自上述共培养细胞溶解测定的上清液进行测定。在所评估的13个肿瘤中，在3个黑素瘤和2个NSCLC中检测到IFNγ分泌(图146C)。

[2350] 由于技术困难，仅在1/13共培养肿瘤中评估肿瘤细胞溶解％。在具有适当的未经选择的TIL对照的可评估肿瘤中，经PD1选择的TIL表现出更大的杀伤自体肿瘤的能力，如通过与未经选择的TIL相比细胞指数的更大下降(图1A)(指示更多的细胞脱离和肿瘤细胞死亡)和更高的细胞溶解百分比(图1B)所确定的。这些结果得到黑素瘤研究的支持，所述黑素瘤研究还证明了使用自体肿瘤细胞系而不是全肿瘤消化物的替代性测定，经PD1+选择的亚群中的细胞溶解增强[13]。尽管可评估的肿瘤数量少，但是结果以及其它结果已经证明，经PD1选择的TIL比其未经选择的或PD1对应物具有更大的杀伤自体肿瘤的能力。

[2351] 在13个测定的共培养肿瘤中，可以在5个肿瘤中检测到IFNγ分泌。在5/5个测定的肿瘤中，当与自体肿瘤消化物共培养时，经PD1选择的TIL比未经选择的TIL分泌更高水平的IFNγ。IFNγ的分泌是肿瘤特异性的，因为用抗HLA-A、-B和-C阻断减少了所分泌的IFNγ的量(图1C)。在存在自体肿瘤的情况下产生更高水平的IFNγ表明经PD1选择的TIL比未经选择的TIL具有更高比例的抗原特异性TIL。

[2352] 结论

[2353] 相对于未经选择的TIL，经PD1选择的TIL表现出自体肿瘤细胞杀伤增强。

[2354] 响应于自体肿瘤，在经PD1选择的TIL中的IFNγ分泌显著大于未经选择的TIL。

[2355] 这些结果证明，与未经选择的TIL相比，经PD1选择的TIL在体外对自体肿瘤具有优异的反应性。

[2356] ACT中的临床功效与肿瘤特异性TIL的存在直接相关。因此，通过PD1选择和扩增来富集肿瘤特异性TIL可以增强TIL在体内启动有效且高效的抗肿瘤作用的能力。

[2357] 实例15的参考文献

[2358] 1.Rosenberg,S.A.等人，使用T细胞转移免疫疗法在严重预处理的患有转移性黑素瘤的患者中持久的完全应答.《临床癌症研究》,2011.17(13):第4550-7页。

[2359] 2.Stevanovic,S.等人，在用人乳头瘤病毒靶向的肿瘤浸润性T细胞治疗后转移性宫颈癌的完全消退(Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells).《临床肿瘤学杂志》,2015.33(14):第1543-50页。

[2360] 3.Stevanovic,S.等人，用于人乳头瘤病毒相关上皮癌的肿瘤浸润淋巴细胞治疗的II期研究(A phase II study of tumor-infiltrating lymphocyte therapy for human papillomavirus-associated epithelial cancers).《临床癌症研究》,2018。

[2361] 4.Andersen,R.等人，卵巢癌和肾细胞癌的肿瘤浸润淋巴细胞疗法(Tumor infiltrating lymphocyte therapy for ovarian cancer and renal cell carcinoma).《人疫苗免疫治疗学(Hum Vaccin Immunother)》,2015.11(12):第2790-5页。

[2362] 5.Andersen,R.等人，原发性肾细胞癌的微环境中的T细胞应答—过继性细胞疗法的意义(T-cell Responses in the Microenvironment of Primary Renal Cell

Carcinoma-Implications for Adoptive Cell Therapy).《癌症免疫学研究》,2018.6(2):第222-235页。

[2363] 6.Westergaard,M.C.W.等人,卵巢癌的微环境中的肿瘤反应性T细胞亚群(Tumour-reactive T cell subsets in the microenvironment of ovarian cancer).《英国癌症杂志(Br J Cancer)》,2019。

[2364] 7.Yossef,R.等人,用于个性化癌症免疫疗法的靶向独特和共享癌基因的新抗原反应性T细胞的增强检测.《临床调查洞察杂志》,2018.3(19)。

[2365] 8.Tran,E.等人,基于患有上皮癌的患者的突变特异性CD4+ T细胞的癌症免疫疗法(Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer).《科学》,2014.344(6184):第641-5页。

[2366] 9.McGranahan,N.等人,克隆新抗原引发T细胞免疫反应性和对免疫检查点阻断的敏感性(Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade).《科学》,2016.351(6280):第1463-9页。

[2367] 10.Schumacher,T.N.和R.D.Schreiber,癌症免疫疗法中的新抗原.《科学》,2015.348(6230):第69-74页。

[2368] 11.Zacharakis,N.等人,导致转移性乳腺癌的完全持久消退的体细胞突变的免疫识别(Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer).《自然医学》,2018.24(6):第724-730页。

[2369] 12.Gros,A.等人,黑素瘤患者的外周血中新抗原特异性淋巴细胞的预期鉴定(Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients).《自然医学》,2016.22(4):第433-8页。

[2370] 13.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2371] 14.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2372] 15.Simon,S.和N.Labarriere,肿瘤特异性T细胞上的PD-1表达:免疫疗法的朋友或敌人?《肿瘤免疫学》,2017.7(1):p.e1364828。

[2373] 16.Simon,S.等人,PD-1表达条件抗原特异性库内的T细胞亲合力.《肿瘤免疫学》,2016.5(1):p.e1104448。

[2374] 17.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2375] 18.Fernandez-Poma,S.M.等人,表达PD-1的肿瘤浸润CD8(+)T细胞的扩增改善了过继性T细胞疗法的功效.《癌症研究》,2017.77(13):第3672-3684页。

[2376] 19.Jing,W.等人,使用PD-1(+)骨髓瘤反应性T细胞的过继性细胞疗法消除了小鼠中建立的骨髓瘤.《免疫治疗学癌症杂志》,2017.5:第51页。

[2377] 20.Donia,M.等人,PD-1(+)多功能T细胞在癌症的肿瘤浸润淋巴细胞疗法后支配外周(PD-1(+)Polyfunctional T Cells Dominate the Periphery after Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy for Cancer).《临床癌症研究》,2017。23(19):第5779-5788页。

[2378] 21.Simoni,Y.等人,旁观者CD8(+)T细胞在人肿瘤浸润中是丰富的并且在表型上不同.《自然》,2018.557(7706):第575-579页。

[2379] 实例16:经PD1选择的TIL的表型表征

[2380] 目的

[2381] 为了在表型上表征经程序性细胞死亡蛋白1(PD1)选择的TIL。

[2382] 范围

[2383] 本实例涉及表征经PD1选择的TIL的细胞表面标志物的表达,所述细胞表面标志物是各种T细胞状态的特征,并且将其表型与匹配的未经选择的TIL的表型进行比较。

[2384] 信息

[2385] 癌症免疫疗法利用免疫系统来识别和破坏肿瘤细胞。靶向细胞毒性T淋巴细胞抗原4和PD-1的免疫检查点抑制剂(CPI)所达到的成功已经改变了癌症治疗,并且将免疫疗法连同外科手术、化学疗法和放射疗法一起确立为标准治疗方法之一。CPI疗法导致显著持久的临床应答,但仅在患有某些类型癌症的患者子集中,并且通常以严重副作用为代价[1、2]。

[2386] 利用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的过继性细胞疗法(ACT)已经作为针对若干癌症的强大且潜在治愈性疗法出现[3]。用于ACT的TIL产物是未经选择的、非基因操作的直接从肿瘤组织恢复并且离体大量扩增的多克隆T细胞的制剂[4]。这个过程确保患者肿瘤特异性记忆T细胞的潜在多样库的恢复,而无需抗原的性质或同一性的先验知识[5]。总而言之,与其它细胞疗法(如靶向单一组织特异性或肿瘤特异性抗原并且需要插入转基因的嵌合抗原受体(CAR)和TCR T细胞)相比,ACT是更简单、偏倚更少、更安全并且可能更有效的方法。然而,当前的TIL工艺还可以允许与癌症(所谓的旁观者TIL)无关并且识别抗原,如来自爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)、人巨细胞病毒(CMV)或流感病毒的抗原的T细胞的可变级分的恢复和扩增[6]。

[2387] 多系证据支持新抗原识别,随后肿瘤细胞杀伤作为TIL疗法的主要作用机制[7]。富集肿瘤新抗原特异性T细胞的TIL同时保持无偏倚以保持一定程度的多样性并且避免对抗原鉴定的需要表示一种用于优化产物的有吸引力的手段。

[2388] 作为活化诱导的T细胞调节剂,PD-1已经显示响应于最近的抗原遭遇而特异性表达,并且在浸润癌组织的T细胞的情况下,特异性地标记新抗原特异性细胞[8、9]。因此实施了一种方法,通过所述方法在离体扩增之前选择TIL进行PD-1表达,以相对于旁观者TIL富集相关TIL。所述方案涉及使用荧光活化细胞分选(FACS)直接从新鲜消化的肿瘤中分选PD-1+TIL,并且使其经受两步过程,所述两步过程包含11天活化步骤,随后是11天快速扩增方案(REP),以获得治疗适当数量的经PD-1选择的TIL。

[2389] 在当前研究中,在表型上表征经PD-1选择的TIL,以证实1)新产物满足LN-145释放规格和2)与未经选择的IL产物相当。通过流式细胞术评估经PD-1选择的TIL的谱系、分化、记忆、活化、耗尽和驻留记忆的细胞表面标志物的表达。

[2390] 实验设计

[2391] 经PD-1选择的和未经选择的TIL在22天过程,包含11天活化步骤,随后是11天REP的两步过程中扩增。使用流式细胞术在表型上表征最终TIL产物。值得注意的是,未经选择的TIL产物是从与经PD-1选择的TIL相同的全肿瘤消化物获得的。有限的肿瘤组织阻止了从

肿瘤碎片中衍生出未经选择的TIL对照，所述肿瘤碎片用于衍生Iovance的LN-145 TIL产物。另外，为了扩增小数量的经分选的PD-1群体，使未经选择的TIL经受2-REP过程，这与用于生成LN-145的预REP和单个REP相反。因此，尽管未经选择的TIL表示经PD-1分选的TIL的真实对照，但其并未反映LN-145 TIL。

[2392] 材料

[2393] 图147中描述了这项工作中使用的肿瘤样品和TIL产物。

[2394] 方法

[2395] PD1选择和扩增

[2396] 根据程序TMP-18-015，从4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC获得经PD-1选择的和未经选择的TIL产物。简言之，使用DNA酶、透明质酸酶和胶原酶IV的混合物消化全肿瘤活检。将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD-1进行染色，并且在FX500仪器(索尼，总部，纽约)上进行分选。在存在OKT3(30ng/ml，美天旎生物技术公司)和同种异体辐照的外周血单核细胞(1:100的TIL:饲养细胞比率)的情况下，使经PD-1选择的和未经选择的TIL经受11天活化步骤，随后是11天REP。

[2397] 抗体染色

[2398] 用活/死标志物对TIL进行染色并且用于CD3和表型标志物的表达，所述表型标志物定义了T细胞谱系、记忆、分化、活化和耗尽(图147)。使用指定为1和2的两个流式细胞术面板来覆盖感兴趣的标志物。抗体和缀合的荧光团列于下表59中，其中其通过表型参数进行排列。括号中的数字表示其相应的面板。

[2399] 表59:TIL表征的表型面板

[2400]

谱系	记忆	分化	活化	耗尽	驻留记忆
CD3-BUV395 (1,2)	CD45RA-Alx700 (1)	CD27-PECF594 (1)	CD25-BV563 (2)	PD1-PE (2)	CD39-FITC (2)
CD4-PECy7 (1)	CCR7-PE (1)	CD28-BB515 (1)	CD69-APCR700 (2)	Lag3-PECy7 (2)	CD49a-BV711 (2)
CD8-BV786 (1)		CD56-BV737 (1)	CD134-BV650 (2)	Tim3-BV421 (2)	CD103-PV786 (2)
		CD57-PacBlue (1)	CD137-PerCP-Cy5.5 (2)	CD101-APC (2)	
		KLRG1-PEDazzle594 (2)			

[2401] FACS分析

[2402] 按照标准实验室程序，在ZE5细胞分析仪(伯乐公司，加利福尼亚州)上运行染色细胞。简言之，通过在活的(活/死染料阴性或低的)和$CD3^+$的单细胞上进行门控(使用正向散射和侧向散射参数)鉴定可评估事件。基于FMO(荧光减一)和对照正常供体外周血单核T细胞对单个表型标志物进行门控。

[2403] 使用FlowJo v8.1软件执行数据分析(FlowJo有限公司，俄勒冈州)。使用GraphPad v8对结果进行绘图。

[2404] 预期结果

[2405] 对于大多数表型标志物，经PD-1选择的TIL预期与未经选择的TIL是相当的，并且满足LN-145表型释放标准。基于所发表的报告，经PD-1选择的TIL的PD-1表达预期会随着体外扩增步骤而降低[10-12]。经PD-1选择的TIL PD-1水平是否保持高于未经选择的TIL的水平是未知的。

[2406] 结果

[2407] 经PD1选择的TIL中的CD4和CD8表达

[2408] PD-1在CD3+ T细胞中表达,但大部分已经在CD8+ T细胞中表征,尽管其在CD4+和CD8+谱系两者中均有表达[10、13]。为了确定PD-1+的分选是否相对于未经选择的TIL改变了经扩增的PD-1选择的TIL中的CD4+和CD8+ T细胞谱系的比率,对13个配对样品进行比较用于2种标志物的表达。结果示出于图148中。

[2409] 经扩增的TIL中的CD4+和CD8+细胞的平均百分比在经PD-1选择的和未经选择的产物中是类似的。在经PD-1选择的和未经选择的TIL产物两者中,CD4+ T细胞的百分比高于CD8+ T细胞。

[2410] 这些结果表明,相对于未经选择的TIL产物,CD4+和CD8+TIL的比例在经PD-1选择的T细胞群体内没有显著不同。这些结果表明,选择PD-1不会改变最终扩增产物的T细胞谱系。

[2411] 经PD1选择的TIL中的青春/分化的标志物

[2412] 对ACT的应答需要在分化的T细胞中是典型的效应子功能与持久性的平衡,这与T细胞青春和中央记忆表型相关[14、15]。经典地,高CD27和CD28表达与T细胞青春相关,而CD56、CD57和KLRG1表达鉴定终末分化的细胞。针对这些标志物对十三个配对的经PD-1选择的和未经选择的TIL产物进行染色并且通过流式细胞术进行分析。结果示出于图149中。

[2413] 经PD-1选择的和未经选择的TIL表达类似的分化表型,如由低水平的CD27、CD56和KLRG1以及中等水平的CD28和CD57所指示的。然而,与未经选择的TIL相比,经PD-1选择的TIL具有显著较高的CD27水平和降低的KLRG1水平,这可能转化为经PD-1选择的TIL中分化程度较低的表型。这些结果与来自NSCLC的所选的PD-1高TIL(其中TIL是CD27+和KLRG1-,与其PD-1对应物相比)的报道一致[2]。CD27+TIL还与体内抗肿瘤活性相关,并且KLRG1+T与T细胞的体内持久性降低相关[16]。这些结果表明,经PD-1选择的TIL可能能够支持体内持久应答所需的持续抗肿瘤活性[7]。

[2414] 经PD1选择的TIL中的记忆T细胞群体

[2415] 可以基于2种细胞表面标志物CD45RA和CCR7的差异表达来鉴定T细胞记忆亚群。效应记忆T细胞(TEM)被定义为CD45RA-和CCR7-,中央记忆T细胞(TCM)被定义为CD45RA-和CCR7+,干细胞记忆T细胞(TSCM)被定义为CD45RA+和CCR7+,以及CD45RA+效应记忆T细胞或终末分化T细胞(TEMRA)被定义为CD45RA+和CCR7-[17]。

[2416] 所发表的研究已经表明,PD-1+TIL主要包含效应记忆T细胞(TEM)[11、18]。此外,已经显示这些TEM表示证明具有临床活性的未经选择的TIL产物的主要群体[19]。为了确定每个记忆T细胞亚群在经PD-1选择的TIL中的比例,通过流式细胞术对13种产物的CD45RA和CCR7表达进行评估。结果示出于图150中。

[2417] 如同Iovance的当前TIL产物、lifileucel和LN-145,作为证明具有临床功效的其它TIL产物,经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL两者主要包含TEM[20]。选择PD-1似乎不会改变经扩增的TIL的记忆库。

[2418] 经PD1选择的TIL的活化状态

[2419] 在T细胞活化后,若干细胞表面标志物被上调,各自处于活化过程的不同阶段。最早的活化标志物之一是CD69,其是在通过TCR活化后表达的诱导型细胞表面糖蛋白[21]。

CD25,IL-2受体的α亚基,比CD69稍晚被上调,并且在调节T细胞增殖中起着决定性作用[21]。另外,如CD134和CD137等共刺激性受体也被认为是T细胞活化的标志物,并且通常用于鉴定浸润肿瘤中的抗原特异性T细胞[21、22]。

[2420] 基于这些标志物的表达谱,已经显示REP后TIL显示活化的表型,这与TIL产物在输注后启动有效的抗肿瘤T细胞应答的能力一致[3]。

[2421] 广泛的研究已经评估了小鼠和人两者中的PD-1+和PD-1-TIL的活化状态。小鼠中的数据表明,与PD-1-相比,PD-1+TIL表达更高百分比的CD134和CD137[11、23]。在人研究中获得了类似结果,其中发现CD137在患有黑素瘤和NSCLC的患者中在PD-1+/PD-1高TIL中更高[8、12]。

[2422] 另外的研究已经评估了CD69和CD25在PD-1+TIL中的表达。已经显示很大一部分PD-1+TIL共表达CD69[24],然而大多数PD-1+缺少CD25[13]的表达。

[2423] 为了证实经PD-1选择的TIL在扩增后表达活化的表型,通过流式细胞术对13种TIL产物的CD25、CD69、CD134和CD137的表达进行分析并且将其与未经选择的TIL进行比较。结果示出于图151中。

[2424] 在经PD-1选择的TIL中平均检测到3.34%-22.28%的4种活化标志物,这表明在所有所测试的产物中,一部分TIL表达至少一种指示活化的标志物。CD25+、CD69+和CD134+的百分比与未经选择的TIL中的百分比是相当的,这表明PD-1选择步骤并未改变体外扩增的细胞的活化状态。然而,未经选择的TIL呈现出比经PD-1选择的TIL显著更低水平的CD137+T细胞,这可以反映经PD-1选择的TIL的活化状态略微更高。总之,这些结果显示,REP均匀地使经PD-1选择的和未经选择的TIL活化,并且表明PD-1+TIL在体外培养后表达活化的表型[10]。

[2425] 经PD-1选择的TIL中的耗尽标志物

[2426] 广泛的研究已经评估PD-1与其它共抑制/耗尽标志物的共表达。PD-1+TIL的子集一致地共表达TIM3、LAG3、TIGIT、BTLA和CTLA4[8、11、12、18、23]。然而,这些标志物是在新鲜分离的PD-1+TIL中评估的,并且关于其在经扩增的PD-1+TIL中的状态可获得的信息较少。

[2427] 有趣的是,在经扩增的PD-1+TIL中的PD-1表达显示出随着培养和扩增而降低,并且被解释为TIL离体复原的迹象[10、12]。

[2428] 为了更好地理解经PD-1选择的TIL的耗尽/抑制状态,通过流式细胞术对13种匹配的未经选择的和经PD-1选择的TIL产物的四种耗尽/抑制标志物LAG3、PD-1、TIM3和CD101的表达进行分析。CD101已经与晚期TIL功能障碍相关,并且被添加到耗尽标志物的标准列表中[25]。结果示出于图152中。

[2429] 经PD-1选择的TIL表达所有4种所测定的耗尽/抑制标志物。发现LAG3的含量为1.75到37.8%,PD-1的含量为9.06到53.8%,TIM3的含量为8.65-54.9%,并且CD101的含量为9.16-91.1%。未经选择的TIL相对于经选择的产物表达类似的LAG3、TIM3和CD101水平,这再次表明PD-1+TIL的分选在体外扩增时并未显著偏斜最终产物的表型。仅PD-1水平在2种产物之间显著不同,其中经PD-1选择的产物表达比未经选择的细胞更高的PD-1+细胞百分比。然而,在经PD-1选择的TIL中,PD-1+细胞的数量从分选后的92.8%显著下降到REP后平均27.1%。这与其它人报道的黑素瘤和NSCLC TIL的数据一致,并且表明体外复原[10、

12]。

[2430] 为了比较经PD-1选择的和未经选择的TIL之间的体外扩增诱导的PD-1下调的延伸,评估了两种产物的PD-1+TIL的扩增前和扩增后百分比。结果示出于图153中。

[2431] PD-1的表达在经PD-1选择的TIL(平均27.1%,范围为9.06到43.6)和未经选择的TIL产物(平均10.6%,范围为4.93到29.3)两者中相对于初始平均PD-1水平分别为92.8%和37.3%显著降低。因此,扩增TIL的过程同样影响两种TIL制剂,其中PD-1的表达降低>3倍。

[2432] 经PD1选择的TIL中的驻留记忆T细胞标志物

[2433] 整联蛋白介导淋巴细胞在外周组织中的保留。这些整联蛋白中的一些整联蛋白在T细胞亚群(称为驻留记忆T细胞)上表达。在表型上非常类似于效应记忆T细胞的这些细胞不会循环并且驻留在组织内。

[2434] 若干种整联蛋白如αEβ7(CD103)、α1β1(CD49a)在新鲜分离的TIL[7、8]的可变级分上表达。与CD39(一种参与腺苷途径并且与抑制信号相关的T细胞表面分子)一起,CD49和CD103在PD-1+TIL上被鉴定具有肿瘤反应性[2、8、10]。此外,PD-1和CD103共表达已经与卵巢癌中的有利临床结果相关[9]。

[2435] 为了确定经PD1选择的TIL和未经选择的TIL产物是否表达与驻留记忆T细胞相关的标志物,对13个肿瘤的CD39、CD49a和CD103表达的表达进行分析。参见图153。

[2436] 在经PD-1选择的TIL中CD49a+和CD103+细胞相对于未经选择的TIL的百分比中没有观察到差异,而在经PD-1选择的TIL中CD39表达显著高于未经选择的TIL。所述差异可能与未经扩增的PD-1+TIL中较高水平的CD39相关,如通过这种标志物与新抗原特异性的相关所表明的[6]。总体而言,这3种标志物在TIL产物中差异表达。

[2437] 结论

[2438] 观察到的所测定的细胞表面标志物的表型表达的差异示于下表60中。除了KLRG1之外,与未经选择的TIL相比,在经PD1选择的TIL中列出的表型标志物显著上调。

[2439] 表60:在经PD1+-选择的TIL和未经选择的TIL中差异表达的表型标志物

[2440]

分化	活化	耗尽	驻留记忆
CD27	CD137	PD1	CD39
KLRG1			

[2441] 与未经选择的TIL相比,经PD-1选择的TIL似乎分化程度较低,如通过CD27的更高表达和KLRG1的更低水平所证明的。TIL的功效和治愈潜力取决于其杀伤肿瘤中的所有恶性细胞并且持续足够长的时间以根除肿瘤中的所有恶性细胞的能力[14、24]。因此,中等分化的表型可以是经PD-1选择的TIL的阳性特征。

[2442] 当与未经选择的TIL相比时,经PD-1选择的TIL表达更高百分比的CD137和CD39。这些发现表明,经PD-1选择的TIL处于活化状态,一旦在体内转移,其可能具有增强其效应子功能的潜力。

[2443] 总体而言,结果表明,经扩增的PD-1选择的TIL主要由具有低耗尽标志物表达的非分化TEM构成,这表明这些细胞在体外扩增后被复原。

[2444] 经PD-1选择的TIL的表型特征可以与Iovance的未经选择的TIL产物lifileucel和LN-145相当,其已经分别在转移性黑素瘤和宫颈癌中显示出临床功效。

[2445] 实例16的参考文献

[2446] 1.Jing,W.等人,使用PD-1(+)骨髓瘤反应性T细胞的过继性细胞疗法消除了小鼠中建立的骨髓瘤.《免疫治疗学癌症杂志》,2017.5:第51页。

[2447] 2.Fernandez-Poma,S.M.等人,表达PD-1的肿瘤浸润CD8(+)T细胞的扩增改善了过继性T细胞疗法的功效.《癌症研究》,2017.77(13):第3672-3684页。

[2448] 3.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2449] 4.Ahmadzadeh,M.等人,浸润肿瘤的肿瘤抗原特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1并且是功能受损的.《血液》,2009.114(8):第1537-44页。

[2450] 5.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2451] 6.Crompton,J.G.、M.Sukumar和N.P.Restifo,在基于细胞的免疫疗法中将T细胞扩增从效应子分化解偶联(Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy).《免疫学综述(Immunol Rev)》,2014.257(1):第264-276页。

[2452] 7.Westergaard,M.C.W.等人,卵巢癌的微环境中的肿瘤反应性T细胞亚群.《英国癌症杂志》,2019。

[2453] 8.Bally,A.P.、J.W.Austin和J.M.Boss,PD-1表达的基因和表观遗传调节(Genetic and Epigenetic Regulation of PD-1 Expression).《免疫学杂志》,2016.196(6):第2431-7页。

[2454] 9.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2455] 10.Golubovskaya,V.和L.Wu,T细胞、记忆、效应子功能和CAR-T免疫疗法的不同亚群(Different Subsets of T Cells,Memory,Effector Functions,and CAR-T Immunotherapy).《癌症(Cancers)》(巴塞尔(Basel)),2016.8(3)。

[2456] 11.Kansy,B.A.等人,CD8(+)T细胞中的PD-1状态与头颈癌中的存活和抗PD-1治疗结果相关.《癌症研究》,2017.77(22):第6353-6364页。

[2457] 12.Radvanyi,L.G.等人,在转移性黑素瘤患者中使用经扩增的自体肿瘤浸润淋巴细胞的特异性淋巴细胞亚群预测对过继性细胞疗法的应答(Specific lymphocyte subsets predict response to adoptive cell therapy using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic melanoma patients).《临床癌症研究》,2012.18(24):第6758-70页。

[2458] 13.Wolfl,M.等人,CD137的活化诱导的表达允许对响应于抗原的CD8+ T细胞的全部库的检测、分离和扩增,而不需要了解表位特异性(Activation-induced expression of CD137 permits detection,isolation,and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities).《血液》,2007.110(1):第201-10页。

[2459] 14.Duhen,T.等人,CD39和CD103的共表达鉴定了人实体瘤中的肿瘤反应性CD8 T细胞(Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in

human solid tumors).《自然通讯》,2018.9(1):第2724页。

[2460] 15.Rosenberg,S.A.等人,使用T细胞转移免疫疗法在严重预处理的患有转移性黑素瘤的患者中持久的完全应答.《临床癌症研究》,2011.17(13):第4550-7页。

[2461] 实例17:使用纳武单抗通过流式细胞术分选和全规模扩增来选择PD1 TIL用于临床制造

[2462] 介绍

[2463] 本实例旨在开发一种方案,所述方案被设计成在从肿瘤消化物中选择PD1 TIL,以富集自体肿瘤反应性T细胞的TIL产物。本实例提供了一种使用纳武单抗作为PD1染色抗体代替PE缀合的克隆号EH12.2H7来获得经PD1选择的TIL的方案。

[2464] 目的

[2465] 这个方案的目的是开发一种使用纳武单抗作为选择剂分选PD1 TIL并且扩增用于制造临床试验材料的方法。

[2466] 范围

[2467] 工作范围是使用设计用于全规模临床制造的2-REP方案扩增来自黑素瘤或肺或头颈或卵巢肿瘤的经分选的PD1 TIL(图154)。

[2468] 进行两个小规模实验和一个全规模实验。

[2469] 在第0天,使用新染色方法(使用纳武单抗)和染色方法(使用抗PD1(EH12.2H7))将肿瘤消化物平均分配以纯化PD1 TIL,并且对PD1 TIL进行流式分选。

[2470] 对于小规模工艺(1/100规模),在第0天通过计算10%的具有最低分选结果的PD1 TIL,并且将所述数量的TIL从每次分选转移到具有饲养细胞的相应G-Rex-10M烧瓶和具有IL-2培养基的OKT-3中来启动REP-1。REP-2按照实例9启动。在以下方法章节中概述了相关时间点的简要解释(图155)。

[2471] 对于全规模工艺,在第0天使用具有100e6同种异体的饲养细胞和30ng/mL OKT3的经分选的PD1 TIL启动REP-1,持续11天。将使用采集的REP-1产物在第11天启动REP-2。按照IOVA制造批次记录,进行REP-2(第11天)以及随后的第16天和第22天的过程。在以下方法章节中概述了相关时间点的简要解释(图154)。

[2472] 对于所有条件,第22天采集通过体积减少,随后在NC-200上进行细胞计数来启动。

[2473] 对经扩增的TIL和最终产物的细胞生长、活力、表型、端粒长度和功能(IFNγ和颗粒酶B分泌、CD107a动员)进行评估。

[2474] 4.方法

[2475] 消化后的PD1 Gen-2小规模和全规模工艺的概述

[2476] 图155:小规模工艺概述:PD1-A是使用此方案中概述的纳武单抗染色程序的条件。PD1-B是使用抗PD1-PE(克隆号EH12.2H7)染色方法的条件。本体条件用作对照。

[2477] 材料

[2478] 肿瘤组织

[2479] 从研究联盟和组织采购供应商获得各种组织学的肿瘤。用于TIL生长的标准试剂,其包含:G-Rex 100MCS和500MCS烧瓶(威尔森沃尔夫公司,目录号分别为81100-CS、85500S-CS);GMP重组IL-2(Cell-Genix,德国,目录号1020-1000);GlutaMAX 100X(赛默飞世尔,目录号35050061);以及庆大霉素50mg/mL(赛默飞世尔,目录号15750060)。

[2480] 流式细胞术染色和分析试剂

[2481] 流式细胞术抗体

[2482] 抗PD1 PE,克隆EH12.2H7,Biolegend公司,目录号329906

[2483] 抗CD3 FITC,克隆OKT3,Biolegend公司,目录号317306

[2484] 抗IgG4 Fc-PE,克隆HP6025,南方生物技术公司,目录号9200-09

[2485] 纳武单抗[商标名称:Opdivo]10mg/mL(百时美施贵宝公司,纽约)

[2486] PE抗人IgG4,克隆HP6023,0.5mg/mL(Biolegend公司,圣地亚哥,目录号98155)

[2487] 分选缓冲液

[2488] 含2%FBS的HBSS。

[2489] 收集缓冲液

[2490] 含50%hAB血清的HBSS

[2491] 程序

[2492] 肿瘤组织制备

[2493] 从研究联盟和组织采购供应商获得新鲜切除的肿瘤样品。将肿瘤在2-8℃下在HypoThermosol(生物生命解决方案公司,华盛顿,目录号101104)(具有庆大霉素(10mg/mL)和两性霉素B(250μg/mL))中运送过夜。

[2494] 对小瓶/管的肿瘤进行拍照。从包装中去除肿瘤并且在肿瘤洗涤缓冲液(含50μg/mL庆大霉素的过滤的HBSS)中每次洗涤洗涤3X,持续2分钟。

[2495] 将整个肿瘤碎裂为4-6-mm3的碎片,以准备进行肿瘤消化。将4-6-mm^3碎片保持在含有10mL肿瘤洗涤缓冲液/孔的6孔板的孔中。

[2496] 用于肿瘤消化的酶制剂

[2497] 使用如本文所述的GMP胶原酶、中性蛋白酶和DNA酶I消化肿瘤。

[2498] 以针对以下消化酶中的每种消化酶所指示的无菌HBSS的量重构冻干酶。确保从瓶子的侧面和从瓶子开口上的保护箔捕获任何残留粉末。上下移液若干次并且涡旋以确保完全重构。

[2499] 在10ml无菌HBSS中重构胶原酶AF-1(Nordmark,瑞典,N0003554)。冻干的储备酶的浓度为2892PZ U/小瓶。因此,重构之后,胶原酶储备液为289.2PZ U/ml。**注意,酶的储备液可以改变,从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量**。等分成100μl等分试样并且在-20℃下储存。

[2500] 在1ml无菌HBSS中重构中性蛋白酶(Nordmark,瑞典,N0003553)。冻干的储备酶的浓度为175DMC U/小瓶。因此,重构之后,中性蛋白酶储备液为175DMC/ml。**注意,酶的储备液可以改变,从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量**。等分成20μl等分试样并且在-20℃下储存。

[2501] 在1ml无菌HBSS中重构DNA酶I(罗氏公司,瑞士,03724751)。冻干的储备酶的浓度为4KU/小瓶。因此,重构之后,DNA酶储备液为4KU/ml。**注意,酶的储备液可以改变,从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量**。等分成250μl等分试样并且在-20℃下储存。

[2502] 解冻GMP消化混合物的3种组分,并且如下制备工作GMP消化混合物:将10.2μl的中性蛋白酶(0.36DMC U/ml)、21.3μl的胶原酶AF-1(1.2PZ/ml)和250μl的DNA酶I(200U/ml)添

加到4.7ml无菌HBSS中。将消化混合物直接置于C管中。

[2503] 肿瘤处理和消化

[2504] 对于GentleMACS OctoDissociator,将多达4-6mm的肿瘤碎片转移到上述5ml消化混合物中的每个GentleMACS C管(C管)中。使用另外的GentleMACS C管来处理另外的肿瘤碎片。

[2505] 将每个C管转移到GentleMACS OctoDissociator。通过将解离器设置为下表61中列出的相应肿瘤组织学的适当程序来消化。解离需要大约一小时。

[2506] 表61:基于肿瘤组织类型的美天旎OctoDissociator程序。

[2507]

肿瘤组织类型	名称	程序
黑素瘤、卵巢、结肠、下咽和肾	柔软的	37C_h_TDK_1
肺和前列腺	中等	37C_h_TDK_2
乳腺、胰腺、肝细胞、头颈部鳞状细胞(HNSCC)	坚硬的	37C_h_TDK_3

[2508] 消化后,将一个或多个C管从Octodissociator或旋转器中去除,并且放置在BSC中。用25-mL血清移液管从每个C管去除消化物,并且使本体消化物通过70-μm细胞滤网进入50-mL锥形管中。

[2509] 注意:不允许消化物由于来自移液管的压力而飞溅。将溶液轻轻倒入70-μm细胞滤网中。避免移液管尖端接触过滤器。

[2510] 肿瘤的未消化部分可能无法通过滤网,用另外的10mL的HBSS洗涤一个或多个C管,并且使洗涤通过细胞滤网。用HBSS将50-mL锥形管QS到50mL。

[2511] 在室温下在400x G下将消化物离心5分钟(全加速和全制动)。

[2512] 将锥形管转移到BSC并且抽吸或倾析上清液。将沉淀物重悬于5mL的温热CM1+6000IU/mL IL-2中并且上下移液5-6次。在无稀释的情况下,在NC-200上进行2个细胞计数。

[2513] 将0.5-1mL的消化物置于旁边进行本体对照,并且低温保存2×500μl消化物的等分试样,用于肿瘤反应性测定。在冰上保持消化。

[2514] 注意:一旦观察到冰水浆料,确保立即用压碎的或团粒状的冰替换。

[2515] 平均分配剩余的细胞,进行抗PD1-PE(克隆号EH12.2H7)和纳武单抗染色程序。

[2516] 使用抗PD1-PE(克隆号EH12.2H7)和细胞分选的肿瘤消化物流式细胞术染色

[2517] 将肿瘤消化物的前半部分用抗PD1-PE进行染色。

[2518] 使用纳武单抗和细胞分选的肿瘤消化物流式细胞术染色

[2519] 对于第二部分,将未染色阴性对照、PE和FITC单色补偿对照的约1e5个细胞去除到标记的15-mL锥形管中。剩余的肿瘤消化物将用纳武单抗和抗IgG4-PE(针对纳武单抗的二级抗体)进行染色。

[2520] 分选缓冲液(2%FBS)的制备:从新鲜的500mL HBSS瓶中抽吸出2ml的HBSS并且添加10ml的FBS。将分选缓冲液保持在冰中,直到进一步使用。

[2521] 工作纳武单抗溶液的制备:为了制备工作溶液,通过向990-μl的分选缓冲液中添加10-μl的纳武单抗[10mg/mL]来进行1:100稀释。

[2522] 中间体1:50 IgG4稀释的制备:

[2523] 将10-uL的抗IgG4-PE添加到微量离心管中的490uL分选缓冲液中,并且轻轻涡旋5秒以充分混合。将中间体稀释液置于冰上,直到进一步使用。

[2524] 用于流动分选的肿瘤消化物样品的制备：

[2525] 使用来自上文的细胞计数数据，计算出肿瘤消化管中剩余的细胞数。

[2526] 添加10mL的HBSS进行消化，并且在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2527] 将锥形管转移到BSC并且倾析上清液。用分选缓冲液以10e6个细胞/毫升重悬细胞的计算体积(针对TVC浓度，重悬分选缓冲液体积，纳武单抗体积参考表编号)。

[2528] 每1ml细胞添加10-μl L的工作纳武单抗。

[2529] 表62:建议的重悬分选缓冲液和待添加的纳武单抗体积。

[2530]

选项	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
TVC	< 10e6	> 10e6-20e6	> 20e6-30e6	> 30e6-40e6	> 40e6-50e6	> 50e6-60e6	> 60e6-70e6	> 70e6-80e6	> 80e6-90e6	> 90e6-100e6
重悬体积（mL）	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
工作纳武单抗（uL）	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

[2531] 用1-mL微量移液管轻轻混合消化物，并且在冰上温育细胞30分钟。温育期间避光。在温育期间通过每10分钟轻轻地轻拂来搅动，以确保彻底染色。

[2532] 温育后，向样品消化物、单色补偿和未染色的阴性对照中添加10mL的分选缓冲液。

[2533] 在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2534] 轻轻地倾析样品。

[2535] 将沉淀物重悬于400-μL的分选缓冲液中并且使用血清学移液管来测量样品的总体积。每100μl添加3μL的抗CD3-FITC，并且每500μl添加50μL中间体稀释的抗IgG4-PE(参见章节:9.5.3)。

[2536] 用1-mL微量移液器轻轻混合消化物，并且在冰上温育细胞30分钟。温育期间避光。在温育期间通过每10分钟轻轻地轻拂来搅动，以确保彻底染色。

[2537] 温育后，向样品消化物中添加10-mL的分选缓冲液。

[2538] 将样品消化物通过70-μm细胞滤网过滤到标记的50-mL锥形管中。

[2539] 在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2540] 在分选缓冲液中以高达10e6个细胞/毫升重悬细胞。最小体积为300-μl，并且转移到新的15mL锥形管中。

[2541] 将所述管储存在冰上，用铝箔覆盖，直到进一步使用。

[2542] 单色补偿的制备：

[2543] PE补偿对照用纳武单抗加上抗IgG4-PE二级进行染色，并且FITC补偿对照将用抗CD3-FITC进行染色。

[2544] 将10mL的HBSS添加到未染色的PE和FITC补偿管中并且在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2545] 未染色管：

[2546] 将细胞重悬于500-μL的分选缓冲液中并且储存在冰中，直到其它样品准备好进行分选。

[2547] FITC补偿管：

[2548] 将细胞重悬于100-μL的分选缓冲液中。

[2549] 每100-μL添加3-μL的抗CD3-FITC。

[2550] 用1-mL微量移液管轻轻混合消化物，并且在冰上温育细胞30分钟。通过用铝箔覆盖冰桶来在温育期间避光。

[2551] 在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2552] 将细胞重悬于500μl的分选缓冲液中并且储存在冰中，直到其它样品准备好进行分选，用铝箔覆盖直到进一步使用。

[2553] PE补偿管：

[2554] 将锥形管转移到BSC并且倾析上清液。将细胞重悬于1mL的分选缓冲液中。

[2555] 每1ml细胞添加10-μL的工作纳武单抗。

[2556] 温育后，添加10mL的分选缓冲液，在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2557] 轻轻地倾析样品并且将沉淀物重悬于500μL的分选缓冲液中并且使用血清学移液管来测量样品的总体积。每500μL细胞添加50μL中间体稀释的抗IgG4-PE(参见章节:9.5.3)抗IgG4-PE。

[2558] 用1-mL微量移液管轻轻混合消化物，并且在冰上温育细胞30分钟。温育期间避光。

[2559] 在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2560] 将细胞重悬于500μl的分选缓冲液中并且储存在冰中，直到其它样品准备好进行分选，用铝箔覆盖直到进一步使用。

[2561] 收集管的制备：

[2562] 为分选群体制备15-mL收集管。将2-mL的收集缓冲液(含50％hAB血清的50％HBSS)置于管中。将收集管储存在冰上，直到进一步使用。

[2563] 细胞计数和活力评估

[2564] 使用如本文所述的Chemometec NC-200细胞计数器获得细胞和活力计数的程序。

[2565] 使用Sony FX500的FACS分选

[2566] 从肿瘤消化物流式细胞术分选经PD1选择的TIL，用于分选程序和维持。

[2567] PD1快速扩增方案—全规模REP第0天(REP-1)

[2568] 培养基制备

[2569] 在37℃温育箱中制备1L的CM1+6000IU/mL IL-2，持续至少24小时。

[2570] PBMC饲养细胞制备和TIL接种TIL进行REP-1

[2571] 实例9提供了关于启动全规模第0天(REP-1)的说明书，其中以下例外：

[2572] 由两种分选产生的经PD1选择的TIL的最少数量将被用作经PD1选择的TIL的数量，以添加到PD1-A和PD1-B条件两者中。计算相应分选的体积以在PD1-A和PD1-B条件两者下实现所述数量。将TIL体积转移到其相应的G-Rex 100M烧瓶中。

[2573] PD1快速扩增方案—小规模REP第0天(REP-1)

[2574] 培养基制备

[2575] 在37℃温育箱中制备并预加热1L的CM1+6000IU/mL IL-2，持续至少24小时。

[2576] PBMC饲养细胞制备

[2577] 解冻适当数量的小瓶(将需要10e6每烧瓶;假定60e6-80e6 PBMC每1mL小瓶)进行REP-1

[2578] 将40mL温热的CM1+6000IU/mL IL-2置于50mL锥形管中并且将1mL PBMC饲养细胞小瓶移液到锥形管中。

[2579] 将解冻的PBMC饲养细胞上下移液以彻底混合并在NC-200上进行2个细胞计数。

[2580] 计算并转移将10e6 PBMC转移到G-Rex 10M所必需的体积。

[2581] 向G-Rex 10M中添加3-μL的aCD3(OKT-3)。将烧瓶置于温育箱中。

[2582] 接种TIL进行REP-1

[2583] 计算最低PD1分选结果的10％并且计算相应分选的体积,以便在PD1-A和PD1-B条件两者下实现所述数量。将TIL体积转移到其相应的G-Rex 10M烧瓶中。

[2584] 向本体TIL对照条件中添加与PD1细胞相等数量的CD3+细胞。为了获得合适体积的消化物,遵循以下步骤:

[2585] 通过将所获得的消化物TVC乘以从最低分选报告获得的活细胞的CD3+％来计算消化物中的CD3+TVC/mL。(即,10e6*10％＝1e6)。

[2586] 在获得这一数字之后,将所使用的PD1细胞的数量除以这一数字。(即,1e5/1e6＝0.1mL)。

[2587] 将此体积(0.1mL)的消化物添加到本体TIL烧瓶中并且用CM1+6000IU/mL IL-2填充到100mL。

[2588] 将所有烧瓶置于37℃、5％CO2温育箱9.10中。PD1快速扩增方案—全规模第11天、第16天和第22天

[2589] 每个制造批次记录遵循全规模工艺。与实例9中描述的步骤类似地处理本体TIL条件。

[2590] 接受标准

[2591] 下表63指定了用于评估小规模(外推TVC)和全规模实验的性能的接受标准。

[2592] 表63:在工艺和采集中产物释放测试和接受标准

[2593]

测试类型	方法	接受标准
工艺中测试		
分选后纯度（PD1+%）	流式细胞术	> 80%
释放测试		
外观	目视检查	袋子完好，无团块迹象
细胞活力	荧光（LAB-056）	> 70%
总活细胞计数	荧光（LAB-056）	1×10^9 到 150×10^9
纯度（CD45+CD3+%）	流式细胞术（LAB-042）	> 90% CD45+CD3+细胞
IFNg（经刺激的-未经刺激的）	珠粒刺激和 ELISA（LAB-016）	> 500 pg/mL

[2594] 下表64指定了进行的另外的最终产物表征测试。

[2595] 表64:最终产物表征(仅供参考)

[2596]

测试类型	方法	报告结果
纯度和记忆 T 细胞亚群表型	流式细胞术（LAB-055）	报告结果
活化和耗尽标志物表型	流式细胞术（LAB-061）	报告结果
端粒长度	TAT（生命长度）	报告结果
端粒酶活性	Q-TRAP（生命长度）	报告结果
颗粒酶 B	珠粒刺激和 ELISA（LAB-064）	报告结果
CD107A	有丝分裂原刺激和流式细胞术（LAB-061）	报告结果
TCR Vβ 测序	深度测序（健谱生物科技公司）	报告结果（如果可用的话）
肿瘤反应性/杀伤测定	肿瘤消化物共培养/肿瘤杀伤	报告结果
代谢物分析	Cedex 生化分析仪	报告结果

[2597] 实例17参考文献

[2598] 实例6和7:直接离体选择和扩增PD1+细胞:一种用于增强ACT疗法的肿瘤反应性TIL的工艺。

[2599] 实例9:用于全规模制造的$PD1^{+}$TIL的选择和扩增。

[2600] 实例10:用于全规模制造的$PD1^{高}$TIL的选择和扩增。

[2601] 实例18:在肿瘤消化物中表达PD-1的细胞

[2602] 目的

[2603] 评估程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)在全肿瘤消化物中的表达。

[2604] 范围

[2605] 评估来自以下肿瘤组织学的全肿瘤消化物的PD-1的表达:黑素瘤、非小肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌(OC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、前列腺癌(PC)和结肠直肠癌(CRC)。

[2606] 背景信息

[2607] PD-1是多维表型标志物,其与活化、抗原特异性和耗尽相关。其在活化后被快速诱导并且在慢性疾病环境,包含癌症中在经历抗原的细胞上维持[1、2]。分子地,PD1是调节细胞表面受体的CD28家族的成员并且在慢性活化的T细胞、NKT细胞、B细胞和单核细胞上表达[3-5]。与其配体PD-L1和PD-L2的接合会诱导导致T细胞活化、增殖、存活和细胞因子产生减少的信号传导级联[6]。

[2608] 尽管PD-1具有免疫抑制作用,但是表达PD-1的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的存在已经与HNSCC和NSCLC中的有利临床结果相关,这表明这些TIL可能涉及控制肿瘤进展[7-9]。

[2609] 黑素瘤和NSCLC中的研究已经证明,大多数肿瘤反应性TIL包括在$PD\text{-}1^{+}$ T细胞亚群内[4、8、10]。

[2610] 基于$PD\text{-}1^{+}$TIL是新抗原/肿瘤特异性淋巴细胞的观念,Iovance正在开发一种新型经PD-1选择的TIL产物LN-145-S1,其富集从全肿瘤消化物中直接分选的$PD\text{-}1^{+}$TIL。

[2611] 尽管PD-1表达对于对抗PD-1疗法的应答是必需的,但是单独的PD-1表达并不预测对疗法的应答性。作为实例,PD-1存在于OC中的TIL上并且其表达与存活相关[11]。然而,OC中的最近临床试验证明抗PD-L1药物阿维鲁单抗与化学疗法组合并未增强无进展存活

[12]。这项研究连同在肿瘤微环境中表达PD-1^{+}的对抗PD-1疗法有抗性的大量患者一起显示,PD-1/PD-L1轴的体内阻断不足以控制大多数癌症。

[2612] 使用TIL的过继性T细胞疗法已经在对抗PD-1难治的黑素瘤患者中证明了显著的功效,这表明用于离体扩增TIL的方案能够复原TIL,这与体内PD-1阻断相反[13]。

[2613] 在本实例中,检查了在离体扩增之前分选PD-1^{+}TIL关于在所有PD-1^{+}癌症组织学中进一步改进对TIL疗法的应答率。

[2614] 本研究的目的是针对PD-1^{+}TIL的存在调查多种肿瘤组织学,以支持其在临床上用经扩增的TIL产物进行靶向。

[2615] 实验设计

[2616] 通过流式细胞术评估来自多种肿瘤组织学的肿瘤消化物的PD-1表达。

[2617] 材料

[2618] 表65中描述了这项工作中使用的肿瘤消化物。缩写词:CRC(结肠直肠癌)、HNSCC(头颈部鳞状细胞癌)、MSI(微卫星不稳定性)、MSS(微卫星稳定)、ND-PBL(正常供体外周血淋巴细胞)、NSCLC(非小细胞肺癌)、OC(卵巢癌)、PD-1(程序性细胞死亡蛋白1)、REP(快速扩增方案)、TIL(肿瘤浸润T细胞)和TNBC(三阴性乳腺癌)。

[2619] 表65:用于这些研究的肿瘤消化物的描述

[2620]

肿瘤 ID	组织学	所生成的经 PD-1 选择的 TIL
H3035	HNSCC	是
H3036	HNSCC	否 培养物污染
H3037	HNSCC	否 培养物污染
H3038	HNSCC	是
H3039	HNSCC	是
L4089	NSCLC	是
L4096	NSCLC	是
L4097	NSCLC	是
L4100	NSCLC	是
L4101	NSCLC	是
L4104	NSCLC	是
L4106	NSCLC	是
M1132	黑素瘤	是
M1136	黑素瘤	是
M1139	黑素瘤	是
M1141	黑素瘤	是
OV8030	卵巢	是
OV8042	卵巢	是
OV8042	卵巢	是
T6049	TNBC	是
T6056	TNBC	是
T6058	TNBC	是
T6060	TNBC	是
OC20019	前列腺	是
OC20030	前列腺	是
CC10026	CRC	否 不良消化细胞产率
CC10027	CRC	否 不良消化细胞产率
CC10028	CRC	是
CC10029	CRC	是
CC10031	CRC	否 培养物污染
CC10034	CRC	是
CC10037	CRC	是
CC10039	CRC	是

[2621] 方法

[2622] 肿瘤处理

[2623] 将重量为0.2g到1.5g的组织样品部分切成4-6mm的碎片，并且消化成包含肿瘤、基质和免疫细胞的单细胞悬浮液。使用包含DNA酶(500IU/ml)、透明质酸酶(1mg/ml)和胶原酶IV(10ng/ml)的三重酶混合物在37℃下在温和搅拌下消化组织1小时。

[2624] PD-1染色

[2625] 根据下表对全肿瘤消化物进行染色。将细胞在100μl/1e6细胞中进行染色。

[2626] 表66:PD-1流式细胞术染色板

[2627]

抗体/染色	克隆	荧光染料	制造商	量(μl/1e6细胞)
7-AAD	N/A	N/A	BD生物科学公司	20
CD3	UCHT1	FITC	BD生物科学公司	3
CD4	OKT4	PE/Cy	BioLegend公司	1
PD-1	EH12.2H7	PE	BioLegend公司	2.5

[2628] PD-1选择和门控策略

[2629] 将染色细胞置于FX500细胞分选仪(索尼,纽约)或ZE5细胞分析仪(伯乐公司,加利福尼亚州)上,并且基于以下门控策略进行分析。首先,基于正向和反向或侧向散射鉴定单细胞。接下来,基于阴性/低7-AAD或活死蓝色荧光对活细胞进行门控。使用CD3鉴定TIL。使用正常供体外周血(ND-PBL)作为对照鉴定PD-1细胞。将PD-1的选择门置于ND-PBL中PD-1表达的基线之上。使用FlowJo v8.1软件执行数据分析(FlowJo有限公司,俄勒冈州)。使用GraphPad v8对结果进行绘图。

[2630] 结果

[2631] PD-1在肿瘤消化物中的表达

[2632] 为了鉴定哪些组织学是PD-1选择的候选物,使用流式细胞术在来自若干癌症组织学的多个肿瘤样品中评估PD-1的表达。根据程序TMP-18-015(缩写为章节5.2)测试了总共4个黑素瘤、7种NSCLC、5种HNSCC、3种OC、5种TNBC、2种PC和8种CRC。CRC由微卫星稳定(MSS)(n=6)和微卫星不稳定(MSI)(n=2)肿瘤构成。在消化之后,将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD-1进行染色,通过流式进行分析,并且如果>5e6细胞可用,则进行分选以获得PD-1$^+$细胞。使经PD-1分选的细胞经受两步过程,所述两步过程包含11天活化步骤,随后是11天快速扩增方案(REP),以获得经PD-1选择的TIL。肿瘤ID、组织学和实验命运列于表65中。流式分析的结果示出于图157中。

[2633] 所测定的所有肿瘤消化物均表达CD3群体内PD-1$^+$细胞的百分比。PD-1%是可变的并且范围为11%到78%,其中在所测定的组织学中平均值为35%。黑素瘤(n=4)和PC(n=2)产生PD-1表达的最低平均值分别为30.1%和25.8%。PD-1表达的平均百分比与观察到的那些组织学的临床应答率不相关。与对抗PD-1阻断(即,OC和PC)没有反应的组织学相比,对如黑素瘤和NSCLC等抗PD-1阻断有反应的组织学并未具有更高的PD-1水平/表达。

[2634] 在可以启动培养的所有情况下,通过PD-1$^+$细胞在体外扩增后可以获得经PD-1选择的产物(表1)。文献实例13中报告了这项研究的结果。因此,基于PD-1的表达,所有所测定的组织学是用于PD-1选择的潜在候选物。

[2635] 结论

[2636] 在所有所测定的肿瘤消化物中,PD-1在CD3细胞上表达。

[2637] 在PD-1表达中存在广泛的瘤内和瘤间变异性。

[2638] PD1表达与已证明对抗PD1疗法的应答性的组织学不相关。

[2639] 实例18参考文献

[2640] 1.Simon,S.和N.Labarriere,肿瘤特异性T细胞上的PD-1表达:免疫疗法的朋友或敌人?《肿瘤免疫学》,2017.7(1):p.e1364828。

[2641] 2.Simon,S.等人,PD-1表达条件抗原特异性库内的T细胞亲合力.《肿瘤免疫学》,

2016.5(1):p.e1104448。

[2642] 3.Ahmadzadeh,M.等人,浸润肿瘤的肿瘤抗原特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1并且是功能受损的.《血液》,2009.114(8):第1537-44页。

[2643] 4.Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2644] 5.Melssen,M.M.等人,人转移性黑素瘤中表达CD49a、CD49b和CD103的CD8 T细胞群体的形成和表型表征.《肿瘤免疫学》,2018.7(10):p.e1490855。

[2645] 6.Lee,J.等人,通过阻断PD-1途径复原耗尽的T细胞.《用于免疫病理学疾病疗法》,2015.6(1-2):第7-17页。

[2646] 7.Badoual,C.等人,表达PD-1的肿瘤浸润T细胞是HPV相关头颈癌中有利的预后生物标志物.《癌症研究》,2013.73(1):第128-38页。

[2647] 8.Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2648] 9.Kansy,B.A.等人,CD8(+)T细胞中的PD-1状态与头颈癌中的存活和抗PD-1治疗结果相关.《癌症研究》,2017.77(22):第6353-6364页。

[2649] 10.Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2650] 11.Webb,J.R.、K.Milne和B.H.Nelson,PD-1和CD103在人卵巢癌中在预后有利的上皮内CD8 T细胞上广泛共表达.《癌症免疫学研究》,2015.3(8):第926-35页。

[2651] 12.Columbus,G.阿维鲁单抗错过III期卵巢癌试验中的主要终点.2018;可从以下网站获得:https://www.onclive.com/web-exclusives/avelumab-misses-primary-endpoints-in-phase-iii-ovarian-cancer-trial。

[2652] 13.Sarniak,A.用于评估自体肿瘤浸润淋巴细胞(LN-144)用于治疗患有转移性黑素瘤的患者的功效和安全性的2期多中心研究.2018;可从以下网站获得:https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS9595。

[2653] 实例19:使用纳武单抗通过流式细胞术分选和全规模扩增来选择PD-1^{+}TIL用于临床制造

[2654] 目的

[2655] 本报告描述了来自使用纳武单抗扩增经PD-1选择的TIL的结果,用于在本实例中描述的全规模制造实验中进行选择。

[2656] 范围

[2657] 工作范围是从黑素瘤或肺或头颈或卵巢肿瘤扩增经PD-1选择的TIL。

[2658] 在第0天,将肿瘤消化物平均分配到两个组,并且使用纳武单抗或抗PD1克隆号EH12.2H7(研究级)作为初级抗体和FITC缀合的抗IgG4二级抗体对实验的每个组中的肿瘤消化物进行染色。然后通过流式分选从染色群体选择表达PD-1的TIL。使用两步扩增过程来扩增经PD-1选择的TIL,以进行全规模临床制造。从第0天到第11天进行扩增的第一步骤(“活化”)。从第11天到第22天进行扩增过程的第二步骤(“快速扩增期”或“REP”,包含在第16天的分开)。在第22天采集最终产物。

[2659] 对于小规模工艺(1/100规模),在第0天使用10%的具有最低分选结果的经PD-1选

择的TIL，并且将所述数量的TIL从每次分选转移到具有饲养细胞的相应G-Rex-10M烧瓶和具有IL-2培养基的OKT-3中来启动活化。按照TP-19-004启动REP、分开和采集。在以下方法章节中概述了相关时间点的简要解释(表67)。

[2660] 对于全规模工艺，在第0天使用具有类似细胞数的经PD-1选择的TIL，用100e6同种异体饲养细胞和30ng/mL OKT3启动活化，持续11天。从所采集的产物开始在第11天启动REP。根据IOVA制造批次记录，进行REP(第11天)以及随后的第16天(分开)和第22天(采集)的过程。以下实验设计中概述了相关时间点的简要解释(表2)。

[2661] 对经扩增的最终产物TIL的细胞生长、活力、表型和功能(IFN-γ和颗粒酶B分泌、刺激后CD107a动员)进行评估。

[2662] 对经扩增的表征数据进行另外分析，以确立EH12.2H7和纳武单抗的等效性。

[2663] 背景信息

[2664] 在实例9和实例21中提供了先前开发的方案，所述方案被设计成使用PE缀合的抗PD-1抗体(克隆号EH12.2H7)从肿瘤消化物中选择表达PD-1的TIL，以富集自体肿瘤反应性T细胞的TIL产物。

[2665] 在当前研究中，使用纳武单抗作为抗PD1抗体代替PE缀合的克隆号EH12.2H7，并且使用FITC缀合的抗IgG4抗体作为二级染色抗体，实例9和实例21适于获得经PD1选择的TIL。

[2666] 实验设计

[2667] 每个TP-19-004进行两个小规模实验和本体对照条件。

[2668] 每个实例19进行一个全规模实验。

[2669] 表67和68中提供了小规模和全规模的概述。

[2670] 表67：1/100规模中的小规模经PD-1选择的TIL工艺的概述

[2671]

条件	**1/100 规模**
活化（1/10 规模） TIL 饲养细胞 CM1 IL-2 OKT3（30 ng/mL） G-Rex	**第 0 天：**活化 10%的经 PD-1 选择的 TIL 10e6 100 mL 6000 IU/mL 30 ng/mL 10 M
REP（1/100 规模） TIL 饲养细胞 CM2 IL-2 OKT3（30 ng/mL） G-Rex	**第 11 天：**REP 10% TVC 50e6 50 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 5M
分开（1/100 规模）	**第 16 天：**体积减小和分开（TVC/10e6，向上舍入） 高达 5 × 5M 烧瓶
REP 采集（1/100 规模）	**第 22 天：**REP 采集
外推计算： 活化 REP、分开、采集	由活化采集 TVC 乘以 10 由 REP 采集乘以 100 x 分开烧瓶的数量

[2672] 表68：全规模经PD-1选择的TIL工艺的概述

[2673]

条件	全规模
活化 TIL 饲养细胞 CM1 IL-2 OKT3（30 ng/mL） G-Rex	**第 0 天：**活化 经 PD-1 选择的 TIL 100e6 1000 mL 6000 IU/mL 30 ng/mL 100MCS
REP TIL 饲养细胞 CM2 IL-2 OKT3（30 ng/mL） G-Rex	**第 11 天：**REP 5e6-200e6 TVC 5e9 5 L 3000 IU/mL 30 ng/mL 500MCS
分开	**第 16 天：**分开 在 CM4 + 3000 IU/mL 的 IL-2 中体积减小并且分开到 5 个 G-Rex500 MCS
REP 采集	**第 22 天：**采集 REP 采集

[2674] 结果

[2675] 下表69指定了根据实例19用于评估小规模(外推TVC)和全规模实验的性能的接受标准。

[2676] 表69:在工艺和采集中产物释放测试和接受标准

[2677]

测试类型	方法	接受标准
工艺中测试		
分选后纯度（PD1+%）	流式细胞术	≥ 80%
释放测试		
外观	目视检查*	袋子完好，无团块迹象
细胞活力	荧光	≥ 70%
总活细胞计数	荧光	1×10^9 到 150×10^9
纯度（CD45+CD3+%）	流式细胞术	≥ 90% CD45+CD3+细胞
IFNg（经刺激的-未经刺激的）	珠粒刺激和 ELISA	≥ 500 pg/mL

[2678] *仅适用于全规模实验。

[2679] 获得的结果

[2680] 下表70是在这项研究中使用的肿瘤和相关组织学的列表。

[2681] 表70:这项研究中使用的肿瘤

[2682]

实验	组织学	ID
经 PD-1 选择的 TIL 工艺（预期临床制造工艺）		
小规模 1	卵巢	OV8074
小规模 2	黑素瘤	M1156
全规模 1	头颈	H3046

[2683] 流式分选输出

[2684] 表71:通过流式细胞术分选前和分选后经PD-1选择的TIL的纯度。

[2685]

参数	接受标准	OV8074（纳武单抗）	OV8074（EH12.2.H7）	M1156（纳武单抗）	M1156（EH12.2.H7）	H3046（纳武单抗）	H3046（EH12.2.H7）
分选前CD3+%（FSC/BSC的，单细胞）	N/A	66	62	5	5	49	44
分选前PD-1+%（CD3+的）	N/A	80	70	90	93	14	13
分选前TVC	N/A	6.3e6	2.6e6	1.3e7	1.3e7	1.6e7	1.6e7
TVC分选的（产率%）	N/A	3.5e5（6%）	4.1e5（16%）	1.1e5（13%）	1.1e5（13%）	1e5（9%）	2.4e5（23%）
分选后PD-1$^+$富集（倍数）	N/A	1.24	1.4	1.07	1.08	6.8	7.4
*分选后纯度PD-1$^+$%（CD3+%的）	≥80%	99%	98%	96%	100%	95%	96%

[2686] *纯度是基于PD-1+%(在FSC/BSC/CD3进行门控)

[2687] 所有三个肿瘤分选后纯度(PD-1+%)均满足>80%的标准。

[2688] 活化和REP采集输出

[2689] 下表72汇总了来自两个小规模和一个全规模实验的总活细胞计数和产物属性,以及其本体对应物(在括号中指出)。

[2690] 表72:来自活化和REP的产物属性的汇总

[2691]

阶段	肿瘤ID/条件	接受标准	OV8074		M1156		H3046	
			纳武单抗染色	EH12.2H7染色	纳武单抗染色	EH12.2H7染色	纳武单抗染色	EH12.2H7染色
活化	所接种的TVC（本体[1]）	N/A	3.48e5（3.48e5）	3.48e5	1.05e5（1.05e5）	1.05e5	1.02e5（1.02e5）	1.02e5
	所采集的TVC（本体[1]）	N/A	1.03e9（1.14e9）	1.71e9	2.08e8（2.19e8）	1.50e8	1.3e8（1.37e9）	1.52e8
	扩增倍数[3]（本体）	N/A	2960（3262）	4905	1975（2079）	1427	1291（1334）	1486
	来自第0天-第11天[4]的倍增值	N/A	12	12	11	10	10	11
REP	所接种的TVC（本体[1]）	5 - 200e6[2]	2.00e8（2.00e8）	2.00e8	2.00e8（2.00e8）	1.50e8	1.32e8（2.00e8）	1.52e8
	所采集的TVC（本体[1]）	N/A	114.08e9（99e9）	95.94e9	86.82e9（105.00e9）	84.14e9	95.2e9（80.81e9）	80.98e9
	活力%	N/A	89	84	97	93	97	97
	扩增倍数[3]（本体）	N/A	570（495）	480	434（525）	559	720	612
	来自第11天-第22天[4]的倍增值	N/A	9.2	8.9	8.8	9.1	9.5	9.1
	TVC LOVO后（恢复%）	1 - 150e9	N/A[5]				88.5e9 (93%)[7]	N/A[6]
	LOVO后活力%	> 70%	N/A[5]				85	N/A[6]
	CD45+/CD3+%	> 90%	99.7	99.8	99.8	99.9	99.7	99.9
	IFNγ（pg/mL）	≥ 500	948	1547	4555	4371	2795	3130
	颗粒酶B（pg/mL）	N/A	9524	9777	41603	68354	33147	47603
	CD4+CD107A%（刺激）	N/A	49	58	34	41	37	38
	CD8+CD107A%（刺激）	N/A	82	84	85	85	66	67

[2692] [1]以上示出的本体条件TVC被外推到全规模是纳武单抗和EH12.2H7的对照

[2693] [2]基于Gen 2 REP工艺的当前建立的范围在REP处接种的5-200e6 TVC的范围，并且在此方案中不是正式接受标准

[2694] [3]扩增倍数＝所采集的TVC/所接种的TVC

[2695] [4]基于公式“＝LOG(第22天TVC/第11天TVC)/LOG(2)”计算细胞倍增

[2696] [5]批次是小规模的，没有进行LOVO

[2697] [6]单LOVO操作是可用的。选择纳武单抗条件进行LOVO处理，这表示临床制造经PD-1选择的TIL工艺。

[2698] [7]在LOVO后计数过程期间鉴定NC-200细胞计数器问题。将来自稳定性研究的解冻后恢复计数(SP-19-003)用于计算恢复%。

[2699] 过程产率：在活化结束时，使用纳武单抗或EH12染色选择的TIL产生的细胞数大于100e6(>1200扩增倍数，平均9.1次细胞倍增)，具有足够的产率来启动REP培养。

[2700] 在REP采集时，所有培养物产生>80e9 TVC。在第11天与第22天之间平均观察到9次细胞倍增。细胞倍增的数量与先前临床前实验(TP-19-004R和实例21R)观察到的结果非常

类似。

[2701] 剂量:从全规模运行(H3046),使用纳武单抗染色的最终产物剂量为88.5e9 TVC,具有85%活力和99.7%CD45+CD3+细胞。最终产物是高度富集的TIL产物。

[2702] 功能:TIL的功能性是基于用aCD3/aCD28/aCD137 Dynabeads(LAB-016)过夜刺激最终产物进行表征。刺激24小时后收集上清液并冷冻。进行ELISA以测定释放到上清液中的IFNγ和颗粒酶B的浓度。IFNγ释放满足接受标准,并且所有TIL培养物在刺激时分泌高水平的颗粒酶B。类似于在先前研究中生成的TIL产物(TP-19-004R,实例21),当用PMA/IO(CD4+和CD8+TIL两者)刺激时,来自最终产物的高分数的TIL表达CD107A。

[2703] TIL端粒长度和端粒酶活性:数据是未决的。当报告可用时,报告将被修改成包含此数据。

[2704] TIL克隆性:数据是未决的。当报告可用时,报告将被修改成包含此数据。

[2705] 经扩展的表型:表73、74和75描述了TIL的经扩展的表型分析。使用多色流式细胞术来表征REP TIL的TIL纯度、同一性、记忆亚群、活化和耗尽状态。在最终采集的TIL中存在<1%的可检测的B细胞、单核细胞或NK细胞(表7)。REP TIL主要由TCRα/β与主要是效应记忆分化组成。除了卵巢肿瘤之外,纳武单抗与EH12.2H7之间的CD8/CD4比率是相当的。CD8/CD4比率的偏度可能是由于卵巢肿瘤类型的异质性以及在选择程序中缺少CD4和CD8的选择标志物。

[2706] 表73:TIL纯度、同一性和记忆表型表征

[2707]

特性		OV8074（纳武单抗）	OV8074（EH12）	M1156（纳武单抗）	M1156（EH12）	H3046（纳武单抗）	H3046（EH12）
纯度	NK 细胞（CD3-CD56+）（%）	0.5	0.4	0.2	0.6	0.0	0.0
	B 细胞（CD3-CD19+）（%）	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	单核细胞（CD14+）（%）	0.5	0.5	0.9	0.8	0.8	0.9
同一性 T 细胞	TCRα/β（%）	97.1	95.8	98.4	97.9	98.4	98.6
	TCRγ/δ（%）	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.1
	TCRα/β+ CD4+（%）	19.0	40.7	19.7	10.0	64.7	62.0
	TCRα/β+ CD8+（%）	80.5	57.2	79.9	89.5	34.6	37.6
	TCRα/β+ CD8/CD4 比率	4.2	1.4	4.1	9.0	0.5	0.6
记忆表型 -TCRα/β+	原初：CCR7+CD45RA+（%）	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	T-EM：CCR7-CD45RA-（%）	98.4	98.2	98.6	98.2	98.4	97.1
	T-CM：CCR7+CD45RA-（%）	1.4	1.8	1.4	1.7	1.6	2.8
	T-EFF/TEMRA：CCR7-CD45RA+（%）	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0

[2708] 注意：用于TIL纯度的门控算法如下所示：

[2709] 单核细胞：活的CD14+%

[2710] NK(自然杀伤)细胞：活的CD14-、CD3-、CD56+CD16+%

[2711] B细胞：%CD14-、CD3-、CD19+%

[2712] 由于TIL的经TCR刺激的增殖，所有经PD-1选择的TIL条件示出了CD28表达的上调和CD27表达的下调。另外，所有经PD-1选择的TIL示出了具有较低KLRG1表达的分化程度较低的表型。

[2713] CD27、CD28、CD56、CD57、BTLA、CD25和CD69水平类似于使用Gen 2制造工艺产生的黑素瘤TIL的结果(表74)。

[2714] 纳武单抗与EH12.2H7选择程序之间在分化、活化和耗尽状态方面没有显著差异。

[2715] 表74：CD4+TIL的活化和耗尽状态

[2716]

特性（在活的 CD3+、CD4+上进行门控）		OV8074（纳武单抗）	OV8074（EH12）	M1156（纳武单抗）	M1156（EH12）	H3046（纳武单抗）	H3046（EH12）
分化	CD27+（%）	5.1	6.1	5.5	12.7	34.6	39.3
	CD28+（%）	99.9	99.9	99.9	99.9	100.0	100.0
	CD57+（%）	27.1	16.2	65.1	37.6	13.2	14.5
	KLRG1+（%）	12.0	19.9	41.9	31.5	3.4	6.6
活化	2B4+（%）	4.1	8.7	4.8	4.8	4.0	6.1
	BTLA4+（%）	99.4	99.7	99.8	99.7	99.9	100
	CD25+（%）	4.8	3.4	2.6	4.1	2.4	2.9
	CD69+（%）	79.4	77.0	84.6	77.3	75.9	86.9
	CD95+（%）	96.7	97.5	98.9	99.6	99.5	99.7
	CD103+（%）	0.6	0.4	1.0	0.5	1.0	1.0
耗尽	LAG3+（%）	1.9	3.0	2.7	1.4	1.6	0.9
	PD1+（%）	11.8	12.0	16.5	24.1	16.2	13.9
	TIGIT+（%）	15.0	24.0	33.3	51.7	31.4	37.6
	TIM3+（%）	11.1	20.7	36.4	26.3	18.4	19.8

[2717] 表75：CD8+TIL的活化和耗尽状态

[2718]

特性（在活的 CD3+、CD8+上进行门控）		OV8074（纳武单抗）	OV8074（EH12）	M1156（纳武单抗）	M1156（EH12）	H3046（纳武单抗）	H3046（EH12）
分化	CD27+（%）	10.3	8.7	27.2	24.5	23.1	28.1
	CD28+（%）	99.9	99.8	99.9	99.9	99.8	99.9
	CD57+（%）	39	17.7	52.8	38.7	15.5	11.8
	KLRG1+（%）	36.9	23.7	15.5	9.9	4.1	6.1
活化	2B4+（%）	3.2	3.5	2.3	2.1	4.0	4.0
	BTLA4+（%）	99.7	99.8	99.8	99.8	99.9	99.9
	CD25+（%）	0.5	0.9	0.2	0.4	0.6	0.5
	CD69+（%）	76.1	74.4	81.6	84.4	86.2	87.2
	CD95+（%）	95.3	88.7	98.9	98.5	96.5	96.6
	CD103+（%）	0.5	0.5	0.8	0.3	0.9	0.6
耗尽	LAG3+（%）	0.6	1.8	1.9	0.9	1.5	0.9
	PD1+（%）	12.1	4.7	11.7	14.6	7.6	10
	TIGIT+（%）	51.6	42.7	78.7	85.5	17	19.8
	TIM3+（%）	15.3	22.1	27.3	49.1	21	16.2

[2719] 表76：CD27、CD28、CD56、CD57、BTLA、CD25和CD69在CD3+的表达

[2720]

特性（在活的 CD3+上进行门控）	来自黑素瘤的历史值（范围）	OV8074（纳武单抗）	OV8074（EH12）	M1156（纳武单抗）	M1156（EH12）	H3046（纳武单抗）	H3046（EH12）
CD27+（%）							
CD28+（%）							
CD56+（%）							
CD57+（%）							
BTLA+（%）							
CD25+（%）							
CD69+（%）							

[2721] 对表型表征数据进行另外分析，以建立EH12.2H7和纳武单抗的等效性。

[2722] 通过流式细胞术评估使用EH12.2H7和纳武单抗获得PD-1$^+$TIL生成的经PD-1选择的TIL的CD4、CD8、CCR7、CD45RA、和PD-1的表达。在使用纳武单抗和EH12.2H7衍生的经PD-1选择的CD4和CD8的表达中没有观察到显著差异。对于三种所测定的肿瘤，相对于CD4$^+$ T细胞，两种TIL产物都产生更高比例的CD8$^+$ T细胞(图1)。在三种经PD-1选择的TIL产物中CD4和CD8表达的相似性表明，与EH12.2H7相比，使用纳武单抗选择PD-1+并未改变CD4/CD8的比率。参见图159。

[2723] 像T细胞谱系一样，TIL的记忆状态在使用EH12.2H7和纳武单抗生成的经PD-1选择的TIL中是类似的。TIL群体主要由使用类似于Iovance的LN-145研究产物的纳武单抗和EH12.2H7生成的效应记忆T细胞经PD-1选择的TIL构成，这表明使用任一抗PD-1克隆选择PD-1并未使TIL的记忆表型偏斜(图160)。

[2724] 为了评估培养后PD-1表达是否类似地减少，在扩增前和扩增后评估使用纳武单抗和EH12.2H7生成的经PD-1选择的TIL。分选后，在两种新鲜分选的TIL制剂中PD-1+TIL的百分比接近100％(表71)。在使用EH12.2H7和纳武单抗生成的PD-1选择中，PD-1的表达在扩增后显著并且相对地减少(图161)。如所预测的，扩增后PD-1表达的减少表明在使用EH12.2H7和纳武单抗的经PD-1+分选的TIL中先前高的PD-1表达子随着扩增而回复到主要是PD-1-。

[2725] 从EH12.2H7和纳武单抗分选的PD-1+TIL生成的经PD-1选择的TIL的功能表征。

[2726] 为了评估使用纳武单抗衍生的经扩增的PD-1+TIL是否与使用EH12.2H7克隆衍生的TIL具有类似功能，将来自3个肿瘤的经PD-1选择的TIL用αCD3/αCD28/α41BB活化珠粒非特异性刺激并且评估IFNγ和颗粒酶B分泌。响应于刺激，纳武单抗和EH12.2H7衍生的经PD-1选择的TIL产生类似水平的IFNγ和颗粒酶B(图161)。使用纳武单抗和EH12.2H7生成的经PD-1选择的TIL响应于非特异性刺激(αCD3/αCD28/αCD137珠粒)分泌可观水平的IFNγ和颗粒酶B，这表明所选的TIL在扩增后具有高度功能性。

[2727] 信息

[2728] 在第0天，由于物流问题，实例无法接收到新鲜肿瘤。使用冷冻的肿瘤消化物代替新鲜肿瘤进行所有实验。来自研究性学习的数据表明，当测试新鲜或冷冻肿瘤时，PD-1表达没有差异。

[2729] 结论和建议

[2730] 以全规模开发经PD-1选择的TIL工艺，以在22天内将PD-1+TIL扩增到>80e9。在开发规模下制造的所有六个批次(纳武单抗和EH12染色方法两者，2个全规模和4个小规模)满足释放参数的接受标准。

[2731] 表77:汇总表:

[2732]

测试参数	接受标准	OV8074（纳武单抗）	OV8074（EH12）	M1156（纳武单抗）	M1156（EH12）	H3046（纳武单抗）	H3046（EH12）
外观	袋子完好，无团块迹象	NA	NA	NA	NA	合格	合格
细胞活力	≥ 70%	合格	合格	合格	合格	合格	合格
总活细胞计数	1 × 10e9 到 150 × 10e9	合格	合格	合格	合格	合格	合格
同一性（CD45+/CD3+%）	> 90% CD45+CD3+ 细胞	合格	合格	合格	合格	合格	合格
IFNγ（经刺激的-未经刺激的）	≥ 500 pg/mL	合格	合格	合格	合格	合格	合格

[2733] NA,不适用,以小规模采集细胞

[2734] 总体而言,本实例证明了使用纳武单抗从经PD-1分选的TIL生成的经PD-1选择的TIL与使用EH12.2H7克隆生成的TIL是相当的,从而支持在临床制造中使用纳武单抗进行PD-1选择。还参见图162、163和164。

[2735] 实例20:PD-1非临床研究的概述

[2736] 非临床概述

[2737] 介绍

[2738] 在本实例中描述的TIL是自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的制剂,所述自体肿瘤浸润淋巴细胞已经基于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)生物标志物的表达进行选择。因此,TIL是其中选择具有更高PD-1表达的TIL细胞用于离体扩增的子集。贯穿实例描述的制造工艺提供了一种制造方法,其中在其离体扩增之前使用流式细胞术从本体TIL群体中选择PD-1阳性(PD-1^{+})T细胞。已经表征了所得TIL并且在以下汇总的离体研究中证明了活性。可以使用如实例和本申请中描述的过继性细胞转移(ACT)的TIL方案向患者施用这种TIL。

[2739] 本实例汇总了支持2期临床试验的非临床数据,所述临床试验将研究TIL在患有头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的患者中的安全性和初步功效。TIL产物是患者特异性的,并且不跨物种起作用,因此无法在传统的非临床药理学、药代动力学和毒理学研究中进行测试。待包含在TIL治疗方案中的其它药剂(IL-2、环磷酰胺和氟达拉滨)的非临床和临床安全性得到很好地表征。

[2740] 表78列出了由Iovance进行的用于支持经扩增的TIL产物的临床研究的非临床研究。这些研究的报告提供于以上实例中。

[2741] 表78:非临床研究列表

[2742]

报告标题	目的	报告编号
在肿瘤消化物中表达 PD-1 的细胞	评估 PD-1$^+$ TIL 跨多种癌症类型的患病率。	实例 18
经 PD-1 选择的 TIL 的扩增	为了证明使用 Iovance 的方法将经 PD-1 选择的 TIL 扩增到足够的细胞数的可行性。	实例 13
经 PD-1 选择的 TIL 的表型表征	为了表征经 PD1 选择的 TIL 的表型。	实例 16
TCR 库经 PD-1 选择的 TIL 的分析	为了对经 PD-1 选择的和未经选择的 TIL 产物的 TCR 库进行比较。	实例 11
在经 PD-1 选择的 TIL 中的自体肿瘤-反应性	为了证明经 PD-1 选择的 TIL 的肿瘤特异性。	实例 15
EH12.2H7 抗体和纳武单抗用于选择 PD1$^+$ TIL 的可比性研究	为了建立研究的等效性和针对经 PD-1 选择的 GMP 抗体	实例 19

[2743] 非临床药理学

[2744] 在离体扩增之前在TIL制造工艺中选择PD-1$^+$TIL应富集新抗原特异性T细胞,同时保留TIL多样性,并且因此展现出识别肿瘤新抗原阵列的潜力。这种策略代表了进一步优化在治疗中使用的TIL制造工艺的有吸引力的手段。基于以下汇总的非临床研究,已经开发了可靠地生成高功能性经PD-1选择的TIL产物的制造方法。

[2745] 将针对复发/难治性HNSCC(一种难以治疗的恶性肿瘤)的治疗检查经PD-1选择的TIL产物,针对其已经关于PD-1$^+$细胞水平与临床结果之间的相关性进行了研究(Badoual等人,2013)。

[2746] 非临床研究

[2747] 经PD-1选择的TIL产物已经针对其组成和离体抗肿瘤活性进行了广泛表征。这些分析之前是用于浸润PD-1$^+$ T细胞的多种肿瘤类型的调查和对分选的PD-1$^+$TIL的扩增过程的测试。使用研究级PD-1特异性单克隆抗体(克隆EH12.2H7)进行所有非临床研究,用于检测和选择PD-1$^+$TIL。因此,进行桥接研究以建立EH12.2H7与纳武单抗、用于生产TIL产物(参见,实例19)的抗PD-1单克隆抗体的可比性。总体而言,这项工作证明经PD-1选择的TIL是从多种肿瘤组织学制备的;其在表型上类似于未经选择的TIL;并且其展示出许多与新抗原特异性相关的性状,包含最初降低的增殖能力和重要地,肿瘤反应性。

[2748] PD-1$^+$TIL跨多种癌症类型的患病率(报告编号:实例18)。

[2749] 在来自若干癌症组织学的多个肿瘤样品中评估PD-1$^+$淋巴细胞的存在。在以下组织学中评估了总共34个肿瘤:黑素瘤(n=4)、非小细胞癌(NSCLC)(n=7)、头部和HNSCC(n=5)、OC(n=3)、TNBC(n=4)、PC(n=2)和CRC(n=8)。CRC的样本包含微卫星稳定(MSS)肿瘤(n=6)和具有微卫星不稳定性(MSI)的肿瘤(n=2)。

[2750] 使用酶消化将肿瘤样品解离,并且将所得单细胞悬浮液的一部分针对PD-1进行染色并且通过流式细胞术进行分析。流式分析研究的结果汇总在图165中。

[2751] 所测定的所有肿瘤消化物均在CD3$^+$细胞群体内含有相当大部分的PD-1$^+$细胞。PD-1$^+$细胞的百分比是可变的并且范围为11%到78%,其中在所测定的组织学中平均值为35%。黑素瘤(n=4)和PC(n=2)产生PD-1表达的最低平均值分别为27%和21%。与其它组织学(即,OC和PC)相比,已经显示临床上对抗PD-1阻断(如黑素瘤和NSCLC)有反应的组织学并未具有更高的PD-1水平/表达。

[2752] 重要的是,经PD-1选择的产物可以在分选之前存在大于2×10^6个细胞的所有情况下在PD-1^+细胞的离体扩增后获得,这在所检查的组织学中的13个肿瘤样品中的12个中实现。在实例13中讨论了这项研究的结果。因此,基于TIL对PD-1的表达,所有所测定的组织学是制备TIL产物的潜在候选物。

[2753] 经PD-1选择的TIL的增殖能力(实例13)

[2754] PD-1^+细胞已经显示细胞因子产生受损和增殖减少[3、4]。PD-1或其配体PD-L1的体内阻断可以恢复那些细胞的功能性以触发抗肿瘤应答(Schmacher等人,2015;Shang等人,2018)。测试了在PD-1^+细胞中观察到的缺陷是否可以通过从免疫抑制性微环境中置换细胞并且在存在抗CD3和同种异体饲养细胞的情况下离体扩增细胞来逆转,如若干出版物中描述的(Inozume等人,2010;Thommen等人,2018)。

[2755] 为了确定经PD-1选择的TIL是否可以离体扩增到高数,使来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的经PD-1分选的TIL经受由两步方案组成的过程,所述两步方案由11天活化步骤,随后是11天快速扩增方案(REP)组成,并且对扩增倍数进行评估。将在类似条件下从全肿瘤消化物中扩增的匹配的未经选择的TIL用作对照。

[2756] 与未经选择的TIL相比,经PD-1选择的TIL的增殖能力最初降低,从而导致在活化步骤中较低水平的扩增。活化步骤中的经PD-1选择的TIL的平均扩增倍数为833,而未经选择的TIL的平均扩增倍数为2650。然而,在REP步骤中,分别针对经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL计算1308和1418的可比较的平均扩增倍数(图166)。

[2757] 在经PD-1选择的TIL中的活化步骤中的延迟扩增在13个配对样品中的9个中产生较低的总活细胞产率(表79)。由于REP是在小规模下进行的,因此基于REP的扩增倍数和活化步骤中的总细胞产率估计在制造规模上可实现的细胞计数(即,外推细胞计数=REP扩增倍数*活化总活细胞产率)。值得注意的是,这些外推的数字可能低估了潜在的总产率,因为仅一部分的细胞消化物用于PD-1分选。

[2758] 经PD-1选择的TIL的外推的细胞产率的范围介于2.32×10^7到209×10^9之间,其中平均细胞产率为47.46×10^9个细胞。重要的是,从经PD-1选择的TIL扩增的13种培养物中的12种在REP之后产生的总细胞计数在针对LN-145研究产物指定的范围内(1×10^9到150×10^9个总活细胞)。

[2759] 表79:在经PD-1选择的TIL中的最终产物产率

[2760]

肿瘤 ID	样品 ID	组织学	接种细胞的数量	活化扩增倍数	REP 扩增倍数	外推产率（细胞数× 10^9）
H3035	经 PD-1 选择的 TIL	HNSCC	11,000	349.63	2165.75	8.29
	未经选择的 TIL			868.91	1385.80	13.2
H3039	经 PD-1 选择的 TIL	HNSCC	13,500	654.44	1082.50	9.56
	未经选择的 TIL			122.75	893.20	1.48
L4089	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	8,134	1502.92	1416.93	16.9
	未经选择的 TIL			2820.88	2106.80	48.3
L4096	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	8,000	581.75	788.10	3.67
	未经选择的 TIL			1749.00	919.20	12.9
L4097	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	47,000	229.51	2455.30	26.5
	未经选择的 TIL			1146.81	1982.40	107
L4100	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	33,000	536.45	996.60	17.6
	未经选择的 TIL			1498.09	899.50	44.5
L4101	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	99,000	1346.46	895.90	209
	未经选择的 TIL			2196.11	962.20	119
L4104	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	70,000	1711.00	1256.60	151
	未经选择的 TIL			649.16	1421.00	64.6
L4106	经 PD-1 选择的 TIL	NSCLC	18,200	1178.57	1366.80	29.3
	未经选择的 TIL			4500.00	1912.85	157
M1132	经 PD-1 选择的 TIL	黑素瘤	2,000	49.68	233.70	0.0232
	未经选择的 TIL			26705.00	1262.95	67.5
M1136	经 PD-1 选择的 TIL	黑素瘤	23,500	960.77	867.20	19.6
	未经选择的 TIL			692.94	1190.40	19.4
M1139	经 PD-1 选择的 TIL	黑素瘤	10,200	556.57	1750.53	9.94
	未经选择的 TIL			4907.79	1612.50	80.7
M1141	经 PD-1 选择的 TIL	黑素瘤	22,400	3428.57	1514.75	116
	未经选择的 TIL			4950.00	2107.00	234

[2761] 图例：使用由11天活化步骤，随后是11天REP组成的22天过程扩增来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的经PD-1分选和未经选择的TIL。示出了所接种的$CD3^+$细胞的数量、扩增倍数和外推的细胞计数。

[2762] 总之，在活化步骤期间$PD\text{-}1^+$TIL的增殖能力降低并不能阻止经PD-1选择的TIL产物达到最终产物中的高细胞计数。事实上，使用预期的扩增TIL产物制造工艺，13种制剂中的12种产生了$>1\times10^9$个总活细胞。这些产率完全在针对标准LN-145研究产物的释放所指定的那些之内。

[2763] 经PD-1选择的TIL的表型表征(实例16)

[2764] 通过流式细胞术进行表型分析，以表征T细胞谱系和记忆亚群的细胞表面标志物的表达。另外，在经PD-1选择的TIL中评估PD-1水平。将来自4个黑素瘤、7个NSCLC和2个HNSCC肿瘤样品的13种匹配的经PD-1选择的和未经选择的TIL产物的相同样品集用活/死标志物进行染色，随后针对多种标志物进行抗体染色。CD4、CD8、CCR7、CD45RA和PD-1的结果呈现于图167、168和169中。在完整的报告实例16中可以找到关于另外的活化、耗尽、分化和组织驻留标志物的更详细的结果。

[2765] 经PD-1选择的TIL中的CD4和CD8表达

[2766] PD-1大部分已经在$CD8^+$ T细胞中表征，尽管其在$CD4^+$和$CD8^+$谱系两者中均有表达

(Ahmadzadeh等人,2009;Inozume等人,2010)。为了确定选择和扩增PD-1$^+$细胞是否改变CD4$^+$和CD8$^+$细胞的比例,评估最终经PD-1选择的和未经选择的TIL产物的CD4和CD8的细胞表面表达。

[2767] 在经PD-1选择的和未经选择的TIL产物中CD4和CD8的表达没有显著差异(167)。CD4$^+$和CD8$^+$ T细胞的比例在样品和组织学上是可变的(报告实例16,但总体而言,相对于CD8$^+$ T细胞,两种TIL产物均产生更高比例的CD4$^+$ T细胞)。

[2768] 跨多种经PD-1选择的和匹配的未经选择的TIL产物的CD4和CD8表达的相似性表明PD-1的分选不会改变最终扩增产物的T细胞谱系。

[2769] 经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL中的记忆T细胞群体

[2770] 所发表的研究已经表明,PD-1$^+$TIL主要包含效应记忆T细胞(TEM)(Fernandez-Poma等人,2017;Kansy等人,2017)。此外,已经显示这些TEM表示证明具有临床活性的未经选择的TIL产物的主要群体(Gros等人,2014)。通常使用以下标志物来区分T细胞记忆亚群:

[2771] • 效应记忆T细胞(TEM):CD45RA$^-$和CCR7$^-$;

[2772] • 中央记忆T细胞(TCM):CD45RA$^-$和CCR7$^+$;

[2773] • 原初/干细胞记忆T细胞(TSCM):CD45RA$^+$和CCR7$^+$;以及

[2774] • 效应T细胞(TEMRA):CD45RA$^+$和CCR7$^-$(Golubovskaya和Wu,2016)。

[2775] 为了确定经PD-1选择的TIL是否主要包含TEM,针对CD45RA和CCR7表达评估源自12个独特肿瘤样品的经PD-1选择的和匹配的未经选择的TIL产物,以定义以上指示的单独的记忆亚群。

[2776] 经PD-1选择的和未经选择的TIL产物由类似比例的各种记忆T细胞亚群构成,其中TEM细胞表示每种产物内的大多数细胞(图168)。

[2777] 鉴于与记忆相关的表型标志物的类似表达,在扩增之前选择PD-1似乎不会改变TIL产物中记忆T细胞亚群的相对比例。值得注意的是,经PD-1选择的TIL的记忆T细胞亚群谱非常类似于LN-145的记忆T细胞亚群谱。

[2778] PD-1在经PD-1选择的和未经选择的TIL中的表达

[2779] 已经显示扩增的PD-1$^+$TIL中的PD-1表达随着离体培养和扩增而降低,这被认为是TIL复原的迹象(Inozume等人,2010;Thommen等人,2018)。

[2780] 为了确定PD-1表达是否随着扩增而改变,分析了源自12个独特肿瘤样品的经PD-1选择的和匹配的未经选择的TIL产物在扩增前后的PD-1的表达。

[2781] 在扩增之前,未经选择的TIL中PD-1$^+$细胞的百分比表示全肿瘤消化物中表达PD-1的细胞群体(平均为37.3%)。如所预期的,分选PD-1$^+$细胞导致高纯度PD-1$^+$群体,其中平均分选纯度为92.8%。在扩增后,相对于扩增前的PD-1水平,PD-1表达在经PD-1选择的和未经选择的TIL产物中显著降低。在经PD-1选择的和未经选择的TIL制剂两者中均观察到PD-1$^+$细胞的比例减少3倍以上(图169)。

[2782] 还评估了经PD-1选择的和未经选择的TIL的与耗尽相关的另外的共抑制受体的表达。经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL表达类似的TIM3、LAG3和CD101水平(实例16)。

[2783] 在原位表达高水平的PD-1的TIL中PD-1表达的显著降低表明这些细胞随着扩增而回复到PD-1$^-$T细胞,并且因此在输注时不太可能通过PD-1/PD-L1轴被抑制。

[2784] 总之,经PD-1选择的TIL的表型分析揭示了主要由具有低PD-1表达的TEM细胞构成

的产物,这表明这些细胞在离体扩增后被复原。

[2785] 经PD-1选择的TIL的TCR库(实例11)

[2786] 在NSCLC中的研究调查了指定为PD-1^{T}(“肿瘤相关PD-1”,即,超过在健康供体的PBMC上观察到的那些的PD-1水平)的表达PD-1的TIL克隆是否与PD-1^{-}TIL共享。尽管可以观察到克隆的一些重叠,但是PD-1^{T} TIL中的主要TCR不存在于PD-1^{-}亚群中(Thommen等人,2018)。TCRvβ克隆在PD-1^{T}和PD-1^{-}TIL中的低程度的克隆型共享表明离体生成的产物含有具有不同抗原特异性的TCR。

[2787] 预期在TIL的离体扩增期之前进行的PD-1选择步骤会导致TIL产物富集肿瘤特异性T细胞。为了确定扩增的经PD-1分选的TIL是否生成不同的产物,将经PD-1选择的和未经选择的TIL针对其TCRvβ组成进行比较。为此,评估存在于经PD-1选择的TIL产物中的前10个TCRvβ克隆在对应匹配的未经选择的TIL产物内的表示。

[2788] 在所有配对的TIL产物中,大多数高度代表的经PD-1选择的TIL克隆以显著降低的水平存在,或在匹配的未经选择的产物中未检测到(图170)。

[2789] 经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL产物含有不同的高频TCR。因此,预期这两种产物在T细胞反应性的离体测试中展现出可测量的差异。

[2790] 总而言之,结果证明PD-1选择步骤如何改变扩增的TIL产物的组成并且表明所得经PD-1选择的TIL可以极大地富集潜在肿瘤反应性的特定TCRvβ库。

[2791] 经PD-1选择的TIL的肿瘤反应性增加(实例15)

[2792] 所发表的小鼠和人类两者的数据已经证明,PD-1在肿瘤内的T细胞上的表达可以鉴定肿瘤反应性淋巴细胞(包含肿瘤新抗原特异性淋巴细胞)的库(Donia等人,2017;Fernandez-Poma等人,2017;Gros等人,2014;Inozume等人,2010;Jing等人,2017;Thommen等人,2018)。在这些研究中,在与自体肿瘤细胞共培养时测试离体扩增的纯化的PD-1^{+}TIL的肿瘤反应性,并且与PD-1^{-}TIL相比,显示PD1^{+}TIL分泌显著更大量的IFNγ。

[2793] 基于这些研究,选择用于表达PD-1表达的TIL预期富集肿瘤/新抗原特异性T细胞,当离体评估时其应表现出更大的自体肿瘤反应性。

[2794] 经PD-1选择的TIL中的肿瘤反应性

[2795] 为了评估TIL肿瘤反应性,在与自体肿瘤消化物共培养时通过ELISA测量IFNγ的释放。

[2796] 在所评估的10对经PD-1选择的和未经选择的TIL产物中(对应于本概述的焦点的13个肿瘤样品中的5个,补充有5个最近获得的样品),7个在与自体肿瘤消化物共培养时产生可检测量的IFNγ。在共培养时,三对(2对卵巢和1对TNBC)在任何条件下都不产生IFNγ。在7种可评估的共培养物中,经PD-1选择的TIL产生的IFNγ水平显著高于其未经选择的对应物,平均高4.57倍(1.22到11.65)(图171)。对于7种有反应的经PD-1选择的TIL中的5种,这种增加的反应性是抗原特异性的,如通过在HLAI类阻断后IFNγ产生的减少所证明的。如图所示,阳性值反映HLA特异性抗肿瘤应答,而无效或阴性值反映非特异性应答。

[2797] 因此,选择表达PD-1的TIL导致TIL产物富集肿瘤反应性T细胞。

[2798] 在存在自体肿瘤的情况下IFNγ产生的增强表明当在ACT背景内向患者施用时,相对于未经选择的TIL,经PD1选择的TIL可能具有更大的抗肿瘤作用的潜力。ACT中的临床功效与肿瘤特异性TIL的存在直接相关。因此,通过PD-1选择和扩增来富集肿瘤特异性TIL可

以增强TIL在向患者施用时启动有效且高效的抗肿瘤作用的能力。

[2799] 自体肿瘤细胞杀伤

[2800] 评估十个匹配的经PD-1选择的TIL和未经选择的TIL的自体肿瘤杀伤。通过xCELLigence实时细胞分析测定量化肿瘤细胞溶解，所述测定监测肿瘤细胞分离作为肿瘤细胞死亡的量度(Peper等人,2014)。

[2801] 在所评估的10个肿瘤中，由于肿瘤细胞粘附差和活力低，因此可以评估仅1个黑素瘤的肿瘤细胞溶解。使用肿瘤细胞指数估计肿瘤细胞溶解，所述肿瘤细胞指数是在细胞附着或从其分离时板阻抗的量度。如果在共培养期间的任何时间细胞指数下降到零以下，则不能计算所述样品的细胞溶解。在所测试的10个肿瘤中的9个肿瘤中，细胞指数下降到零以下，从而导致无法适当地评估肿瘤细胞溶解。

[2802] 在可评估的肿瘤中，与未经选择的TIL相比，经PD-1选择的TIL展现出更大的杀伤自体肿瘤的能力，如通过细胞指数(反映当增加时的细胞增殖和当减少时的细胞分离/死亡的参数)的更大下降以及更高的细胞溶解百分比所确定的(图172)。

[2803] 此分析的结果显示，当与未经选择的对应物相比时，经PD-1选择的TIL具有更大的杀伤自体肿瘤的能力。这一结果与新鲜分离的和离体扩增的PD-1^{+}TIL两者的抗肿瘤活性优于PD-1^{-}TIL的抗肿瘤活性的所发表报告一致(Gros等人,2014;Inozume等人,2010)。对于从NSCLC分离的PD-1^{+}TIL进行了类似的观察，表明此发现不是黑素瘤特异性的(Thommen等人,2018)。

[2804] EH12.2H7和纳武单抗用于选择PD-1^{+}TIL的等效性(实例19)

[2805] 为了建立等效性，比较了源自使用研究(EH12.2H7)和GMP(纳武单抗)抗PD-1单克隆抗体分选PD-1^{+}的经PD-1选择的TIL。使用EH12.2H7或纳武单抗对三个肿瘤消化物(1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC)进行染色，以鉴定PD-1^{+}群体。使用两步过程扩增纳武单抗和EH12.2H7分选的PD-1^{+}细胞，所述两步过程包含11天活化步骤和11天REP，总共22天。

[2806] 总体而言，这项工作证明了使用纳武单抗从PD-1分选的TIL生成的经PD-1选择的TIL与使用EH12.2H7克隆生成的TIL是相当的，从而支持使用纳武单抗在制造扩增的TIL产物研究产物中进行PD-1选择。

[2807] 使用纳武单抗和EH12.2H7离体扩增经PD-1分选的TIL

[2808] 为了确定使用纳武单抗和EH12.2H7生成的经PD-1选择的TIL是否类似地增殖，使来自1个卵巢、1个黑素瘤和1个HNSCC的经PD-1分选的TIL经受11天活化步骤，随后是11天REP，并且评估产率和扩增。

[2809] 用EH12.2H7和纳武单抗染色的肿瘤消化物表达类似水平的CD3^{+}PD-1^{+}细胞并且在流式细胞仪上表现为不可区分的点图(图172和表79)。当对两个TIL群体进行比较时，活化步骤和REP中的扩增倍数以及总外推的/实际的细胞产率类似。

[2810] 总之，EH12.2H7和纳武单抗在肿瘤消化物中鉴定出类似百分比的PD-1^{+}细胞。三个纳武单抗和EH12.2H7染色的肿瘤样品中的TIL扩增倍数和总外推细胞计数是相当的。

[2811] 使用用于PD-1^{+}分选的EH12.2H7和纳武单抗生成的经PD-1选择的TIL的表型表征

[2812] 通过流式细胞术评估使用EH12.2H7和纳武单抗获得PD-1^{+}TIL生成的经PD-1选择的TIL的CD4、CD8、CCR7、CD45RA、和PD-1的表达。在实例19中可以看到更广泛的表型评估。

[2813] 在使用纳武单抗和EH12.2H7衍生的经PD-1选择的CD4和CD8的表达中没有观察到

显著差异。对于三种所测定的肿瘤，相对于$CD4^+$ T细胞，两种TIL产物都产生更高比例的$CD8^+$ T细胞(图174)。

[2814] 在三种经PD-1选择的TIL产物中CD4和CD8表达的相似性表明，与EH12.2H7相比，使用纳武单抗选择$PD\text{-}1^+$并未改变CD4/CD8的比率。

[2815] 像T细胞谱系一样，TIL的记忆状态在使用EH12.2H7和纳武单抗生成的经PD-1选择的TIL中是类似的。TIL群体主要由效应记忆T细胞构成(图175)。

[2816] 使用纳武单抗和EH12.2H7生成的经PD-1选择的TIL类似于LN-145研究产物，这表明使用任一抗PD-1克隆选择PD-1并未使TIL的记忆表型偏斜。

[2817] 为了评估培养后PD-1表达是否类似地减少，在扩增前和扩增后评估使用纳武单抗和EH12.2H7生成的经PD-1选择的TIL。分选后，在两种新鲜分选的TIL制剂中$PD\text{-}1^+$TIL的百分比接近100％(表79)。在使用EH12.2H7和纳武单抗生成的PD-1选择中，PD-1的表达在扩增后显著并且相对地减少(图176)。

[2818] 如图169中所讨论的，扩增后PD-1表达的减少证实使用EH12.2H7和纳武单抗的经$PD\text{-}1^+$分选的TIL随着扩增而主要回复到$PD\text{-}1^-$。从EH12.2H7和纳武单抗分选的$PD\text{-}1^+$TIL生成的经PD-1选择的TIL的功能表征。

[2819] 为了评估使用纳武单抗衍生的经扩增的$PD\text{-}1^+$TIL是否与使用EH12.2H7克隆衍生的TIL具有类似功能，将来自3个肿瘤的经PD-1选择的TIL用αCD3/αCD28/α41BB活化珠粒非特异性刺激并且评估IFNγ和颗粒酶B分泌。

[2820] 响应于刺激，纳武单抗和EH12.2H7衍生的经PD-1选择的TIL产生类似水平的IFNγ和颗粒酶B(图177)。

[2821] 使用纳武单抗和EH12.2H7生成的经PD-1选择的TIL响应于非特异性刺激(αCD3/αCD28/αCD137珠粒)分泌可观水平的IFNγ和颗粒酶B，这表明所选的TIL在扩增后具有高度功能性。

[2822] 结论

[2823] 总之，从所测试的所有34个肿瘤样本获得$PD\text{-}1^+$TIL，所述肿瘤样本包含CRC、NSCLC、HNSCC、TNBC、黑素瘤、OC和PC的样品。表达高水平PD-1的TIL的百分比在给定的肿瘤类型内是可变的，并且跨肿瘤类型与对抗PD-1疗法的已知临床应答性不相关。

[2824] 重要的是，离体扩增后，经PD-1选择的TIL的预测产率完全在针对LN-145研究产物指定的临床剂量范围内。此外，经扩增的PD-1选择的TIL的表型类似于匹配的未经选择的TIL产物，以及由LN-145产物展示的表型，但是经PD-1选择的TIL产物保持低到中等水平的PD-1表达。

[2825] 最后，当与匹配的未经选择的TIL相比时，经PD-1选择的TIL产物表现出优异的自体肿瘤反应性和肿瘤细胞杀伤。这一观察结果与在经PD-1选择的产物中发现的最普遍的TCRvβ序列相对于这些序列在匹配的未经选择的TIL产物中的水平的显著富集一致。由于所发表的研究表明从肿瘤获得的新抗原反应性T细胞表达PD-1(6、8)，因此预期肿瘤反应性会增强。

[2826] 针对经PD-1选择的TIL的汇总的非临床研究有力地支持实体瘤的ACT的经扩增的TIL产物的临床开发。

[2827] 实例20的参考文献

[2828] Ahmadzadeh M、Johnson LA、Heemskerk B、Wunderlich JR、Dudley ME、White DE和Rosenberg SA(2009),浸润肿瘤的肿瘤抗原特异性CD8 T细胞表达高水平的PD-1并且是功能受损的.《血液》114:1537-1544。

[2829] Badoual C、Hans S、Merillon N、Van Ryswick C、Ravel P、Benhamouda N、Levionnois E、Nizard M、Si-Mohamed A、Besnier N、Gey A、Rotem-Yehudar R、Pere H、Tran T、Guerin CL、Chauvat A、Dransart E、Alanio C、Albert S、Barry B、Sandoval F、Quintin-Colonna F、Bruneval P、Fridman WH、Lemoine FM、Oudard S、Johannes L、Olive D、Brasnu D和Tartour E(2013),表达PD-1的肿瘤浸润T细胞是HPV相关头颈癌中有利的预后生物标志物.《癌症研究》73:128-138。

[2830] Barber DL、Wherry EJ、Masopust D、Zhu B、Allison JP、Sharpe AH、Freeman GJ和Ahmed R(2006),在慢性病毒感染期间在耗尽的CD8 T细胞中的恢复功能(Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection).《自然》439:682-687。

[2831] Chikuma S、Terawaki S、Hayashi T、Nabeshima R、Yoshida T、Shibayama S、Okazaki T和Honjo T(2009),PD-1介导的IL-2产生的抑制在体内诱导CD8+ T细胞无反应性(PD-1-mediated suppression of IL-2production induces CD8+T cell anergy in vivo).《免疫学杂志》182:6682-6689。

[2832] Donia M、Kjeldsen JW、Andersen R、Westergaard MCW、Bianchi V、Legut M、Attaf M、Szomolay B、Ott S、Dolton G、Lyngaa R、Hadrup SR、Sewell AK和Svane IM(2017),PD-1(+)多功能T细胞在癌症的肿瘤浸润淋巴细胞疗法后支配外周.《临床癌症研究》23:5779-5788。

[2833] Fernandez-Poma SM、Salas-Benito D、Lozano T、Casares N、Riezu-Boj JI、Mancheno U、Elizalde E、Alignani D、Zubeldia N、Otano I、Conde E、Sarobe P、Lasarte JJ和Hervas-Stubbs S(2017),表达PD-1的肿瘤浸润CD8(+)T细胞的扩增改善了过继性T细胞疗法的功效.《癌症研究》77:3672-3684。

[2834] Geukes Foppen MH、Donia M、Svane IM和Haanen JB(2015),用于治疗转移性癌症的肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer).《分子肿瘤学》9:1918-1935。

[2835] Golubovskaya V和Wu L(2016),T细胞、记忆、效应子功能和CAR-T免疫疗法的不同亚群.《癌症》(巴塞尔)8。

[2836] Gros A、Robbins PF、Yao X、Li YF、Turcotte S、Tran E、Wunderlich JR、Mixon A、Farid S、Dudley ME、Hanada K、Almeida JR、Darko S、Douek DC、Yang JC和Rosenberg SA(2014),PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》124:2246-2259。

[2837] Inozume T、Hanada K、Wang QJ、Ahmadzadeh M、Wunderlich JR、Rosenberg SA和Yang JC(2010),在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》33:956-964。

[2838] Jing W、Gershan JA、Blitzer GC、Palen K、Weber J、McOlash L、Riese M和Johnson BD(2017),使用PD-1(+)骨髓瘤反应性T细胞的过继性细胞疗法消除了小鼠中确立

的骨髓瘤.《免疫治疗学癌症杂志》5:51。

[2839] Kansy BA、Concha-Benavente F、Srivastava RM、Jie HB、Shayan G、Lei Y、Moskovitz J、Moy J、Li J、Brandau S、Lang S、Schmitt NC、Freeman GJ、Gooding WE、Clump DA和Ferris RL(2017),CD8(+)T细胞中的PD-1状态与头颈癌中的存活和抗PD-1治疗结果相关.《癌症研究》77:6353-6364。

[2840] McGranahan N、Furness AJ、Rosenthal R、Ramskov S、Lyngaa R、Saini SK、Jamal-Hanjani M、Wilson GA、Birkbak NJ、Hiley CT、Watkins TB、Shafi S、Murugaesu N、Mitter R、Akarca AU、Linares J、Marafioti T、Henry JY、Van Allen EM、Miao D、Schilling B、Schadendorf D、Garraway LA、Makarov V、Rizvi NA、Snyder A、Hellmann MD、Merghoub T、Wolchok JD、Shukla SA、Wu CJ、Peggs KS、Chan TA、Hadrup SR、Quezada SA和Swanton C(2016),克隆新抗原引发T细胞免疫反应性和对免疫检查点阻断的敏感性.《科学》351:1463-1469。

[2841] Peper JK、Schuster H、Loffler MW、Schmid-Horch B、Rammensee HG和Stevanovic S(2014),用于实时和无标记评估T细胞介导的粘附细胞杀伤的基于阻抗的细胞毒性测定(An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells).《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》405:192-198。

[2842] Schumacher TN和Schreiber RD(2015),癌症免疫疗法中的新抗原.《科学》348:69-74。

[2843] Shang J、Song Q、Yang Z、Sun X、Xue M、Chen W、Yang J和Wang S(2018),不同癌症类型中PD-1相关免疫转录谱的分析(Analysis of PD-1related immune transcriptional profile in different cancer types).《癌细胞国际(Cancer Cell Int)》18:218。

[2844] Thommen DS、Koelzer VH、Herzig P、Roller A、Trefny M、Dimeloe S、Kiialainen A、Hanhart J、Schill C、Hess C、Savic Prince S、Wiese M、Lardinois D、Ho PC、Klein C、Karanikas V、Mertz KD、Schumacher TN和Zippelius A(2018),在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》。

[2845] 实例21:用于制造的PD-1高的选择和扩增

[2846] 介绍

[2847] 若干研究已经证明,高水平的PD-1(通常与T细胞耗尽相关的标志物)的表面表达鉴定肿瘤微环境中的自体肿瘤反应性T细胞(章节11.10)。本实例提供了一种被设计成从肿瘤消化物中选择PD-1阳性(PD-1+)细胞,以富集自体肿瘤反应性T细胞的TIL产物的方案(实例15)。此方案适于选择性地获得具有高水平PD-1的TIL。

[2848] 目的

[2849] 本实例的目的是开发一种用于分选和扩增PD-1^{高}TIL以制造临床试验材料的方法。

[2850] 范围

[2851] 所述实例使用设计用于全规模临床制造的2-REP方案,提供了来自黑素瘤、肺和头颈肿瘤的经扩增的分选的PD-1^{高}TIL。

[2852] 如下所述,扩增三种全规模PD-1^{高}选择的Gen 2工艺培养物。

[2853] 在第0天，使用含有中性蛋白酶、DNA酶I和胶原酶的GMP消化混合物分离肿瘤消化物。将消化物洗涤、染色并且通过FACS进行分选，以纯化PD-1^{高}TIL。

[2854] 在第0天使用具有100e6同种异体的饲养细胞和30ng/mL OKT3的经分选的PD-1^{高}TIL启动REP-1，持续11天。

[2855] 使用所采集的REP-1产物在第11天启动REP-2。按照IOVA制造批次记录，进行REP-2(第11天)以及随后的第16天和第22天的过程(参考章节12附件)。以下概述了相关时间点的简要解释。

[2856] 对经扩增的TIL的细胞生长、活力、表型、端粒长度和功能(IFNγ和颗粒酶B分泌、CD107a动员)进行评估。

[2857] 方法

[2858] 材料

[2859] 肿瘤组织

[2860] 将从研究联盟和组织采购供应商获得各种组织学的肿瘤。

[2861] 用于TIL生长的标准试剂，其包含：G-Rex 100MCS和500MCS烧瓶(威尔森沃尔夫公司，目录号分别为81100-CS、85500S-CS)；GMP重组IL-2(Cell-Genix，德国，目录号1020-1000)；用于CM1、CM2和CM4的所有培养基试剂可以在制造批次记录中找到，如在附件5-7中所见；GlutaMAX 100X(赛默飞世尔，目录号35050061)；庆大霉素50mg/mL(赛默飞世尔，目录号15750060)

[2862] 流式细胞术染色和分析试剂

[2863] 流式细胞术抗体：抗PD-1PE，克隆EH12.2H7，Biolegend公司，目录号329906；抗CD3 FITC，克隆OKT3，Biolegend公司，目录号317306；以及抗IgG4 Fc-PE，克隆HP6025，南方生物技术公司，目录号9200-09。

[2864] 分选缓冲液：含2％FBS的HBSS，1mM EDTA和无菌Gemini过滤。

[2865] 收集缓冲液：含50％hAB血清的HBSS。

[2866] 程序

[2867] 肿瘤组织制备

[2868] 将从研究联盟和组织采购供应商获得新鲜切除的肿瘤样品。将肿瘤在HypoThermosol(生物生命解决方案公司，华盛顿，目录号101104)(含抗生素)中运送过夜。

[2869] 对小瓶/管的肿瘤进行拍照。从包装中去除肿瘤并且在肿瘤洗涤缓冲液(含50ug/mL庆大霉素的过滤的HBSS)中每次洗涤洗涤3X，持续2分钟。

[2870] 将整个肿瘤碎裂为4-6-mm的碎片，以准备进行肿瘤消化。将6-mm碎片保持在含有10mL肿瘤洗涤缓冲液的6孔板的孔中。

[2871] 用于肿瘤消化的酶制剂

[2872] 如下所述，使用GMP胶原酶和中性蛋白酶消化肿瘤。

[2873] 以针对以下消化酶中的每种消化酶所指示的无菌HBSS的量重构冻干酶。确保从瓶子的侧面和从瓶子开口上的保护箔捕获任何残留粉末。上下移液若干次并且涡旋以确保完全重构。

[2874] 在10ml无菌HBSS中重构胶原酶AF-1(Nordmark，瑞典，N0003554)。冻干的储备酶的浓度为2892PZ U/小瓶。因此，重构之后，胶原酶储备液为289.2PZ U/ml。**注意，酶的储备

液可以改变，从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量**。等分成100uL等分试样并且在-20℃下储存。

[2875] 在1ml无菌HBSS中重构中性蛋白酶(Nordmark，瑞典，N0003553)。冻干的储备酶的浓度为175DMC U/小瓶。因此，重构之后，中性蛋白酶储备液为175DMC/ml。**注意，酶的储备液可以改变，从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量**。等分成20uL等分试样并且在-20℃下储存。

[2876] 在1ml无菌HBSS中重构DNA酶I(罗氏公司，瑞士，03724751)。冻干的储备酶的浓度为4KU/小瓶。因此，重构之后，DNA酶储备液为4KU/ml。**注意，酶的储备液可以改变，从而证实冻干储备液的浓度并且相应地修改添加到消化混合物的酶的最终量**。等分成250uL等分试样并且在-20℃下储存。

[2877] 解冻GMP消化混合物的3种组分，并且如下制备工作GMP消化混合物：将10.2μl的中性蛋白酶(0.36DMC U/ml)、21.3μl的胶原酶AF-1(1.2PZ/ml)和250μl的DNA酶I(200U/ml)添加到4.7ml的无菌HBSS中。将消化混合物直接置于C管中。

[2878] 肿瘤处理和消化

[2879] 对于GentleMACS OctoDissociator，将多达4-6mm的肿瘤碎片转移到上述5ml消化混合物中的每个GentleMACS C管(C管)中。使用另外的GentleMACS C管来处理另外的肿瘤碎片。

[2880] 将每个C管转移到GentleMACS OctoDissociator。通过将解离器设置为下表80中列出的相应肿瘤组织学的适当程序来消化。解离将需要大约一小时。

[2881] 表80：基于肿瘤组织类型的美天旎OctoDissociator程序。

[2882]

肿瘤组织类型	名称	程序
黑素瘤、卵巢、结肠、下咽和肾	柔软的	37C_h_TDK_1
肺和前列腺	中等	37C_h_TDK_2
乳腺、胰腺、肝细胞、头颈部鳞状细胞(HNSCC)	坚硬的	37C_h_TDK_3

[2883] 消化后，将一个或多个C管从Octodissociator或旋转器中去除，并且放置在BSC中。用25-mL血清移液管从每个C管去除消化物，并且使本体消化物通过70-μm细胞滤网进入50-mL锥形管中。肿瘤的未消化部分可能无法通过滤网，不允许消化物由于来自移液管的压力而飞溅。用另外的10mL的HBSS洗涤一个或多个C管，并且使洗涤液通过细胞滤网。用HBSS将50-mL锥形管QS到50mL。

[2884] 在室温下在400x G下将消化物离心5分钟(全加速和全制动)。

[2885] 将锥形管转移到BSC并且抽吸或倾析上清液。将沉淀物重悬于5mL的温热CM-1+6000IU/mL IL-2中并且上下移液5-6次。在每WRK LAB-056无稀释的NC-200上进行2个细胞计数。

[2886] 将1mL的消化物置于旁边进行CD3+本体对照，并且低温保存2×500uL消化物的等分试样，用于肿瘤反应性测定。在冰上保持消化。

[2887] 染色消化的肿瘤用于流式细胞术分析和细胞分选

[2888] 将用于PE和FITC单色补偿对照的小样品(约1e5个细胞)搁置到15-mL锥形管中。

[2889] 根据以下方案，用包含抗PD-1-PE、抗IgG4 Fc-PE(针对纳武单抗和派姆单抗的二级抗体)和抗CD3-FITC的混合物对剩余的肿瘤消化物进行染色。PE单色补偿对照用抗PD-1-

PE加上IgG4二级进行染色,并且FITC颜色补偿对照仅用抗CD3-FITC进行染色。

[2890] 在细胞计数之后,添加10mL的HBSS进行消化,并且在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2891] 将锥形管转移到BSC并且倾析上清液。使用微量移液管来获得倾析后剩余的消化物的体积。向管中添加3x这一体积的分选缓冲液。即,如果所获得的体积为150uL,则添加450uL分选缓冲液,总体积为600uL。

[2892] 每100μL添加3μl的抗CD3-FITC(即,如果体积为600uL,则添加6×3=18uL的抗体)。(添加到两个样品中)。

[2893] 每100μL添加2.5μl的抗PD-1-PE(即,如果体积为600uL,则添加6×2.5=15.0uL的抗体)。(不要添加到FMO)。

[2894] 以1:500稀释度添加抗IgG4-Fc-PE(即,对于每500uL的体积,添加1uL的抗体)。

[2895] 用1-mL微量移液管轻轻混合消化物,并且在冰上温育细胞30分钟。温育期间避光。在温育期间通过每10分钟轻轻地轻拂来搅动,以确保彻底染色。

[2896] 将完全染色的细胞重悬于10mL分选缓冲液中,向FMO中添加10mL分选缓冲液。

[2897] 使完全染色的溶液通过30-μm细胞滤网进入15-mL锥形管中,使FMO通过30-μm细胞滤网也进入15-mL锥形管中。

[2898] 在室温下在400x G下离心5分钟(全加速和全制动)。

[2899] 将细胞重悬于分选缓冲液中的高达10e6/mL总细胞(活细胞和死细胞)中。最小体积为300μl。

[2900] 转移到15-mL锥形管中。将所述管储存在冰上,用铝箔覆盖,直到进一步使用。

[2901] 为分选群体制备15-mL收集管。将2mL的收集缓冲液(含2%hAB血清的D-PBS)置于管中。将收集管储存在冰上,直到进一步使用。

[2902] 细胞计数和活力评估

[2903] 使用Chemometec NC-200细胞计数器,使用用于获得细胞和活力计数的程序

[2904] FACS分选(FX500启动)

[2905] 打开BSC。打开JUN-AIR真空泵。通过按压仪器正面上的电源/待机按钮来打开FX500。通过双击桌面上的图标,打开细胞分选器软件,登录并运行程序。

[2906] 运行自动校准

[2907] 当提示装载校准珠粒时,将15滴自动设置珠粒添加到5-mL无菌FACS管。然后按照提示进行操作。当提示选择用于自动校准的设置时,选择“标准”单选按钮。在等待校准完成时,制备以下:用10mL无菌去离子水制备五个无菌15-mL锥形管;用4mL无菌去离子水制备五个无菌5-mL FACS管;用12mL的70%EtOH制备五个无菌15-mL锥形管;并且用12mL的10%次氯酸钠制备五个无菌15-mL锥形管。

[2908] 样品收集

[2909] 证实样品腔室和收集腔室处于5℃并且选择搅拌样品图标。单击屏幕顶部处的血细胞计数器选项卡。单击收藏5℃图标以及样品5℃图标。单击搅拌图标。

[2910] 证实样品已得到补偿。单击屏幕顶部处的补偿选项卡。补偿图标应为浅蓝色。将含有PBMC对照的管(5-mL FACS管或15-mL锥形管)置于样品收集平台上。将样品收集压力设置为6。单击播放,开始样品收集。单击门和统计表,以便在屏幕顶部处显示以下内容。

[2911] 针对以上看到的两个下拉菜单选择100,000。证实细胞群体被正确门控。参见以下实例。可能需要调整BSC或FSC设置。未调整任何其它通道的电压。未调整PD-1门。记录尽可能多的事件(或最多20,000个CD3事件)可以将样品压力设置为10以加速此收集。停止收集并去除管。将先前制得的15-mL无菌dH20锥形管装载到样品平台上。选择10作为样品压力。单击运行图标。收集样品持续一分钟。单击重新启动图标。重复直到CD3门为空的事件。去除dH20样品管并丢弃。将待收集的样品添加到装载平台上。证实设置如下图所示：

[2912] 打开样品腔室门,并且将15-mL收集腔室块装载到所述腔室中。将含有收集缓冲液的收集管装载到腔室块中。将加盖的管倒置若干次,以用收集缓冲液涂覆管的顶部。将管轻拍在BSC的表面上,以从管和盖的顶部去除多余的缓冲液。用样品名称和加号标记一个管。去除盖,并且将此盖放置到左腔室中。用样品名称和负号标记第二管。去除盖,并且将此盖放置到右腔室中。

[2913] 单击上图所示的装载收集图标。选择4作为样品压力。单击运行图标。等待细胞出现在屏幕上。约15秒。调整样品压力,使得每秒总事件低于5,000。单击开始分选图标。调整样品压力以维持至少85％的分选效率。记录50,000个CD3事件。参见下图。录制将自动停止。在出现对话框时,单击确定按钮。

[2914] 在任一级分中所收集的细胞超过4.5×10^{6}个的情况下,则将需要更换一个或多个收集管。单击停止分选图标。单击暂停图标。打开收集腔室门,并且将原始收集管更换为新的收集管;关闭门并且将原始收集管置于冰上。单击下一个管图标。单击装载收集图标。单击播放图标。单击开始分选图标。

[2915] 继续分选,直到所有样品都从样品管中取出。如果所述管“干燥”运行,也是可以的。从样品腔室中去除样品管。丢弃。从收集腔室中去除所分选的级分。对所述管进行加盖并且轻轻地倒置若干次以便将所述管的顶部附近的液滴并入到溶液中。轻轻地将管轻拍在BSC的表面上,以从管和盖的顶部去除多余的溶液。将管置于冰上。证实PD-1级分的选择性百分比。将14-mL的EtOH锥形管置于样品腔室上。单击探针洗涤图标。重复。去除EtOH管,并且然后添加阳性级分管。将样品压力值更改为7。单击下一个管图标。用样品名称和“阳性选择”命名管。单击播放并录制75个CD3阳性事件。立即停止管,并且将其从样品腔室中卸载。针对阴性选择样品重复步骤。

[2916] 导出数据。通过双击选择PD-1 FMO管。选择文件/打印。打印成PDF格式而不是打印机。这将提供完整的6页样品报告。针对所收集的每个管重复上述操作。关闭仪器。

[2917] PD-$1^{高}$快速扩增方案

[2918] 第0天-REP1

[2919] 培养基制备:制备或温热1L的CM-1+6000IU/mL IL-2。

[2920] PBMC饲养细胞制备:解冻适当数量的小瓶(全规模需要100e6 PBMC,并且本体CD3+对照将需要10e6,假定60e6-80e6 PBMC每1mL小瓶)进行REP-1。将40mL温热的CM1+IL-2置于50mL锥形管中并且将1mL PBMC饲养细胞小瓶移液到锥形管中。将解冻的PBMC饲养细胞上下移液以彻底混合并在NC-200上进行2个细胞计数。

[2921] 计算转移到G-Rex 100M和G-Rex 10M以分别转移100e6和10e6 PBMC的适当体积。

[2922] 向G-Rex 100M中添加30uL的aCD3(OKT-3)并且向G-rex 10M中添加3uL。将烧瓶置于温育箱中

[2923] 接种TIL进行REP-1

[2924] 将所有PD-1^{高}分选置于G-Rex 100M中。CD3+本体TIL对照条件将以1/10比率以全规模向PD-1^{高}细胞添加等数量的CD3+细胞。为了获得合适体积的消化物，遵循以下步骤：1)通过将在步骤9.3.5中获得的消化物TVC乘以从分选报告获得的活细胞的CD3+％来计算消化物中的CD3+TVC/mL。(即，10e6*10％＝1e6)，2)在获得这一数字之后，将接种到全规模条件中的PD-1^{高}细胞的数量除以这一数字。(即，1e5/1e6＝0.1mL)，并且3)将此体积(0.1mL)的消化物添加到本体CD3+TIL烧瓶中并且用CM1+IL-2填充到100mL。将所有烧瓶置于37℃、5％CO_2温育箱中。

[2925] 第11天，第16天，第22天

[2926] 接着进行全规模工艺。与实例9中描述的步骤类似地处理本体CD3+TIL条件。

[2927] 接受标准

[2928] 下表81规定了用于评估三个全规模批次的性能的接受标准。

[2929] 表81：采集产品测试和接受标准

[2930]

测试类型	方法	接受标准
工艺中测试		
分选后纯度（PD1+%）	流式细胞术	≥ 80%
释放测试		
外观	目视检查	袋子完好，无团块迹象
细胞活力	荧光	≥ 70%
总活细胞计数	荧光	1×10^9 到 150×10^9
同一性（%CD45+CD3+）	流式细胞术	≥ 90% CD45+CD3+细胞
IFNg（经刺激的-未经刺激的）	珠粒刺激和 ELISA	≥ 500 pg/mL

[2931] 下表82规定了进行的另外的最终产物表征测试，仅供参考。

[2932] 表82：最终产物表征(仅供参考)

[2933]

测试类型	方法	报告结果
纯度和记忆 T 细胞亚群表型	流式细胞术（LAB-055）	报告结果
活化和耗尽标志物表型	流式细胞术（LAB-061）	报告结果
端粒长度	Flow FISH（附件-1）	报告结果
颗粒酶 B	珠粒刺激和 ELISA（LAB-064）	报告结果
CD107A	有丝分裂原刺激和流式细胞术（LAB-061）	报告结果
TCR Vβ 测序	深度测序（健谱生物科技公司）	报告结果（如果可用的话）
代谢物分析	Cedex 生化分析仪	报告结果

[2934] 实例21的参考文献

[2935] Rosenberg,S.A.等人，使用T细胞转移免疫疗法在严重预处理的患有转移性黑素瘤的患者中持久的完全应答.《临床癌症研究》,2011.17(13):第4550-7。

[2936] Kvistborg,P.等人，TIL疗法拓宽了黑素瘤患者的肿瘤反应性CD8(+)T细胞区室.《肿瘤免疫学》,2012.1(4):第409-418。

[2937] Simoni,Y.等人，旁观者CD8(+)T细胞在人肿瘤浸润中是丰富的并且在表型上不

同.《自然》,2018.557(7706):第575-579。

[2938] Schumacher,T.N.和R.D.Schreiber,癌症免疫疗法中的新抗原.《科学》,2015.348(6230):第69-74。

[2939] Turcotte,S.等人,来自胃肠癌和黑素瘤的浸润内脏转移的T细胞的表型和功能:过继性细胞转移疗法的暗示.《免疫学杂志》,2013.191(5):第2217-25。

[2940] Inozume,T.等人,在富集肿瘤反应性T细胞的新鲜人黑素瘤中选择CD8+PD-1+淋巴细胞.《免疫治疗学杂志》,2010.33(9):第956-64页。

[2941] Gros,A.等人,PD-1鉴定患者特异性CD8(+)肿瘤反应性库浸润人肿瘤.《临床研究杂志》,2014.124(5):第2246-59页。

[2942] Thommen,D.S.等人,在用PD-1阻断处理的非小细胞肺癌中具有预测潜力的转录和功能上不同的PD-1(+)CD8(+)T细胞池.《自然医学》,2018。

[2943] 提供以上阐述的实例是为了向本领域的普通技术人员提供如何制造和使用本发明的组合物、系统和方法的实施例的完整公开和描述,而不是旨在限制发明人认为是其发明的范围。对用于实施本发明的以上描述的模式进行的对于本领域的技术人员来说是显而易见的修改旨在处于以下权利要求书的范围内。本说明书中所提及的所有专利和出版物指示本发明所属领域的技术人员的水平。

[2944] 使用所有标题和章节命名仅仅是出于清楚和参考的目的并且不应当被视为是以任何方式进行限制。例如,本领域的技术人员将认识到根据本文所描述的本发明的精神和范围,适当地组合来自不同标题和章节的各个方面的有用性。

[2945] 本文中所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具体地或单独地被指示出于所有目的通过引用整体并入。

[2946] 在不脱离本申请的精神和范围的情况下,可以对本申请进行许多修改和变化,如本领域的技术人员而言是显而易见的。本文描述的具体实施例和实例仅通过举例的方式提供,并且本申请仅受所附权利要求书的条款以及权利要求书有权获得的等效物的全部范围的限制。

序列表

<110> 艾欧凡斯生物治疗有限公司(Iovance Biotherapeutics, Inc.)

<120> 经改进的肿瘤反应性T细胞的选择

<130> 116983-5020

<150> US 62/756,006

<151> 2018-11-05

<150> US 62/826,831

<151> 2019-03-29

<150> US 62/903,629

<151> 2019-09-20

<150> US 62/924,602

<151> 2019-10-22

<160> 126

<170> PatentIn版本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)
<220>
<223> 莫罗单抗轻链
<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
100 105 110
Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125
Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140
Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160
Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175
Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190
Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205
Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 3
<211> 134

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<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 80
Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95
Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110
Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125
Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140
Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160
Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175
Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190
Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205
Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
210 215 220
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 10
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 鼠类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 80
His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95
Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110
Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
115 120 125
Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140
Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160
Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175
Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190
Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205
Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220
Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240
Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 11
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米卢单抗的重链
<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米卢单抗的轻链
<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> 乌托米卢单抗的重链可变区
<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> 乌托米卢单抗的轻链可变区
<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)
<220>
<223> 乌托米卢单抗的重链CDR1
<400> 15
Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5
<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌托米卢单抗的重链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)
<220>
<223> 乌托米卢单抗的重链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> 乌托米卢单抗的轻链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> 乌托米卢单抗的轻链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> 乌托米卢单抗的轻链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
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 22
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 乌瑞鲁单抗的轻链
<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 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> 连接子

<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> 连接子
<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> 连接子
<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> 连接子
<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> 连接子
<400> 36
Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25
<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<400> 37
Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25
<210> 38
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 连接子
<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> 连接子
<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> 连接子
<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> 连接子
<400> 41
Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His
1 5 10 15
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 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> 连接子
<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> 连接子
<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> 连接子
<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 80
Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 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 15
Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45
Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80
Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr
115 120

<210> 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> 鼠类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
145 150 155 160
Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175
Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190
Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205
Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220
Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240
Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255
Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 56
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他伏利珠单抗的重链
<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80
Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 57
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他伏利珠单抗的轻链
<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
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> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他伏利珠单抗的重链可变区
<400> 58
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80
Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 59
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他伏利珠单抗的轻链可变区
<400> 59
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 他伏利珠单抗的重链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> 他伏利珠单抗的重链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> 他伏利珠单抗的重链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> 他伏利珠单抗的轻链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> 他伏利珠单抗的轻链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> 他伏利珠单抗的轻链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 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 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
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链CDR1
<400> 70
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5
<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链CDR2
<400> 71
Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 11D4的重链CDR3
<400> 72

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5
<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 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu

130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn

195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg

210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Lys
450

<210> 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(替代方案)
<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
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95
Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 111
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 023的可变重链
<400> 111
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 108
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<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 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> 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 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 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

工艺2A：从步骤A到E，约22天	工艺GEN 3：从步骤A到E，约14-18天
步骤A 获得患者肿瘤样品（任选地可以在步骤B之前冷冻；任选地肿瘤样品可以是核心/小型活检）	**步骤A** 获得患者肿瘤样品（任选地可以在步骤B之前冷冻）
步骤B 第一扩增（用包括IL-2的培养基生长约3天到14天，物理碎裂成每容器至少40个碎片）	**步骤B** 引发第一扩增（用包括IL-2、OKT-3以及任选地抗原呈递饲养细胞的培养基生长约1天到7/8天，物理碎裂成每容器最多60个碎片）
步骤C 第一扩增到第二扩增的转变（步骤B TIL直接移动到步骤D，任选地在步骤B第11天）	**步骤C** 引发第一扩增到快速第二扩增的转变（在第7/8天步骤B TIL直接移动到步骤D）
步骤D 第二扩增（TIL在密闭容器中，在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长）	**步骤D** 快速第二扩增（TIL在包括IL-2、OKT-3和2X抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长；第10-11天规模扩大并且添加另外的IL-2）
步骤E 从步骤D采集TIL （通过密闭系统采集TIL）	**步骤E** 从步骤D采集TIL
步骤F 最终调配和/或转移到输注袋 （任选地低温保存）	**步骤F** 最终调配和/或转移到输注袋 （任选地低温保存）

图1A

工艺GEN 3：从步骤A到E，约14-18天

步骤A

获得患者肿瘤样品
（任选地可以在步骤B之前冷冻）

步骤B

引发第一扩增（用包括IL-2、OKT-3以及任选地抗原呈递饲养细胞的培养基生长约1天到7/8天，物理碎裂成每容器最多60个碎片）

步骤C

引发第一扩增到快速第二扩增的转变
（在第7/8天步骤B TIL直接移动到步骤D）

步骤D

快速第二扩增（TIL在包括IL-2、OKT-3和2X抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长；第10-11天规模扩大并且添加另外的IL-2）

步骤E

从步骤D采集TIL

步骤F

最终调配和/或转移到输注袋
（任选地低温保存）

图1B

实施例GEN 3.0： 从步骤A到E，约14-18天	实施例GEN 3.1对照： 从步骤A到E，约14-18天	实施例GEN 3.1测试/F： 从步骤A到E，约14-18天
步骤A 获得患者肿瘤样品（任选地可以在步骤B之前冷冻）	**步骤A** 获得患者肿瘤样品（任选地可以在步骤B之前冷冻）	**步骤A** 获得患者肿瘤样品（任选地可以在步骤B之前冷冻）
步骤B 引发第一扩增（用包括IL-2的培养基生长约1天到7/8天，物理碎裂成每个容器最多60个碎片）	**步骤B** 引发第一扩增（用包括IL-2和OKT-3的培养基生长约1天到7/8天，物理碎裂成每容器最多60个碎片）	**步骤B** 引发第一扩增（用包括IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的培养基生长约1天到7/8天，物理碎裂成每容器最多60个碎片）
步骤C 引发第一扩增到快速第二扩增的转变（在第7/8天步骤B TIL直接移动到步骤D）	**步骤C** 引发第一扩增到快速第二扩增的转变（在第7/8天步骤B TIL直接移动到步骤D）	**步骤C** 引发第一扩增到快速第二扩增的转变（在第7/8天步骤B TIL直接移动到步骤D）
步骤D 快速第二扩增（TIL在包括IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长；第10-11天规模扩大并且添加另外的IL-2）	**步骤D** 快速第二扩增（TIL在包括IL-2、OKT-3和2X抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长；第10-11天规模扩大并且添加另外的IL-2）	**步骤D** 快速第二扩增（TIL在包括IL-2、OKT-3和2X抗原呈递饲养细胞的生长培养基中生长；第10-11天规模扩大并且添加另外的IL-2）
步骤E 从步骤D采集TIL	**步骤E** 从步骤D采集TIL	**步骤E** 从步骤D采集TIL
步骤F 最终调配和/或转移到输注袋（任选地低温保存）	**步骤F** 最终调配和/或转移到输注袋（任选地低温保存）	**步骤F** 最终调配和/或转移到输注袋（任选地低温保存）

图1C

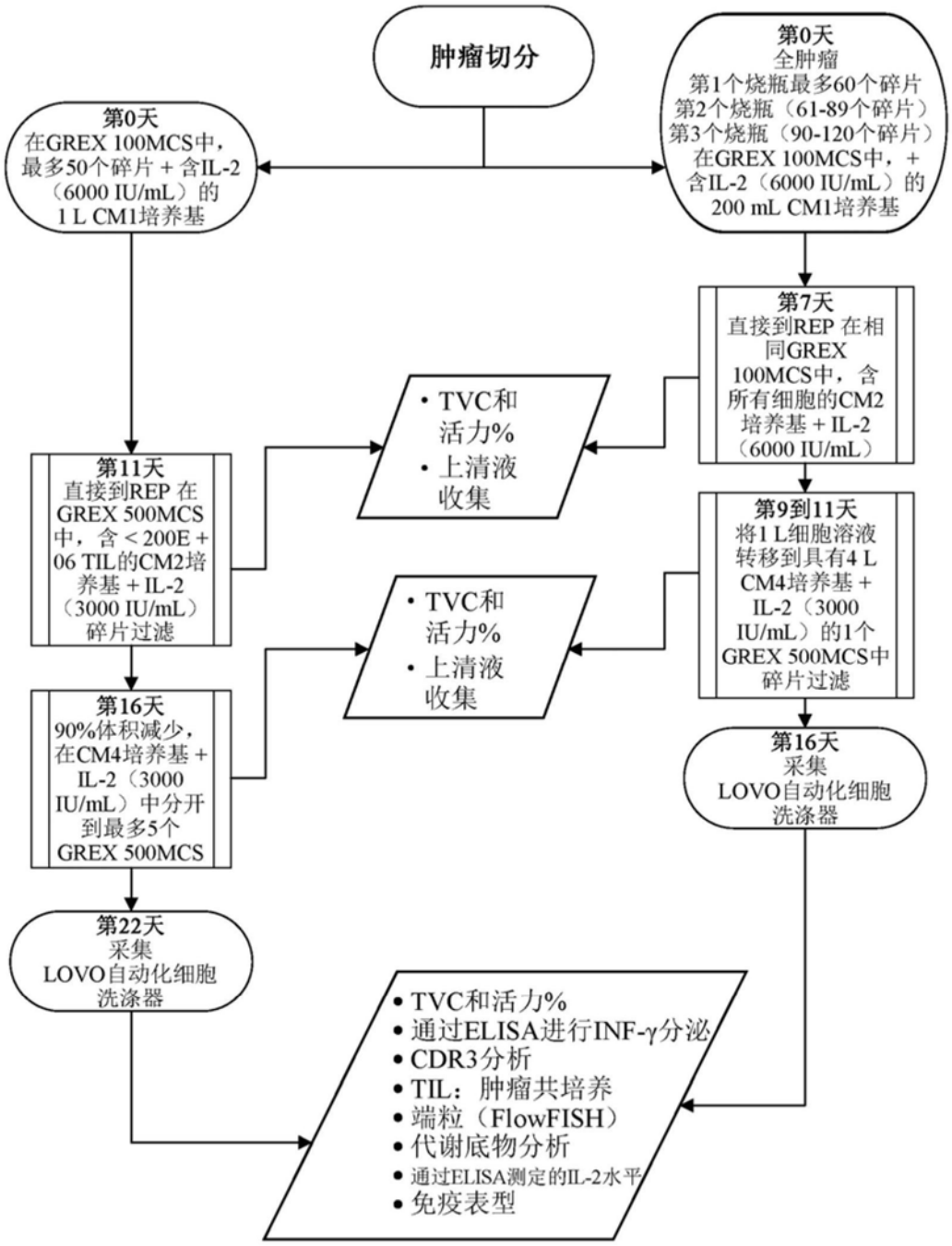
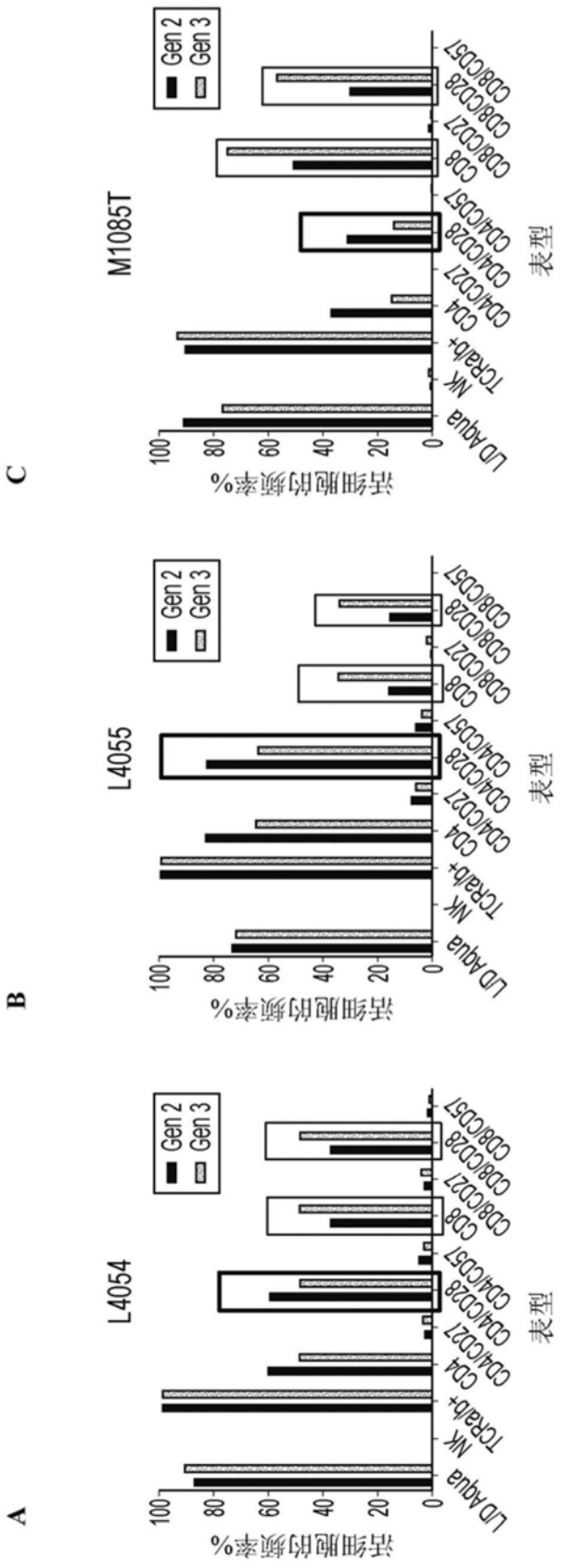
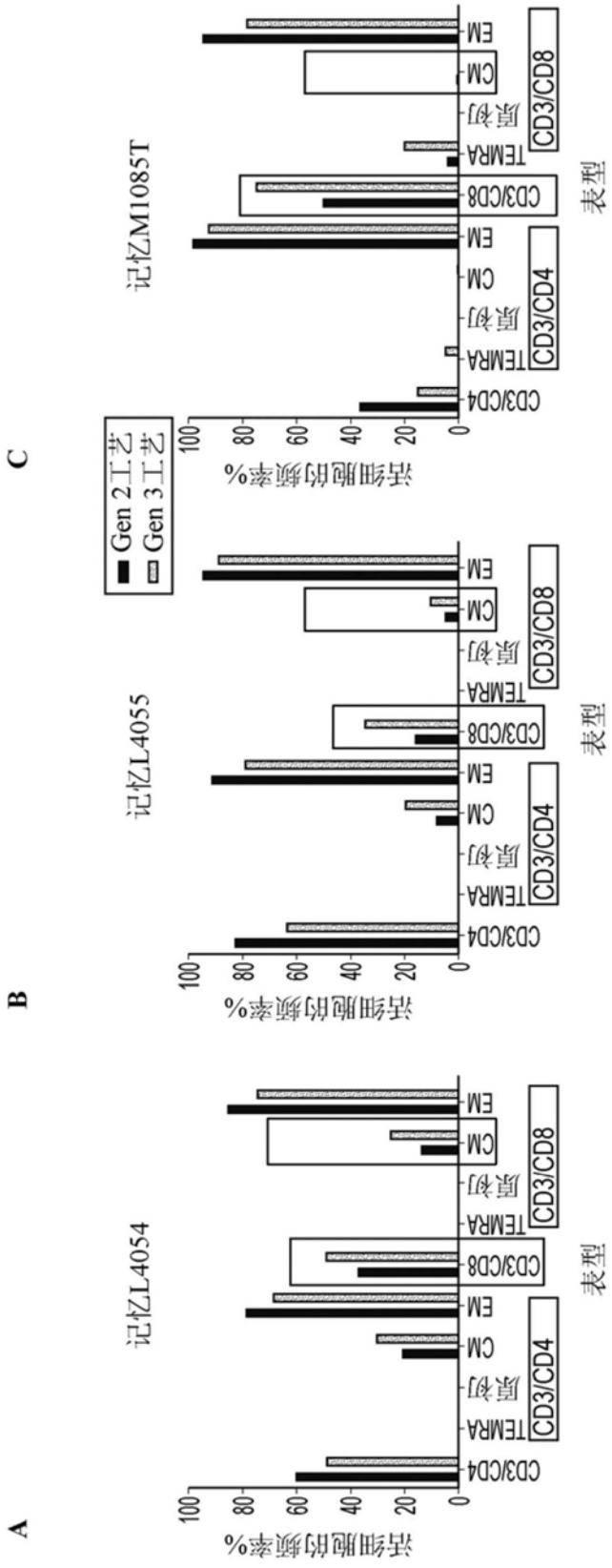

肿瘤切分
第0天
在GREX 100MCS中，最多50个碎片 + 含IL-2（6000 IU/mL）的1 L CM1培养基
第0天
全肿瘤
第1个烧瓶最多60个碎片
第2个烧瓶（61-89个碎片）
第3个烧瓶（90-120个碎片）
在GREX 100MCS中，+含IL-2（6000 IU/mL）的200 mL CM1培养基
第7天
直接到REP 在相同GREX 100MCS中，含所有细胞的CM2培养基 + IL-2（6000 IU/mL）
• TVC和活力%
• 上清液收集
第11天
直接到REP 在GREX 500MCS中，含 < 200E + 06 TIL的CM2培养基 + IL-2（3000 IU/mL）碎片过滤
第9到11天
将1 L细胞溶液转移到具有4 L CM4培养基 + IL-2（3000 IU/mL）的1个GREX 500MCS中碎片过滤
• TVC和活力%
• 上清液收集
第16天
90%体积减少，在CM4培养基 + IL-2（3000 IU/mL）中分开到最多5个GREX 500MCS
第16天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
第22天
采集
LOVO自动化细胞洗涤器
• TVC和活力%
• 通过ELISA进行INF-γ分泌
• CDR3分析
• TIL：肿瘤共培养
• 端粒（FlowFISH）
• 代谢底物分析
• 通过ELISA测定的IL-2水平
• 免疫表型

图2



肿瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
碎片数量	21	21	24	24	16	16

图3



肿瘤ID	L4054		L4055		M1085T	
工艺	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
碎片数量	21	21	24	24	16	16

图4

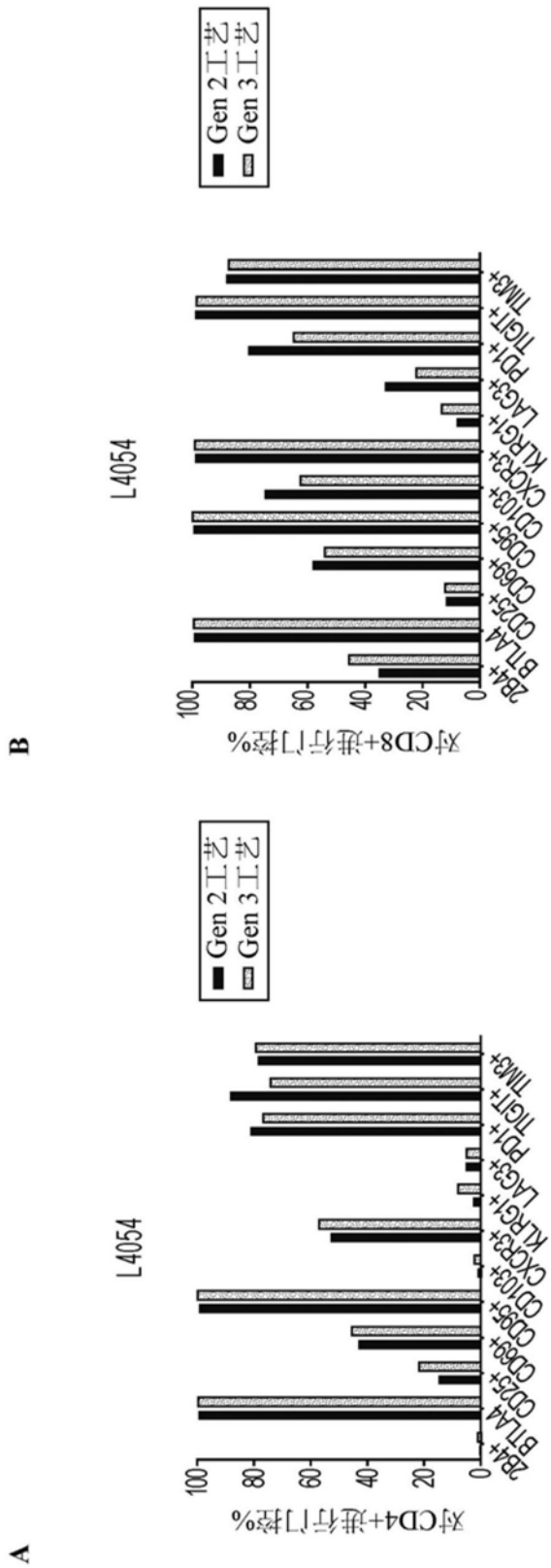

A
B
L4054
L4054
对CD4+进行门控%
对CD8+进行门控%
100
80
60
40
20
0
Gen 2工艺
Gen 3工艺
2B4+
BTLA4+
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

图5

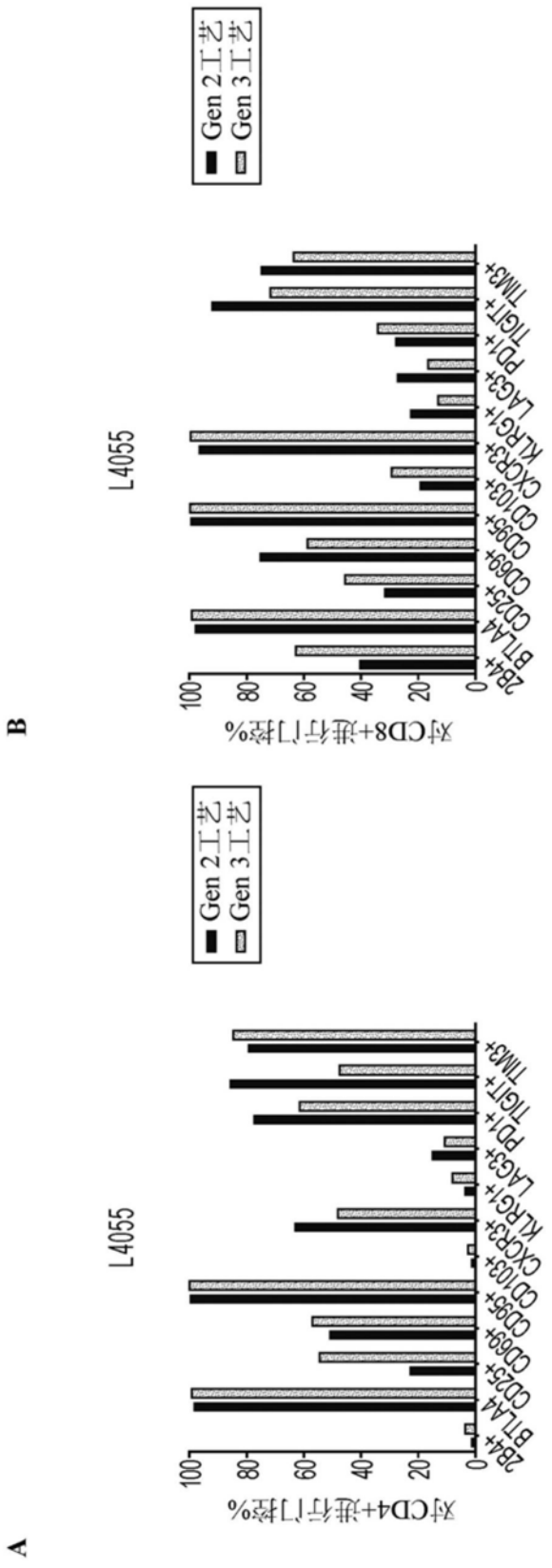

A
B
L4055
对CD4+进行门控%
对CD8+进行门控%
Gen 2工艺
Gen 3工艺
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+

图6

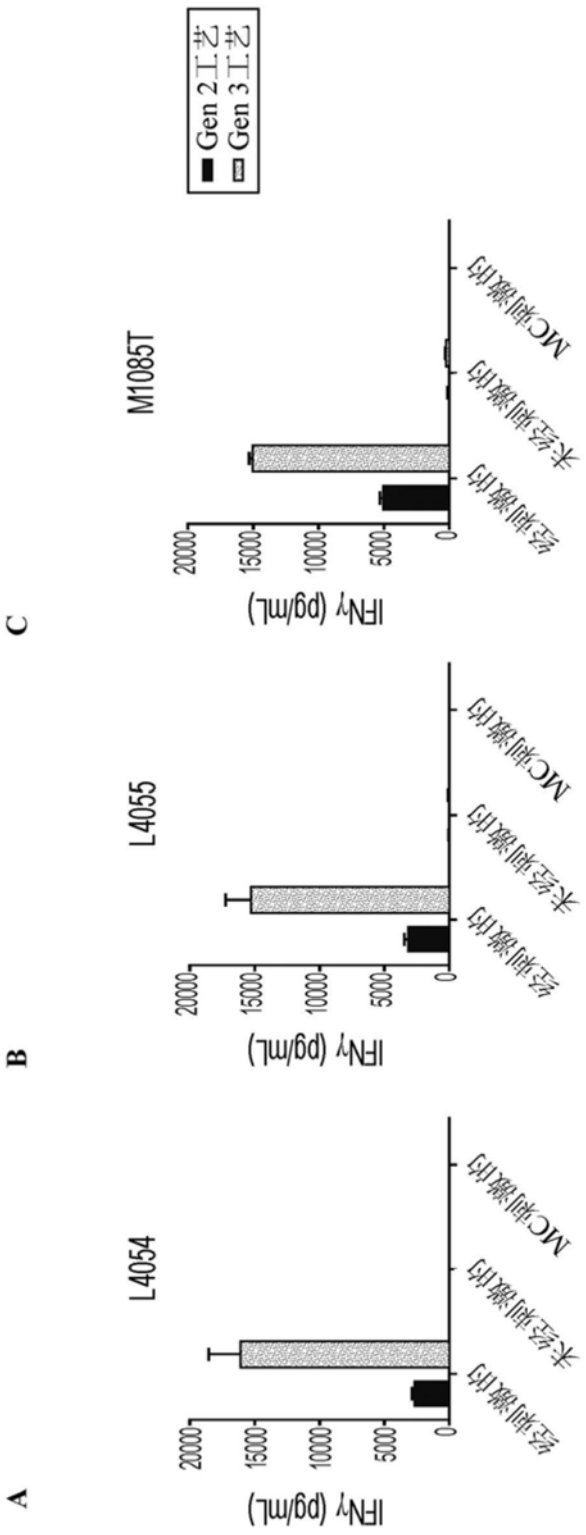

A
B
C
L4054
L4055
M1085T
IFNγ (pg/mL)
20000
15000
10000
5000
0
轻刺激Ab
未经刺激Ab
MC刺激Ab
Gen 2工艺
Gen 3工艺

图7

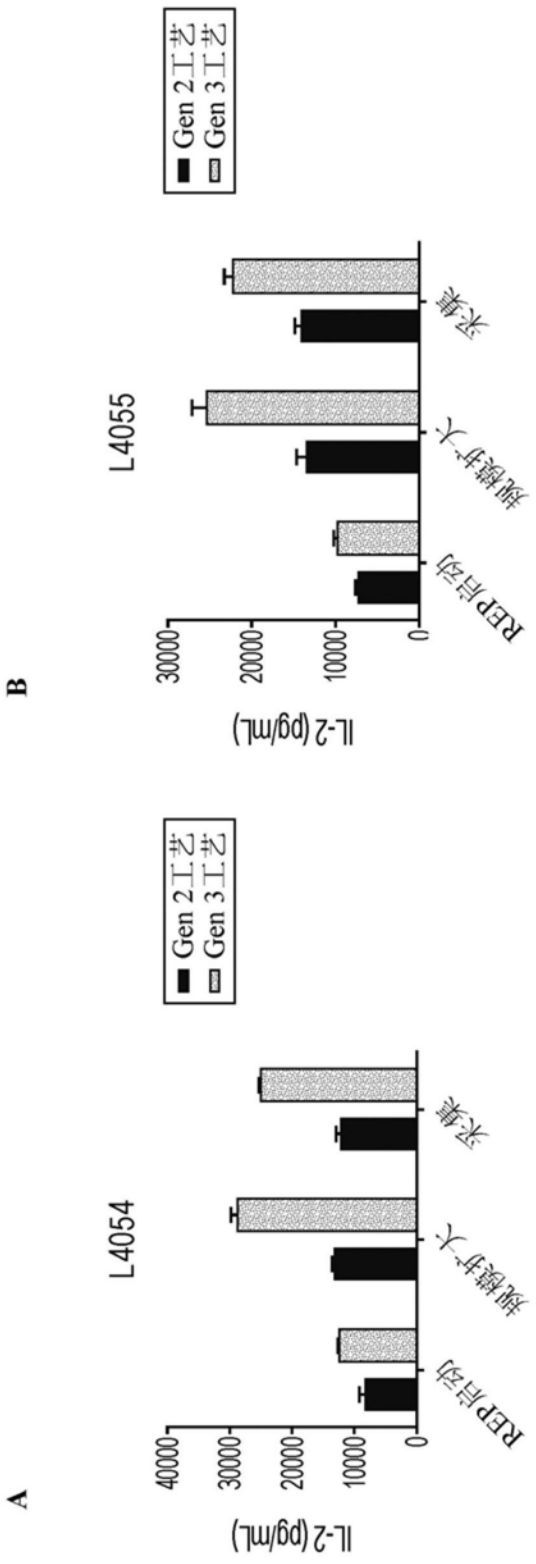

A
B
L4054
L4055
Gen 2工艺
Gen 3工艺
IL-2 (pg/mL)
40000
30000
20000
10000
0
REP后动
规模扩大
采集

图8

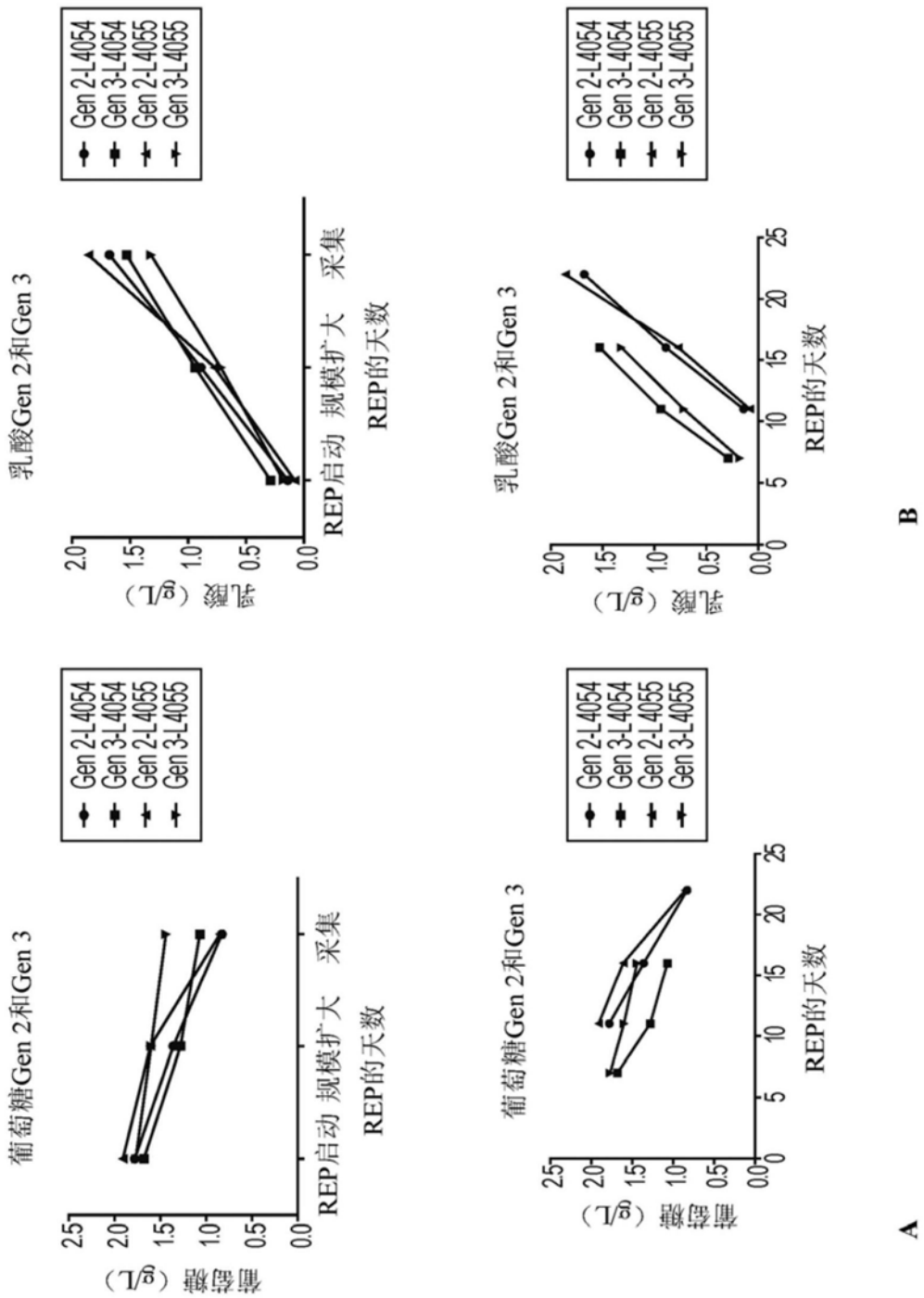
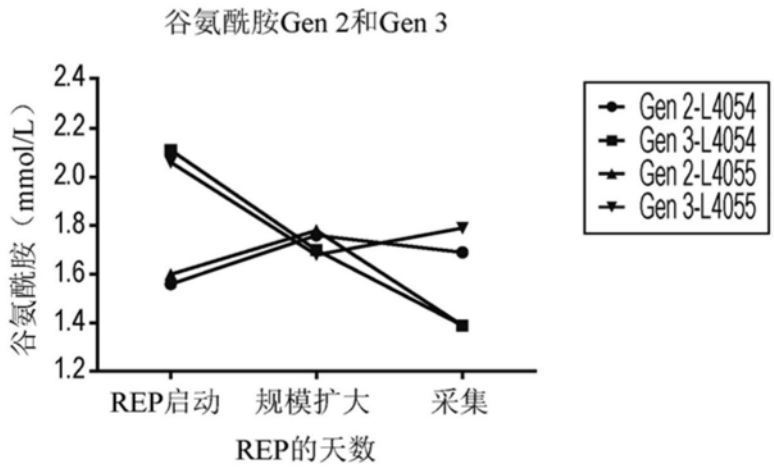

葡萄糖Gen 2和Gen 3
葡萄糖 (g/L)
REP的天数
REP启动 规模扩大 采集
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
乳酸Gen 2和Gen 3
乳酸 (g/L)
A
B

图9

A


谷氨酰胺Gen 2和Gen 3
谷氨酰胺（mmol/L）
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
REP启动
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

B

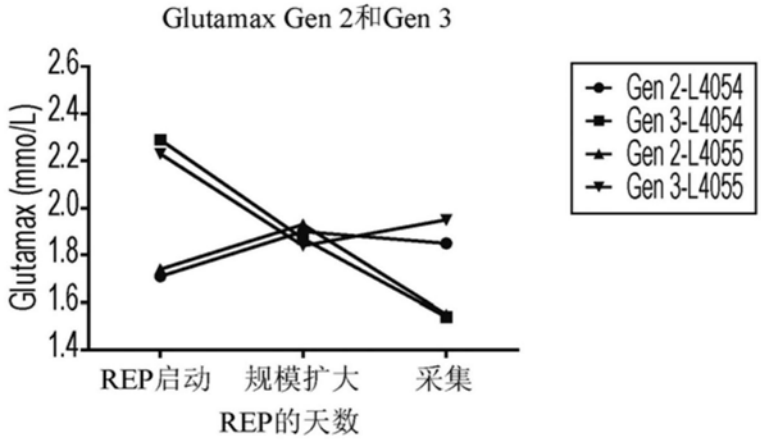

Glutamax Gen 2和Gen 3
Glutamax (mmo/L)
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
REP启动
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

图10

C

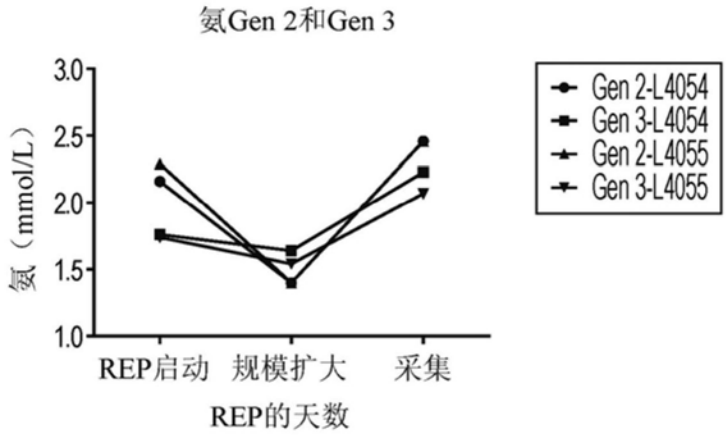

氨Gen 2和Gen 3
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
氨（mmol/L）
REP启动
规模扩大
采集
REP的天数
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

图10C

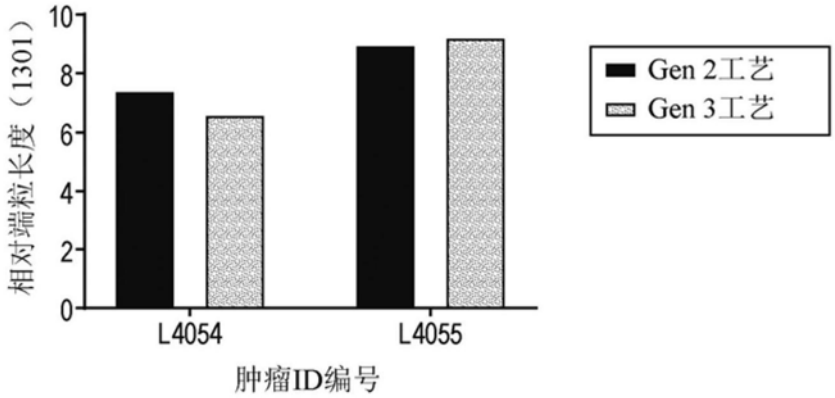

10
8
6
4
2
0
相对端粒长度（1301）
L4054
L4055
肿瘤ID编号
Gen 2工艺
Gen 3工艺

图11

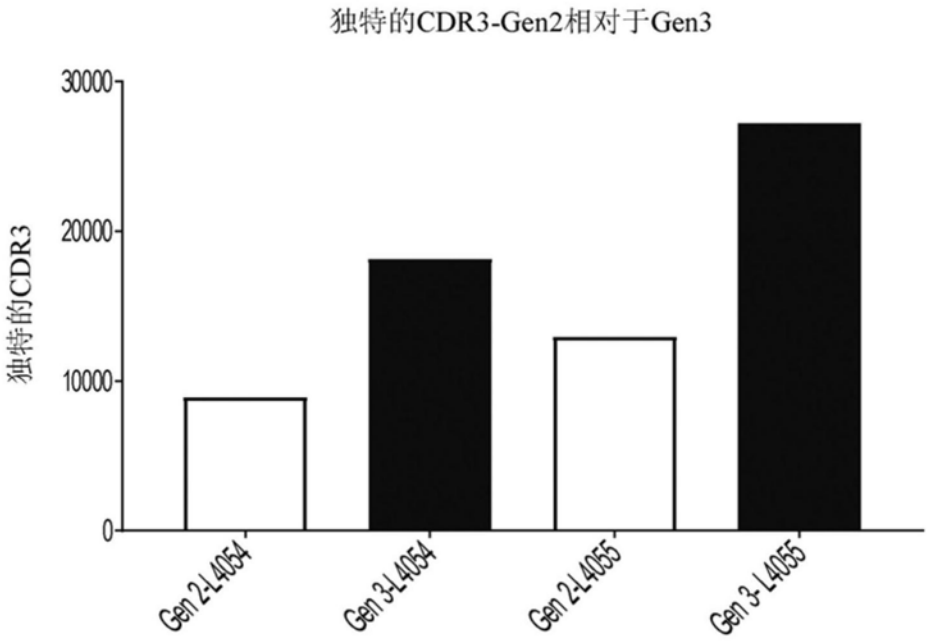
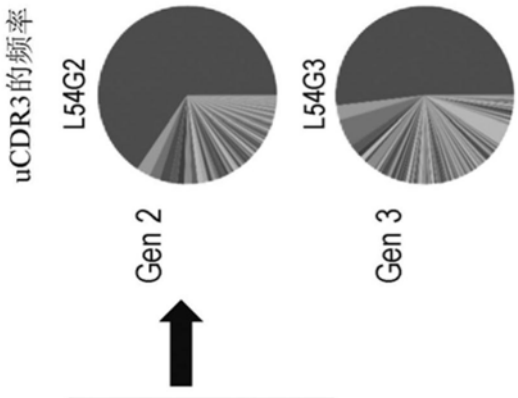

独特的CDR3-Gen2相对于Gen3
独特的CDR3
30000
20000
10000
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

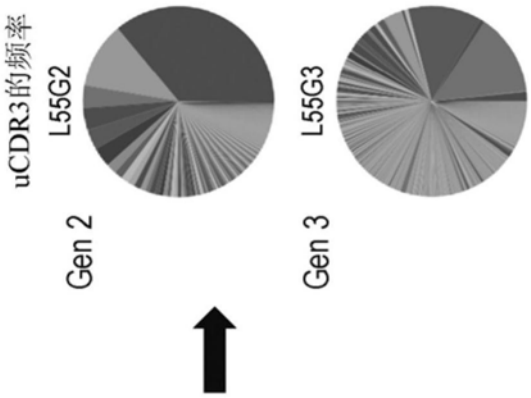
图12



uCDR3编号（重叠率%）	所有uCDR3		前80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

- 在Gen 3与Gen 2最终产物之间共享199个序列，对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的97.07%。

图13



uCDR3编号（重叠率%）	所有uCDR3		前80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

- 在Gen 3与Gen 2最终产物之间共享1833个序列，对应于Gen 2与Gen 3最终产物共享的前80%独特CDR3序列的99.45%。

图14

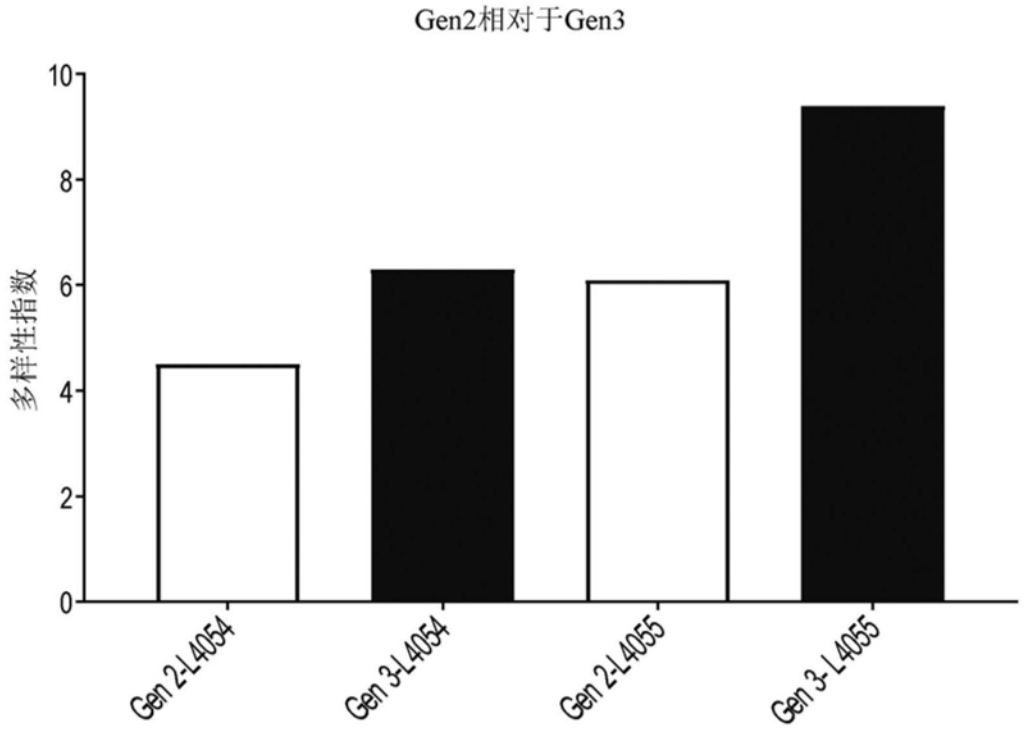


图15

第7天的细胞计数—Gen3 REP启动

体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
188	总	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	活	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	死	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	活力%	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	总	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	活	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	死	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	活力%	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	总	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	活	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	死	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	活力%	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

图16

第11天的细胞计数—Gen 2 REP启动和Gen3规模扩大

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 3编号 L4054 第一轮	1000	总	9.11E+05	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		活	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	9.35E+05	9.35E+08
		死	5.09E+04	7.49E+04	6.74E+04	6.44E+04	6.44E+07
		活力%	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3编号 L4055 第二轮	1000	总	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		活	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		死	8.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		活力%	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Gen 3编号 M1085T	200	总	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		活	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		死	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		活力%	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2编号 L4054 第一轮	142	总	1.08E+06	9.84E+05	1.00E+06	1.02E+06	1.45E+08
		活	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		死	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		活力%	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2编号 L4055 第二轮	96	总	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		活	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		死	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		活力%	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Gen 2编号 M1085T	200	总	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		活	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		死	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		活力%	88.50%	75.20%		81.85%	

图17

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 3编号L4054第一轮-LOVO前	1243.1	总	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		活	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		死	8.47E+05	1.12E+06		9.84E+05	1.22E+09
		活力%	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3编号L4054第一轮-LOVO后	330	总	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		活	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		死	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		活力%	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 3编号L4055第二轮-LOVO前	1032.6	总	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		活	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		死	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		活力%	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3编号L4055第二轮-LOVO后	330	总	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		活	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.67E+09
		死	4.56+06	3.61+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		活力%	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 3编号M1085T LOVO前	5000	总	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		活	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		死	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		活力%	87.40%	87.50%		87.45%	
Gen 3编号M1085T LOVO后CS10前添加	150	总	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		活	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		死	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		活力%	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 2编号L4054第一轮	913	总	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		活	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		死	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		活力%	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2编号L4055第二轮	292	总	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		活	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		死	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		活力%	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2编号M1085T	369	总	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		活	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		死	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		活力%	77.20%	79.90%		78.55%	

图18

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 2编号L4054第一轮-LOVO前	1385.7	总	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		活	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		死	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		活力%	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2编号L4054第一轮-LOVO后	330	总	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		活	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		死	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		活力%	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen2编号L4055第一轮-LOVO前	1968.2	总	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		活	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		死	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		活力%	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2编号L4055第一轮-LOVO后	330	总	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		活	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		死	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		活力%	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	体积（mL）		计数1（细胞/毫升）	计数2（细胞/毫升）	计数3（细胞/毫升）	平均数（细胞/毫升）	总细胞平均数*体积
Gen 2编号M1085T-LOVO前	N/S	总				#DIV/0!	#DIV/0!
		活				#DIV/0!	#DIV/0!
		死				#DIV/0!	#DIV/0!
		活力%				#DIV/0!	
Gen 2编号M1085T-LOVO后CS10前添加	150	总	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		活	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		死	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		活力%	86.10%	86.10%		86.10%	

对于L4054 Gen 2，将LOVO后计数外推到4个烧瓶中，因为其是研究的总数。1个烧瓶被污染，并且对总数 = 6.67e + 10进行外推

图19

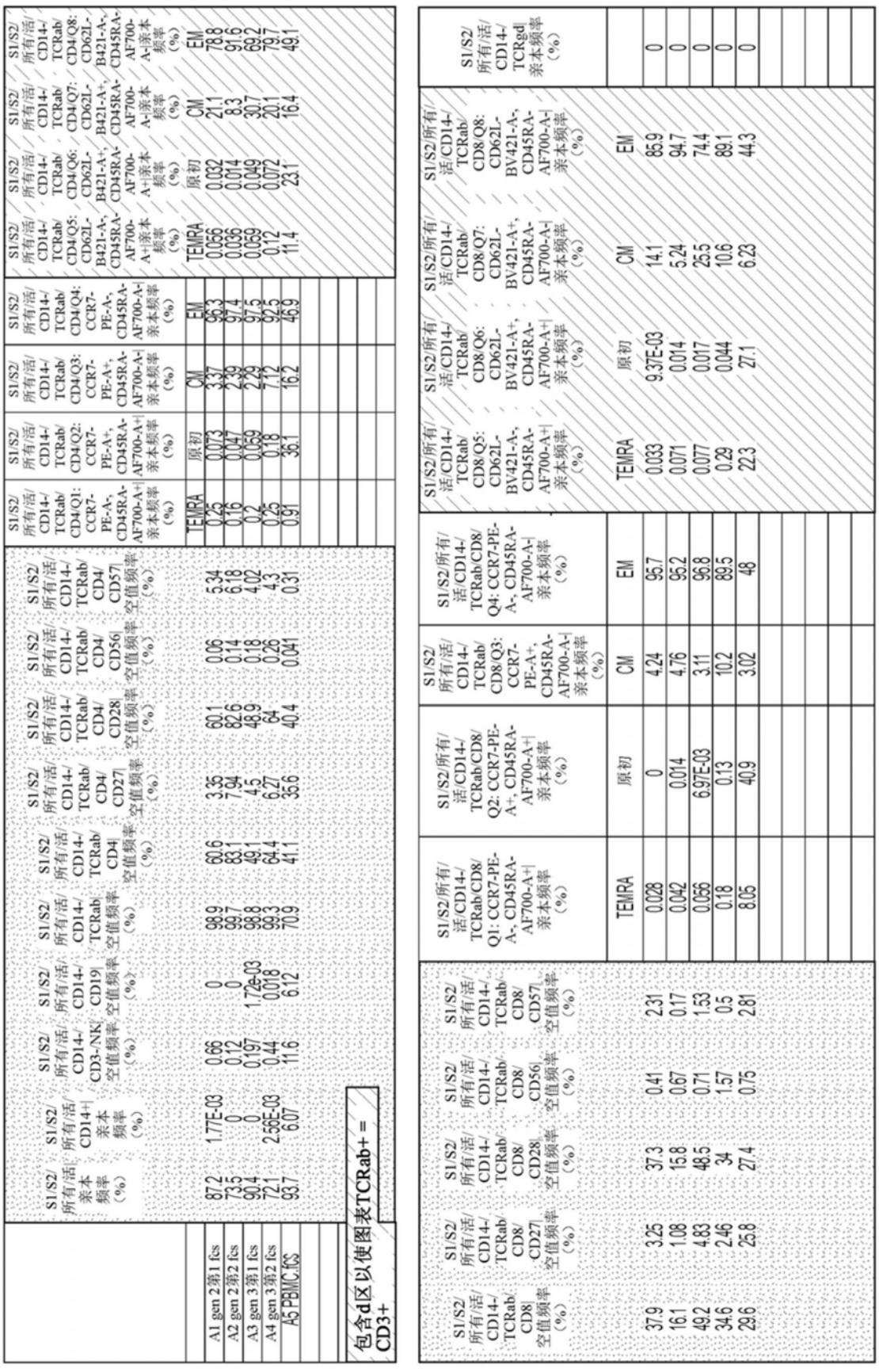
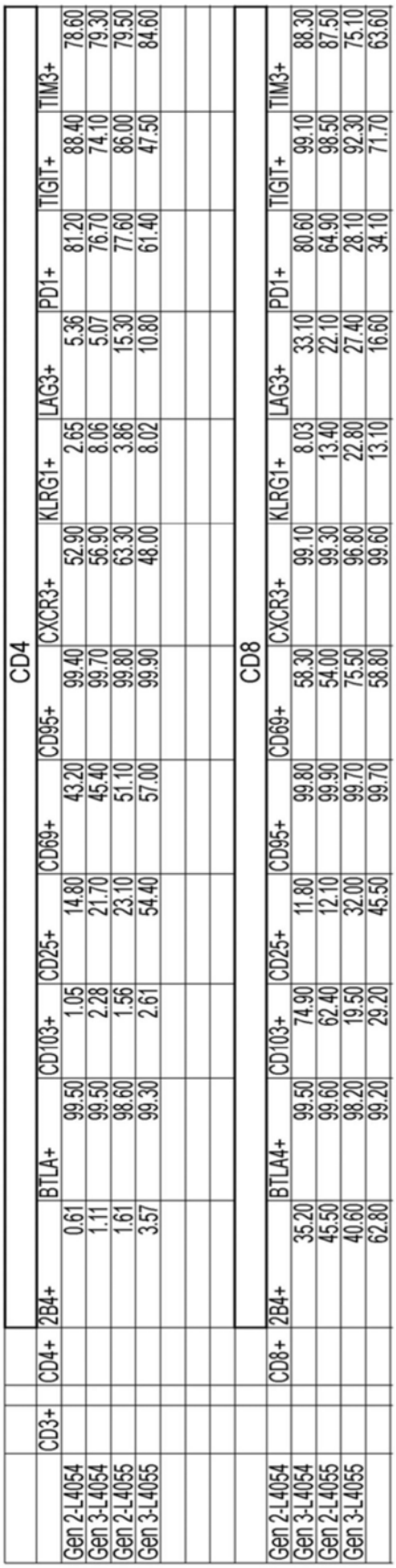

包含d区以使图表TCRab+ = CD3+
A1 gen 2第1 fcs
A2 gen 2第2 fcs
A3 gen 3第1 fcs
A4 gen 3第2 fcs
A5 PBMC fcs
TEMRA
原初
CM
EM

图20

CD3/CD4							
	CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+ CD45RA-	CCR7-CD45RA-	
Gen 3-第16天-采集	42.4	95.2	4.96	0.7	1.22	93.1	
Gen 2-第22天-采集	50.4	98	0.61	0.13	0.3	99	

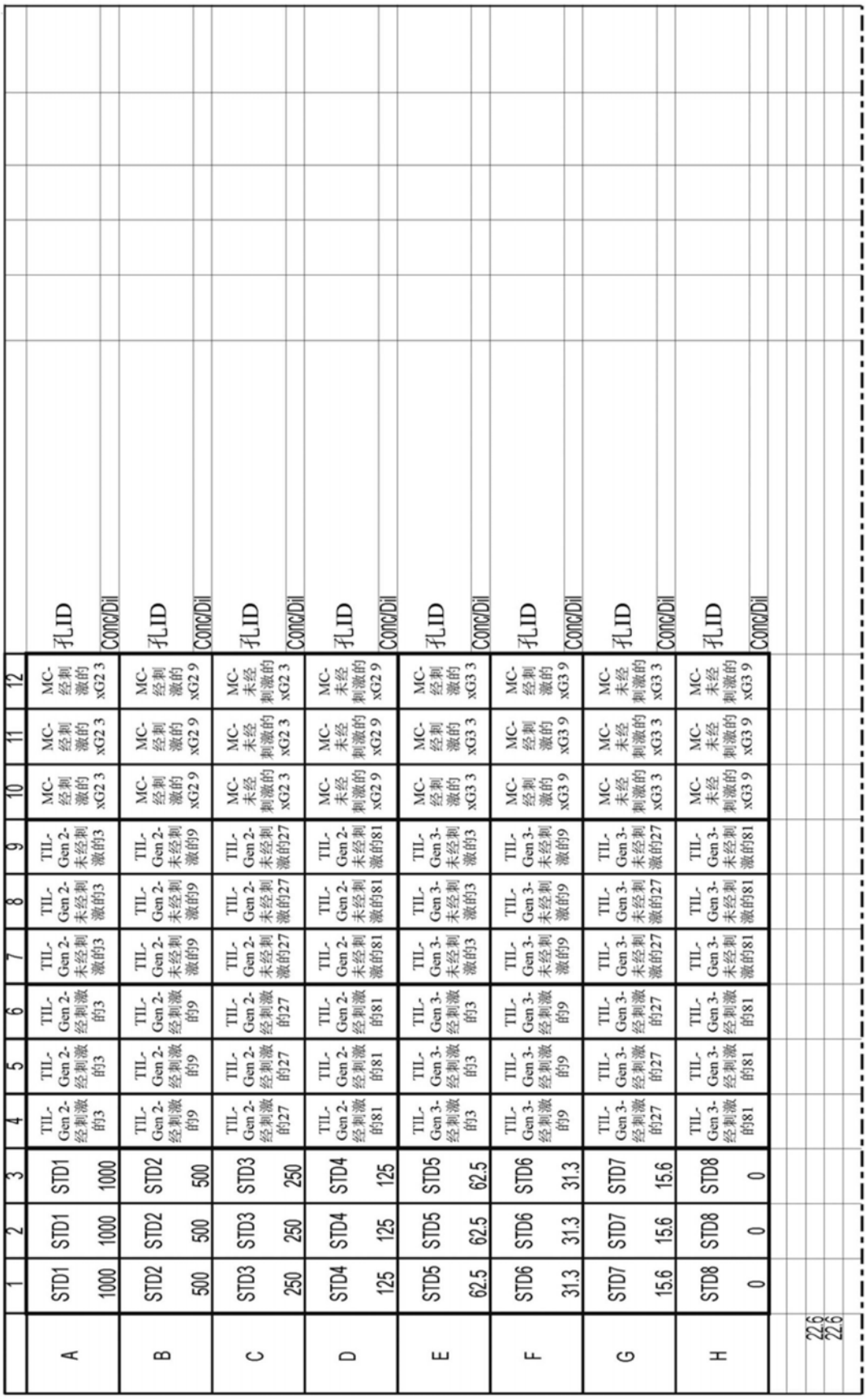
CD3	CD3/CD8						
CD8	CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-	
	77.6	83.2	90.3	20.5	0.013	0.06	79.5
	54.3	88	83.2	4.24	0.026	1.05	94.7

图21



				CD4											
	CD3+		CD4+	2B4+	BTLA+	CD103+	CD25+	CD69+	CD95+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 2-L4054				0.61	99.50	1.05	14.80	43.20	99.40	52.90	2.65	5.36	81.20	88.40	78.60
Gen 3-L4054				1.11	99.50	2.28	21.70	45.40	99.70	56.90	8.06	5.07	76.70	74.10	79.30
Gen 2-L4055				1.61	98.60	1.56	23.10	51.10	99.80	63.30	3.86	15.30	77.60	86.00	79.50
Gen 3-L4055				3.57	99.30	2.61	54.40	57.00	99.90	48.00	8.02	10.80	61.40	47.50	84.60
				CD8											
Gen 2-L4054			CD8+	2B4+	BTLA4+	CD103+	CD25+	CD95+	CD69+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 3-L4054				35.20	99.50	74.90	11.80	99.80	58.30	99.10	8.03	33.10	80.60	99.10	88.30
Gen 2-L4055				45.50	99.60	62.40	12.10	99.90	54.00	99.30	13.40	22.10	64.90	98.50	87.50
Gen 3-L4055				40.60	98.20	19.50	32.00	99.70	75.50	96.80	22.80	27.40	28.10	92.30	75.10
				62.80	99.20	29.20	45.50	99.70	58.80	99.60	13.10	16.60	34.10	71.70	63.60

图22

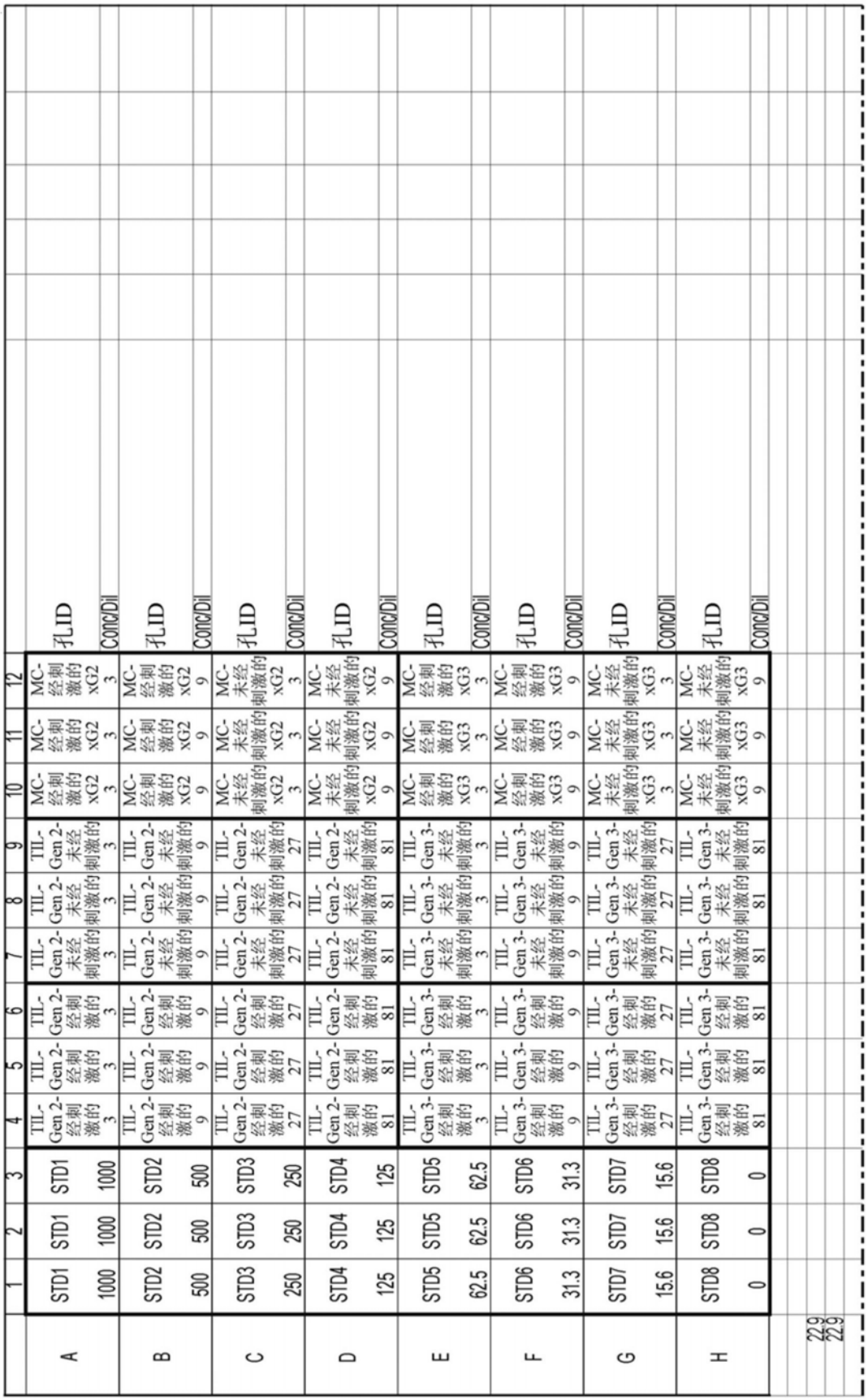


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1 1000	STD1 1000	STD1 1000	TIL-Gen 2-经抑激的3	TIL-Gen 2-经抑激的3	TIL-Gen 2-经抑激的3	TIL-Gen 2-未经抑激的3	TIL-Gen 2-未经抑激的3	TIL-Gen 2-未经抑激的3	MC-经抑激的xG2 3	MC-未经抑激的xG2 3	MC-经抑激的xG2 3	FLID
													Conc/Dil
B	STD2 500	STD2 500	STD2 500	TIL-Gen 2-经抑激的9	TIL-Gen 2-经抑激的9	TIL-Gen 2-经抑激的9	TIL-Gen 2-未经抑激的9	TIL-Gen 2-未经抑激的9	TIL-Gen 2-未经抑激的9	MC-经抑激的xG2 9	MC-未经抑激的xG2 9	MC-经抑激的xG2 9	FLID
													Conc/Dil
C	STD3 250	STD3 250	STD3 250	TIL-Gen 2-经抑激的27	TIL-Gen 2-经抑激的27	TIL-Gen 2-经抑激的27	TIL-Gen 2-未经抑激的27	TIL-Gen 2-未经抑激的27	TIL-Gen 2-未经抑激的27	MC-未经抑激的xG2 3	MC-未经抑激的xG2 3	MC-未经抑激的xG2 3	FLID
													Conc/Dil
D	STD4 125	STD4 125	STD4 125	TIL-Gen 2-经抑激的81	TIL-Gen 2-经抑激的81	TIL-Gen 2-经抑激的81	TIL-Gen 2-未经抑激的81	TIL-Gen 2-未经抑激的81	TIL-Gen 2-未经抑激的81	MC-未经抑激的xG2 9	MC-未经抑激的xG2 9	MC-未经抑激的xG2 9	FLID
													Conc/Dil
E	STD5 62.5	STD5 62.5	STD5 62.5	TIL-Gen 3-经抑激的3	TIL-Gen 3-经抑激的3	TIL-Gen 3-经抑激的3	TIL-Gen 3-未经抑激的3	TIL-Gen 3-未经抑激的3	TIL-Gen 3-未经抑激的3	MC-经抑激的xG3 3	MC-经抑激的xG3 3	MC-经抑激的xG3 3	FLID
													Conc/Dil
F	STD6 31.3	STD6 31.3	STD6 31.3	TIL-Gen 3-经抑激的9	TIL-Gen 3-经抑激的9	TIL-Gen 3-经抑激的9	TIL-Gen 3-未经抑激的9	TIL-Gen 3-未经抑激的9	TIL-Gen 3-未经抑激的9	MC-经抑激的xG3 9	MC-经抑激的xG3 9	MC-经抑激的xG3 9	FLID
													Conc/Dil
G	STD7 15.6	STD7 15.6	STD7 15.6	TIL-Gen 3-经抑激的27	TIL-Gen 3-经抑激的27	TIL-Gen 3-经抑激的27	TIL-Gen 3-未经抑激的27	TIL-Gen 3-未经抑激的27	TIL-Gen 3-未经抑激的27	MC-未经抑激的xG3 3	MC-未经抑激的xG3 3	MC-未经抑激的xG3 3	FLID
													Conc/Dil
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	TIL-Gen 3-经抑激的81	TIL-Gen 3-经抑激的81	TIL-Gen 3-经抑激的81	TIL-Gen 3-未经抑激的81	TIL-Gen 3-未经抑激的81	TIL-Gen 3-未经抑激的81	MC-未经抑激的xG3 9	MC-未经抑激的xG3 9	MC-未经抑激的xG3 9	FLID
													Conc/Dil
	22.6												
	22.6												

图23A

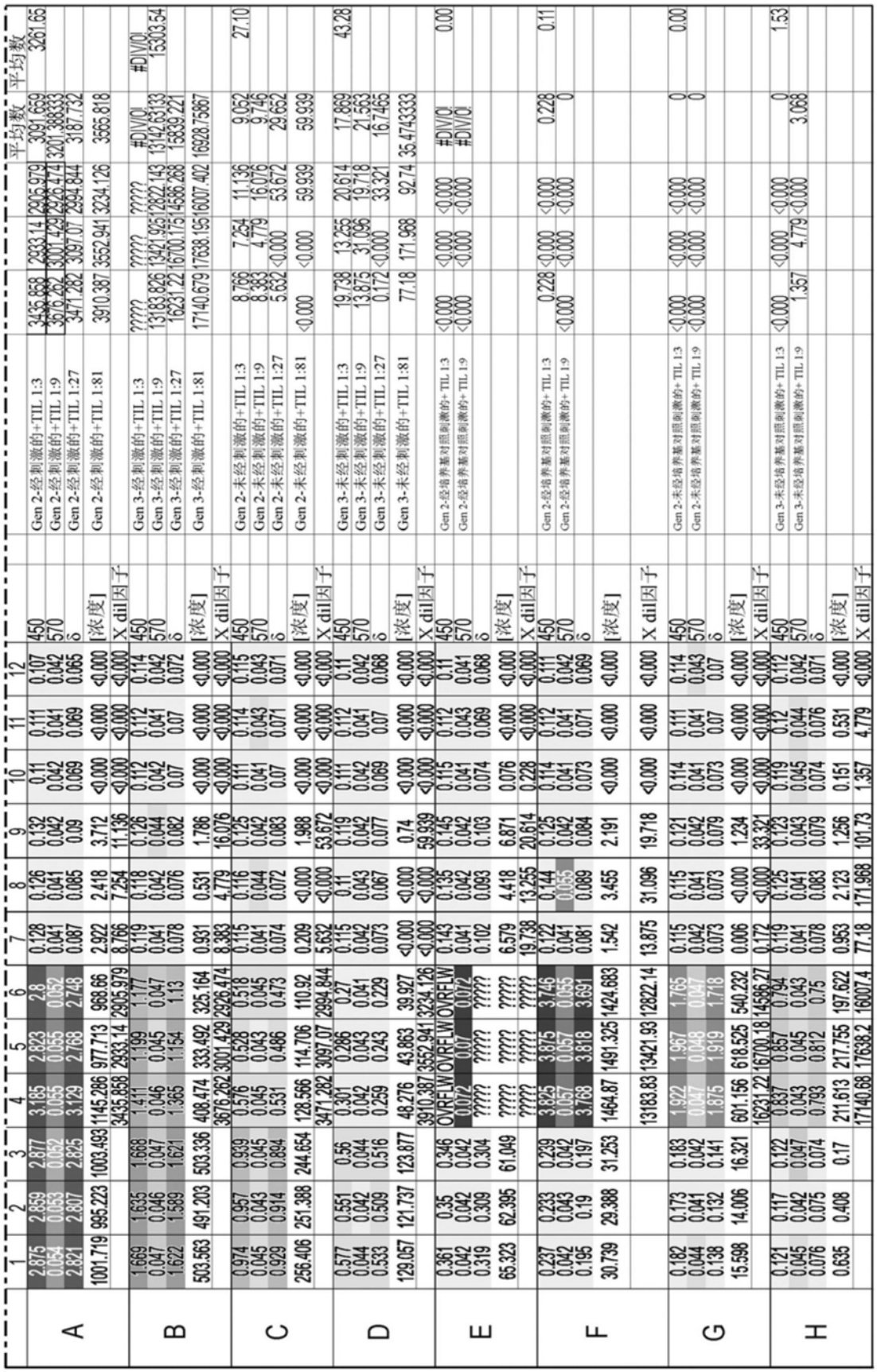
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			平均数	平均数
A	2.866	2.882	2.886	2.797	2.164	2.918	0.117	0.116	0.117	0.105	0.108	0.102	450	Gen 2-经抑激的+TIL 1:3	2890.216	2757.81
	0.05	0.05	0.05	0.05	0.048	0.051	0.041	0.043	0.041	0.041	0.043	0.041	570	Gen 2-经抑激的+TIL 1:9	2297.887	
	2.816	2.832	2.836	2.746	2.117	2.867	0.076	0.074	0.076	0.064	0.065	0.06	δ	Gen 2-经抑激的+TIL 1:27	2952.028	
	994.773	1002.343	1004.079	963.405	894.982	1018.375	1.825	1.421	1.952	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 2-经抑激的+TIL 1:81	3261.251	2929.867
				2890.216	2084.946	3055.126	5.474	4.262	5.855	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
B	1.659	1.654	1.65	1.181	0.9	1.215	0.107	0.107	0.108	0.106	0.105	0.102	450	Gen 3-经抑激的+TIL 1:3	22222	#DIV/0!
	0.046	0.046	0.046	0.045	0.047	0.045	0.042	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	570	Gen 3-经抑激的+TIL 1:9	13273.546	16089.32
	1.613	1.608	1.604	1.136	0.853	1.17	0.066	0.066	0.067	0.062	0.063	0.061	δ	Gen 3-经抑激的+TIL 1:27	16947.994	
	499.666	497.826	496.528	329.765	235.273	341.438	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 3-经抑激的+TIL 1:81	17571.427	17936.8973
				2967.887	2117.46	3072.942	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
C	0.952	0.966	0.94	0.494	0.391	0.505	0.106	0.107	0.107	0.107	0.105	0.103	450	Gen 2-未经刺激的+TIL 1:3	5.474	5.20
	0.044	0.048	0.043	0.042	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	570	Gen 2-未经刺激的+TIL 1:9	<0.000	
	0.908	0.919	0.896	0.452	0.349	0.462	0.066	0.066	0.065	0.063	0.063	0.062	δ	Gen 2-未经刺激的+TIL 1:27	<0.000	
	253.244	256.8	249.399	109.334	78.83	112.411	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 2-未经刺激的+TIL 1:81	<0.000	#DIV/0!
				2952.028	2128.412	3035.11	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
D	0.549	0.541	0.542	0.258	0.218	0.259	0.102	0.101	0.103	0.111	0.102	0.101	450	Gen 3-未经刺激的+TIL 1:3	3.435	19.74
	0.044	0.044	0.043	0.042	0.041	0.047	0.041	0.042	0.042	0.05	0.042	0.043	570	Gen 3-未经刺激的+TIL 1:9	10.304	
	0.505	0.498	0.499	0.216	0.176	0.212	0.06	0.059	0.061	0.061	0.06	0.057	δ	Gen 3-未经刺激的+TIL 1:27	30.239	
	125.458	123.174	123.508	40.262	29.15	39.101	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]	Gen 3-未经刺激的+TIL 1:81	9.644	
				3261.251	2361.138	3167.212	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
E	0.334	0.332	0.332	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.114	0.11	0.113	0.103	0.102	0.104	450	Gen 2-经培养基对照刺激的+TIL 1:3	<0.000	0.00
	0.043	0.042	0.042	0.07	0.068	0.069	0.041	0.041	0.042	0.042	0.042	0.043	570	Gen 2-经培养基对照刺激的+TIL 1:9	<0.000	
	0.291	0.29	0.29	?????	?????	?????	0.073	0.069	0.072	0.062	0.061	0.061	δ			
	61.826	61.537	61.594	?????	?????	?????	1.145	0.285	0.822	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]			
				?????	?????	?????	3.435	0.654	2.465	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
F	0.222	0.222	0.224	3.84	3.895	3.853	0.114	0.104	0.107	0.101	0.103	0.101	450	Gen 2-经培养基对照刺激的+TIL 1:3	<0.000	0.00
	0.042	0.043	0.042	0.058	0.066	0.057	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen 2-经培养基对照刺激的+TIL 1:9	<0.000	
	0.18	0.179	0.181	3.782	3.839	3.796	0.073	0.063	0.066	0.059	0.062	0.059	δ			
	30.212	29.82	30.519	1474.838	>1500.000	1482.263	1.145	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]			
				13273.55	>13500.000	13340.37	10.304	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
G	0.174	0.17	0.172	1.996	1.997	2.017	0.114	0.109	0.114	0.106	0.107	0.104	450	Gen 2-未经培养基对照刺激的+TIL 1:3	<0.000	0.00
	0.041	0.041	0.041	0.048	0.047	0.049	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	570	Gen 2-未经培养基对照刺激的+TIL 1:9	<0.000	
	0.132	0.128	0.131	1.948	1.949	1.968	0.073	0.067	0.073	0.063	0.065	0.062	δ			
	16.911	15.874	16.447	627.703	628.253	635.61	1.12	<0.000	1.17	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]			
				16947.99	16962.84	17161.47	30.239	<0.000	31.588	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子			
H	0.117	0.111	0.114	0.84	0.867	0.857	0.11	0.11	0.115	0.109	0.11	0.113	450	Gen 3-未经培养基对照刺激的+TIL 1:3	<0.000	30.28
	0.045	0.043	0.044	0.044	0.044	0.044	0.041	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	570	Gen 3-未经培养基对照刺激的+TIL 1:9	<0.000	
	0.072	0.068	0.07	0.797	0.822	0.813	0.069	0.068	0.073	0.067	0.067	0.071	δ			
	0.822	0.073	0.405	216.931	225.269	222.13	0.119	0.05	1.145	<0.000	<0.000	0.748	[浓度]			
				17571.43	18246.77	17992.49	9.644	4.039	92.74	<0.000	<0.000	60.557	X dil因子			

图23B



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	TIL-Gen 2-经刺激的3	TIL-Gen 2-经刺激的3	TIL-Gen 2-经刺激的3	TIL-Gen 2-未经刺激的3	TIL-Gen 2-未经刺激的3	TIL-Gen 2-未经刺激的3	MC-经刺激的xG2 3	MC-经刺激的xG2 3	MC-经刺激的xG2 3	fLID
	1000	1000	1000	TIL-Gen 2-经刺激的9	TIL-Gen 2-经刺激的9	TIL-Gen 2-经刺激的9	TIL-Gen 2-未经刺激的9	TIL-Gen 2-未经刺激的9	TIL-Gen 2-未经刺激的9	MC-经刺激的xG2 9	MC-经刺激的xG2 9	MC-经刺激的xG2 9	Conc/Dil
B	STD2	STD2	STD2	TIL-Gen 2-经刺激的27	TIL-Gen 2-经刺激的27	TIL-Gen 2-经刺激的27	TIL-Gen 2-未经刺激的27	TIL-Gen 2-未经刺激的27	TIL-Gen 2-未经刺激的27	MC-未经刺激的xG2 3	MC-未经刺激的xG2 3	MC-未经刺激的xG2 3	fLID
	500	500	500	TIL-Gen 2-经刺激的81	TIL-Gen 2-经刺激的81	TIL-Gen 2-经刺激的81	TIL-Gen 2-未经刺激的81	TIL-Gen 2-未经刺激的81	TIL-Gen 2-未经刺激的81	MC-未经刺激的xG2 9	MC-未经刺激的xG2 9	MC-未经刺激的xG2 9	Conc/Dil
C	STD3	STD3	STD3	TIL-Gen 3-经刺激的3	TIL-Gen 3-经刺激的3	TIL-Gen 3-经刺激的3	TIL-Gen 3-未经刺激的3	TIL-Gen 3-未经刺激的3	TIL-Gen 3-未经刺激的3	MC-经刺激的xG3 3	MC-经刺激的xG3 3	MC-经刺激的xG3 3	fLID
	250	250	250	TIL-Gen 3-经刺激的9	TIL-Gen 3-经刺激的9	TIL-Gen 3-经刺激的9	TIL-Gen 3-未经刺激的9	TIL-Gen 3-未经刺激的9	TIL-Gen 3-未经刺激的9	MC-经刺激的xG3 9	MC-经刺激的xG3 9	MC-经刺激的xG3 9	Conc/Dil
D	STD4	STD4	STD4	TIL-Gen 3-经刺激的27	TIL-Gen 3-经刺激的27	TIL-Gen 3-经刺激的27	TIL-Gen 3-未经刺激的27	TIL-Gen 3-未经刺激的27	TIL-Gen 3-未经刺激的27	MC-未经刺激的xG3 3	MC-未经刺激的xG3 3	MC-未经刺激的xG3 3	fLID
	125	125	125	TIL-Gen 3-经刺激的81	TIL-Gen 3-经刺激的81	TIL-Gen 3-经刺激的81	TIL-Gen 3-未经刺激的81	TIL-Gen 3-未经刺激的81	TIL-Gen 3-未经刺激的81	MC-未经刺激的xG3 9	MC-未经刺激的xG3 9	MC-未经刺激的xG3 9	Conc/Dil
E	STD5	STD5	STD5										fLID
	62.5	62.5	62.5										Conc/Dil
F	STD6	STD6	STD6										fLID
	31.3	31.3	31.3										Conc/Dil
G	STD7	STD7	STD7										fLID
	15.6	15.6	15.6										Conc/Dil
H	STD8	STD8	STD8										fLID
	0	0	0										Conc/Dil

图24A



		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		平均数	平均数
A		2.875	2.859	2.817	3.185	2.823	2.8	0.128	0.126	0.132	0.11	0.111	0.107	Gen 2-经抑激的+TIL 1:3	3435.858	3261.65
		0.064	0.053	0.052	0.055	0.055	0.052	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	Gen 2-经抑激的+TIL 1:9	3616.262	
		2.821	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065	Gen 2-经抑激的+TIL 1:27	3471.282	
		1001.719	995.223	1003.493	1145.286	977.713	968.66	2.922	2.418	3.712	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 2-经抑激的+TIL 1:81	3910.387	
					3435.858	2933.14	2905.979	8.766	7.254	11.136	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
B		1.669	1.635	1.668	1.411	1.199	1.117	0.119	0.118	0.126	0.112	0.112	0.114	450	?????	#DIV/0!
		0.047	0.046	0.047	0.046	0.045	0.047	0.041	0.042	0.044	0.042	0.041	0.042	570	13183.826	15303.54
		1.622	1.589	1.621	1.365	1.154	1.13	0.078	0.076	0.082	0.07	0.07	0.072	δ	16231.22	
		503.563	491.203	503.336	408.474	333.492	325.164	0.931	0.531	1.786	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 3-经抑激的+TIL 1:81	17140.679	
					3676.262	3001.429	2926.474	8.383	4.779	16.076	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
C		0.974	0.957	0.939	0.576	0.528	0.518	0.115	0.116	0.125	0.111	0.114	0.115	450	8.766	27.10
		0.045	0.043	0.045	0.045	0.043	0.045	0.041	0.044	0.042	0.041	0.043	0.043	570	8.383	
		0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071	δ	5.632	
		256.406	251.388	244.654	128.566	114.706	110.92	0.209	<0.000	1.988	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 2-未经抑激的+TIL 1:81	<0.000	
					3471.282	3097.07	2994.844	5.632	<0.000	53.672	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
D		0.577	0.551	0.56	0.301	0.286	0.27	0.115	0.11	0.119	0.111	0.112	0.11	450	19.738	43.28
		0.044	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	570	13.875	
		0.533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068	δ	0.172	
		129.057	121.737	123.877	48.276	43.863	39.927	<0.000	<0.000	0.74	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 3-未经抑激的+TIL 1:81	77.18	
					3910.387	3552.941	3234.126	<0.000	<0.000	59.939	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
E		0.361	0.35	0.346	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.143	0.135	0.145	0.115	0.112	0.11	450	<0.000	0.00
		0.042	0.042	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041	570	<0.000	
		0.319	0.309	0.304	?????	?????	?????	0.102	0.093	0.103	0.074	0.069	0.068	δ		
		65.323	62.395	61.049	?????	?????	?????	6.579	4.418	6.871	0.076	<0.000	<0.000	[浓度]		
					?????	?????	?????	19.738	13.255	20.614	0.228	<0.000	<0.000	X dil因子		
F		0.237	0.233	0.239	3.825	3.815	3.746	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111	450	0.228	0.11
		0.042	0.043	0.042	0.057	0.057	0.055	0.041	0.055	0.042	0.041	0.041	0.042	570	<0.000	
		0.195	0.19	0.197	3.768	3.818	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069	δ		
		30.739	29.388	31.253	1464.87	1491.325	1424.683	1.542	3.455	2.191	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]		
					13183.83	13421.93	12822.14	13.875	31.096	19.718	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
G		0.182	0.173	0.183	1.922	1.937	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114	450	<0.000	0.00
		0.044	0.041	0.042	0.047	0.048	0.047	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043	570	<0.000	
		0.138	0.132	0.141	1.875	1.919	1.748	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07	δ		
		15.598	14.006	16.321	601.156	618.525	540.232	0.006	<0.000	1.234	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]		
					16231.22	16700.18	14586.27	0.172	<0.000	33.321	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
H		0.121	0.117	0.122	0.837	0.857	0.794	0.119	0.125	0.123	0.119	0.12	0.112	450	<0.000	1.53
		0.045	0.042	0.047	0.043	0.045	0.043	0.041	0.041	0.043	0.045	0.044	0.042	570	1.357	
		0.076	0.075	0.074	0.793	0.812	0.75	0.078	0.083	0.079	0.074	0.076	0.071	δ		
		0.635	0.408	0.17	211.613	217.755	197.622	0.953	2.123	1.256	0.151	0.531	<0.000	[浓度]		
					17140.68	17638.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000	X dil因子		

															平均数	平均数
A		2.875	2.859	2.817	3.185	2.823	2.8	0.128	0.126	0.132	0.11	0.111	0.107	Gen 2-经抑激的+TIL 1:3	3435.858	3261.65
		0.064	0.053	0.052	0.055	0.055	0.052	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	Gen 2-经抑激的+TIL 1:9	3616.262	
		2.821	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065	Gen 2-经抑激的+TIL 1:27	3471.282	
		1001.719	995.223	1003.493	1145.286	977.713	968.66	2.922	2.418	3.712	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 2-经抑激的+TIL 1:81	3910.387	
					3435.858	2933.14	2905.979	8.766	7.254	11.136	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
B		1.669	1.635	1.668	1.411	1.199	1.117	0.119	0.118	0.126	0.112	0.112	0.114	450	?????	#DIV/0!
		0.047	0.046	0.047	0.046	0.045	0.047	0.041	0.042	0.044	0.042	0.041	0.042	570	13183.826	15303.54
		1.622	1.589	1.621	1.365	1.154	1.13	0.078	0.076	0.082	0.07	0.07	0.072	δ	16231.22	
		503.563	491.203	503.336	408.474	333.492	325.164	0.931	0.531	1.786	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 3-经抑激的+TIL 1:81	17140.679	
					3676.262	3001.429	2926.474	8.383	4.779	16.076	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
C		0.974	0.957	0.939	0.576	0.528	0.518	0.115	0.116	0.125	0.111	0.114	0.115	450	8.766	27.10
		0.045	0.043	0.045	0.045	0.043	0.045	0.041	0.044	0.042	0.041	0.043	0.043	570	8.383	
		0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071	δ	5.632	
		256.406	251.388	244.654	128.566	114.706	110.92	0.209	<0.000	1.988	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 2-未经抑激的+TIL 1:81	<0.000	
					3471.282	3097.07	2994.844	5.632	<0.000	53.672	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
D		0.577	0.551	0.56	0.301	0.286	0.27	0.115	0.11	0.119	0.111	0.112	0.11	450	19.738	43.28
		0.044	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	570	13.875	
		0.533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068	δ	0.172	
		129.057	121.737	123.877	48.276	43.863	39.927	<0.000	<0.000	0.74	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 3-未经抑激的+TIL 1:81	77.18	
					3910.387	3552.941	3234.126	<0.000	<0.000	59.939	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
E		0.361	0.35	0.346	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.143	0.135	0.145	0.115	0.112	0.11	450	<0.000	0.00
		0.042	0.042	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041	570	<0.000	
		0.319	0.309	0.304	?????	?????	?????	0.102	0.093	0.103	0.074	0.069	0.068	δ		
		65.323	62.395	61.049	?????	?????	?????	6.579	4.418	6.871	0.076	<0.000	<0.000	[浓度]		
					?????	?????	?????	19.738	13.255	20.614	0.228	<0.000	<0.000	X dil因子		
F		0.237	0.233	0.239	3.825	3.815	3.746	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111	450	0.228	0.11
		0.042	0.043	0.042	0.057	0.057	0.055	0.041	0.055	0.042	0.041	0.041	0.042	570	<0.000	
		0.195	0.19	0.197	3.768	3.818	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069	δ		
		30.739	29.388	31.253	1464.87	1491.325	1424.683	1.542	3.455	2.191	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]		
					13183.83	13421.93	12822.14	13.875	31.096	19.718	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
G		0.182	0.173	0.183	1.922	1.937	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114	450	<0.000	0.00
		0.044	0.041	0.042	0.047	0.048	0.047	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043	570	<0.000	
		0.138	0.132	0.141	1.875	1.919	1.748	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07	δ		
		15.598	14.006	16.321	601.156	618.525	540.232	0.006	<0.000	1.234	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]		
					16231.22	16700.18	14586.27	0.172	<0.000	33.321	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
H		0.121	0.117	0.122	0.837	0.857	0.794	0.119	0.125	0.123	0.119	0.12	0.112	450	<0.000	1.53
		0.045	0.042	0.047	0.043	0.045	0.043	0.041	0.041	0.043	0.045	0.044	0.042	570	1.357	
		0.076	0.075	0.074	0.793	0.812	0.75	0.078	0.083	0.079	0.074	0.076	0.071	δ		
		0.635	0.408	0.17	211.613	217.755	197.622	0.953	2.123	1.256	0.151	0.531	<0.000	[浓度]		
					17140.68	17638.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000	X dil因子		

															平均数	平均数
A		2.875	2.859	2.817	3.185	2.823	2.8	0.128	0.126	0.132	0.11	0.111	0.107	Gen 2-经抑激的+TIL 1:3	3435.858	3261.65
		0.064	0.053	0.052	0.055	0.055	0.052	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	Gen 2-经抑激的+TIL 1:9	3616.262	
		2.821	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065	Gen 2-经抑激的+TIL 1:27	3471.282	
		1001.719	995.223	1003.493	1145.286	977.713	968.66	2.922	2.418	3.712	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 2-经抑激的+TIL 1:81	3910.387	
					3435.858	2933.14	2905.979	8.766	7.254	11.136	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
B		1.669	1.635	1.668	1.411	1.199	1.117	0.119	0.118	0.126	0.112	0.112	0.114	450	?????	#DIV/0!
		0.047	0.046	0.047	0.046	0.045	0.047	0.041	0.042	0.044	0.042	0.041	0.042	570	13183.826	15303.54
		1.622	1.589	1.621	1.365	1.154	1.13	0.078	0.076	0.082	0.07	0.07	0.072	δ	16231.22	
		503.563	491.203	503.336	408.474	333.492	325.164	0.931	0.531	1.786	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 3-经抑激的+TIL 1:81	17140.679	
					3676.262	3001.429	2926.474	8.383	4.779	16.076	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
C		0.974	0.957	0.939	0.576	0.528	0.518	0.115	0.116	0.125	0.111	0.114	0.115	450	8.766	27.10
		0.045	0.043	0.045	0.045	0.043	0.045	0.041	0.044	0.042	0.041	0.043	0.043	570	8.383	
		0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071	δ	5.632	
		256.406	251.388	244.654	128.566	114.706	110.92	0.209	<0.000	1.988	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 2-未经抑激的+TIL 1:81	<0.000	
					3471.282	3097.07	2994.844	5.632	<0.000	53.672	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
D		0.577	0.551	0.56	0.301	0.286	0.27	0.115	0.11	0.119	0.111	0.112	0.11	450	19.738	43.28
		0.044	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	570	13.875	
		0.533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068	δ	0.172	
		129.057	121.737	123.877	48.276	43.863	39.927	<0.000	<0.000	0.74	<0.000	<0.000	<0.000	Gen 3-未经抑激的+TIL 1:81	77.18	
					3910.387	3552.941	3234.126	<0.000	<0.000	59.939	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
														[浓度]		
E		0.361	0.35	0.346	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.143	0.135	0.145	0.115	0.112	0.11	450	<0.000	0.00
		0.042	0.042	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041	570	<0.000	
		0.319	0.309	0.304	?????	?????	?????	0.102	0.093	0.103	0.074	0.069	0.068	δ		
		65.323	62.395	61.049	?????	?????	?????	6.579	4.418	6.871	0.076	<0.000	<0.000	[浓度]		
					?????	?????	?????	19.738	13.255	20.614	0.228	<0.000	<0.000	X dil因子		
F		0.237	0.233	0.239	3.825	3.815	3.746	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111	450	0.228	0.11
		0.042	0.043	0.042	0.057	0.057	0.055	0.041	0.055	0.042	0.041	0.041	0.042	570	<0.000	
		0.195	0.19	0.197	3.768	3.818	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069	δ		
		30.739	29.388	31.253	1464.87	1491.325	1424.683	1.542	3.455	2.191	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]		
					13183.83	13421.93	12822.14	13.875	31.096	19.718	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
G		0.182	0.173	0.183	1.922	1.937	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114	450	<0.000	0.00
		0.044	0.041	0.042	0.047	0.048	0.047	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043	570	<0.000	
		0.138	0.132	0.141	1.875	1.919	1.748	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07	δ		
		15.598	14.006	16.321	601.156	618.525	540.232	0.006	<0.000	1.234	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]		
					16231.22	16700.18	14586.27	0.172	<0.000	33.321	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子		
H		0.121	0.117	0.122	0.837	0.857	0.794	0.119	0.125	0.123	0.119	0.12	0.112	450	<0.000	1.53
		0.045	0.042	0.047	0.043	0.045	0.043	0.041	0.041	0.043	0.045	0.044	0.042	570	1.357	
		0.076	0.075	0.074	0.793	0.812	0.75	0.078	0.083	0.079	0.074	0.076	0.071	δ		
		0.635	0.408	0.17	211.613	217.755	197.622	0.953	2.123	1.256	0.151	0.531	<0.000	[浓度]		
					17140.68	17638.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000	X dil因子		

图24B

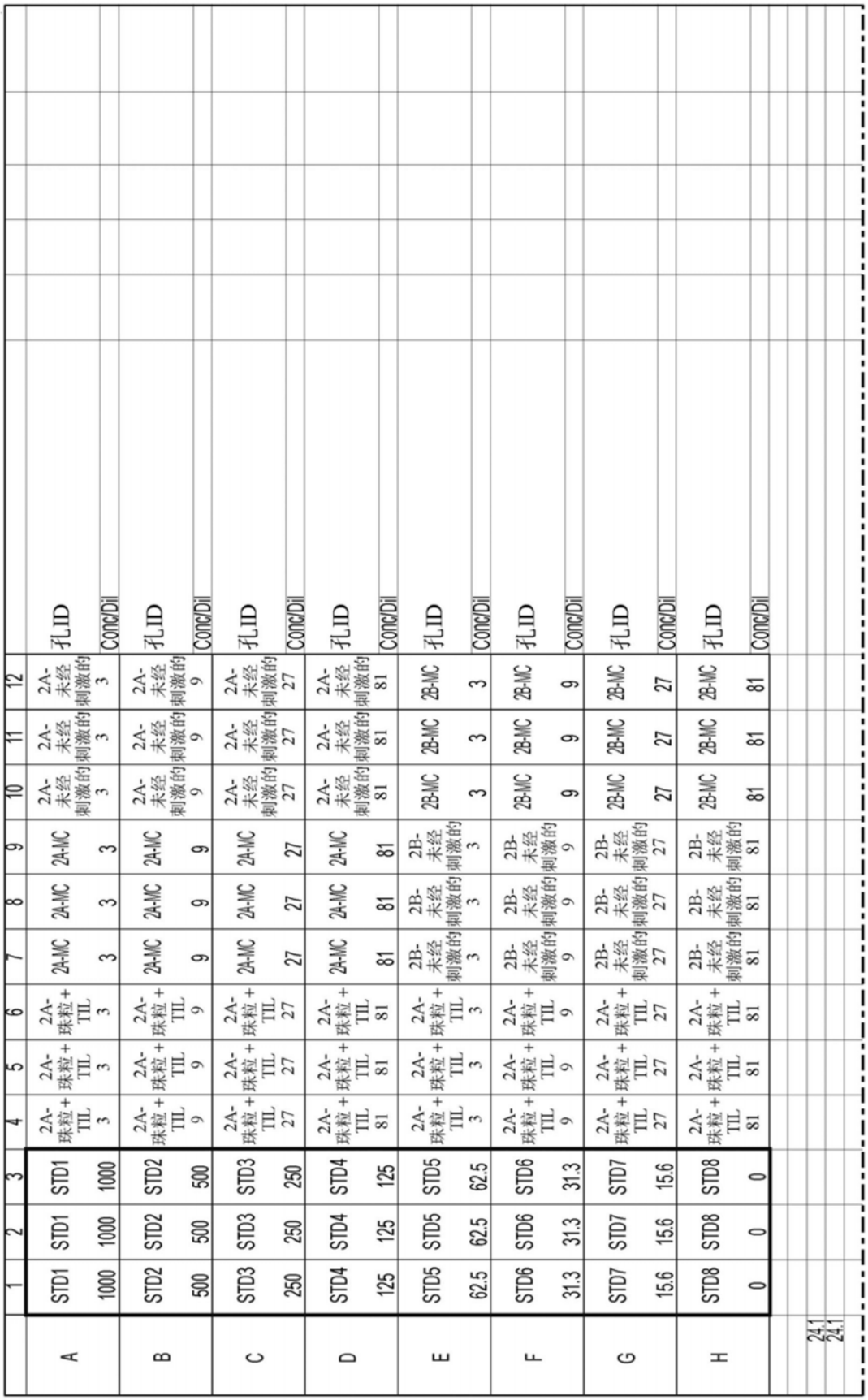
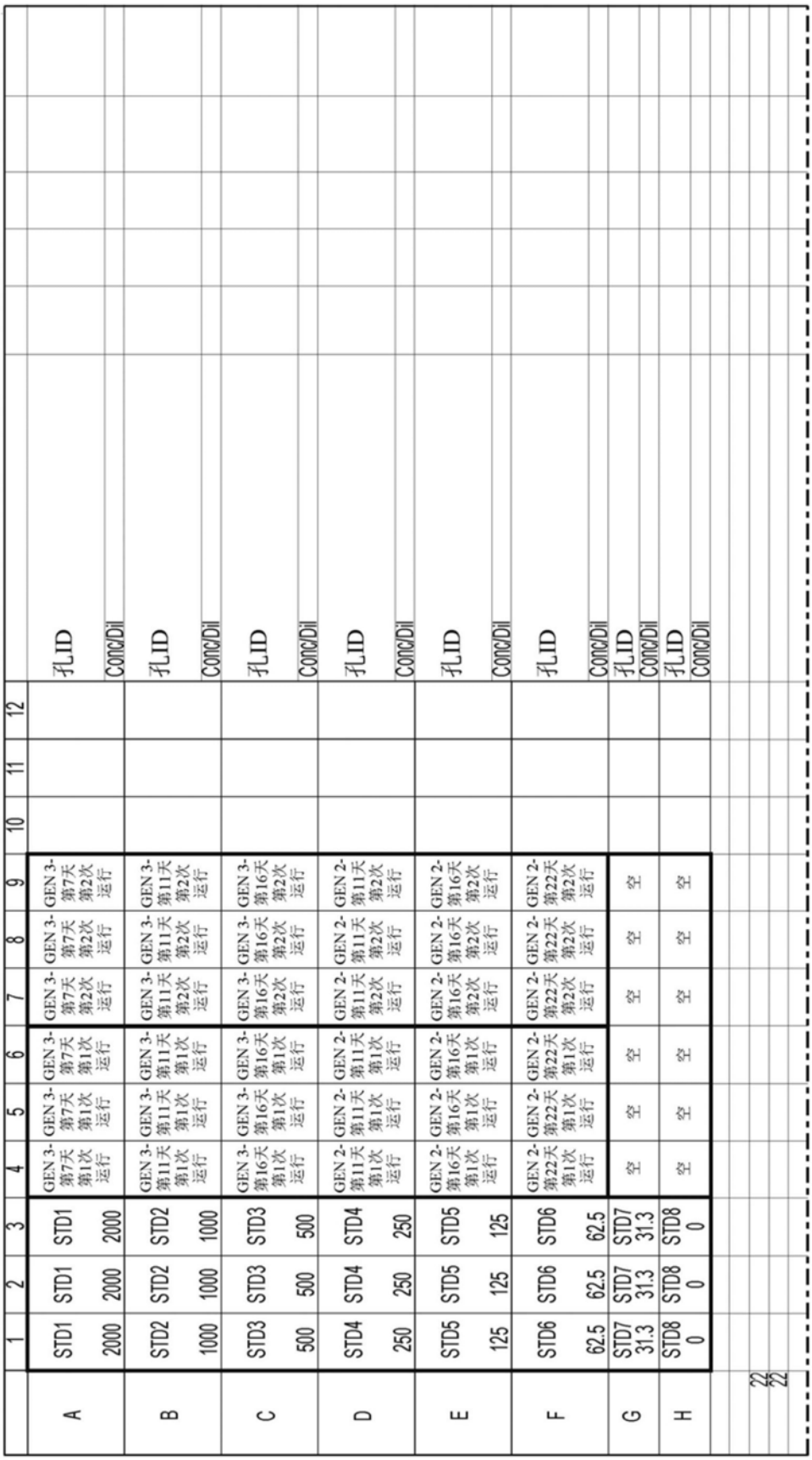

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A STD1 STD1 STD1 2A-珠粒+TIL 3 2A-珠粒+TIL 3 2A-珠粒+TIL 3 2A-MC 3 2A-MC 3 2A-MC 3 2A-未经刺激的 3 2A-未经刺激的 3 2A-未经刺激的 3 孔LID
1000 1000 1000
B STD2 STD2 STD2 2A-珠粒+TIL 9 2A-珠粒+TIL 9 2A-珠粒+TIL 9 2A-MC 9 2A-MC 9 2A-MC 9 2A-未经刺激的 9 2A-未经刺激的 9 2A-未经刺激的 9 孔LID
500 500 500
C STD3 STD3 STD3 2A-珠粒+TIL 27 2A-珠粒+TIL 27 2A-珠粒+TIL 27 2A-MC 27 2A-MC 27 2A-MC 27 2A-未经刺激的 27 2A-未经刺激的 27 2A-未经刺激的 27 孔LID
250 250 250
D STD4 STD4 STD4 2A-珠粒+TIL 81 2A-珠粒+TIL 81 2A-珠粒+TIL 81 2A-MC 81 2A-MC 81 2A-MC 81 2A-未经刺激的 81 2A-未经刺激的 81 2A-未经刺激的 81 孔LID
125 125 125
E STD5 STD5 STD5 2A-珠粒+TIL 3 2A-珠粒+TIL 3 2A-珠粒+TIL 3 2B-未经刺激的 3 2B-未经刺激的 3 2B-未经刺激的 3 2B-MC 3 2B-MC 3 2B-MC 3 孔LID
62.5 62.5 62.5
F STD6 STD6 STD6 2A-珠粒+TIL 9 2A-珠粒+TIL 9 2A-珠粒+TIL 9 2B-未经刺激的 9 2B-未经刺激的 9 2B-未经刺激的 9 2B-MC 9 2B-MC 9 2B-MC 9 孔LID
31.3 31.3 31.3
G STD7 STD7 STD7 2A-珠粒+TIL 27 2A-珠粒+TIL 27 2A-珠粒+TIL 27 2B-未经刺激的 27 2B-未经刺激的 27 2B-未经刺激的 27 2B-MC 27 2B-MC 27 2B-MC 27 孔LID
15.6 15.6 15.6
H STD8 STD8 STD8 2A-珠粒+TIL 81 2A-珠粒+TIL 81 2A-珠粒+TIL 81 2B-未经刺激的 81 2B-未经刺激的 81 2B-未经刺激的 81 2B-MC 81 2B-MC 81 2B-MC 81 孔LID
0 0 0
Conc/DII Conc/DII Conc/DII Conc/DII Conc/DII Conc/DII Conc/DII Conc/DII
24.1
24.1

图25A

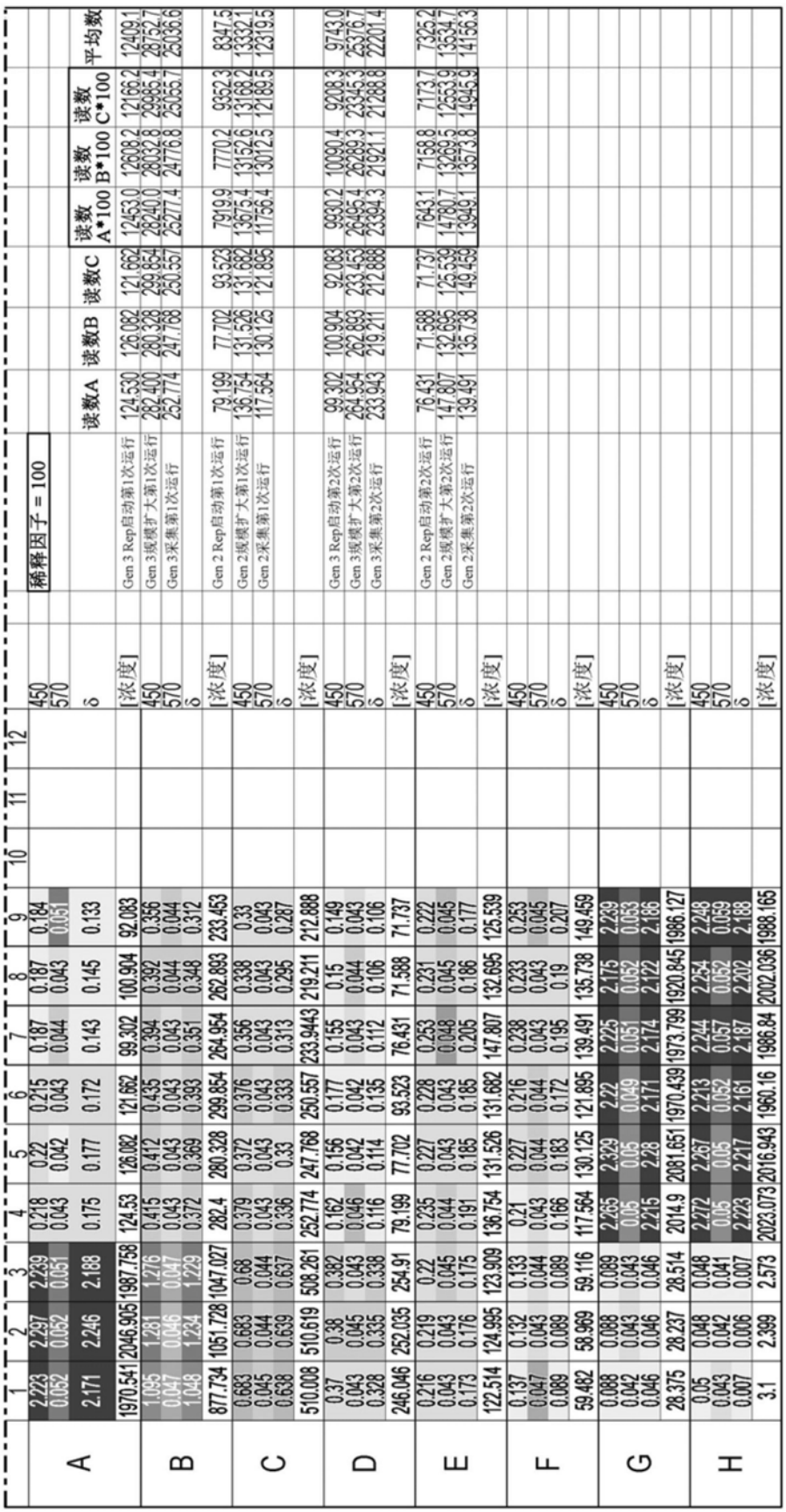
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						平均数	平均数
A	2.119	2.231	2.274	3.051	3.123	3.166	0.079	0.079	0.081	0.18	0.198	0.191	450	2A-珠粒+ TIL 1:3	4656.178	5074.253	5029.349	4919.927	5124.412
	0.048	0.049	0.049	0.052	0.052	0.052	0.042	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	570	2A-珠粒+ TIL 1:9	4916.763	5266.064	5189.955	5124.261	
	2.071	2.182	2.224	3	3.071	3.034	0.037	0.037	0.037	0.1338	0.156	0.149	δ	2A-珠粒+ TIL 1:27	5249.956	5464.506	5272.686	5329.049	
	951.995	1012.581	1035.454	1479.442	>1500.000	>1500.000	0.379	0.287	0.472	37.604	44.509	41.927	[浓度]	2A-珠粒+ TIL 1:81					
				4438.326	>4500.000	>4500.000	1.137	0.861	1.417	112.812	133.527	125.78	X dil因子						
B	1.221	1.22	1.252	1.265	1.361	1.352	0.077	0.077	0.077	0.109	0.115	0.114	450	2B-珠粒+ TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	15061.77
	0.046	0.046	0.046	0.046	0.047	0.047	0.042	0.044	0.042	0.042	0.043	0.042	570	2B-珠粒+ TIL 1:9				#DIV/0!	
	1.175	1.174	1.206	1.219	1.314	1.304	0.035	0.033	0.035	0.067	0.072	0.072	δ	2B-珠粒+ TIL 1:27	15284.891	13019.216	16306.887	14870.33	
														2B-珠粒+ TIL 1:81	16086.64	13205.761	16467.237	15253.21	
	496.244	495.812	511.027	517.353	563.806	558.817	<0.000	<0.000	<0.000	10.74	12.637	12.564	[浓度]						
				4656.178	5074.253	5029.349	<0.000	<0.000	<0.000	96.66	113.737	113.077	X dil因子	2A-未经刺激的+ TIL 1:3	112.812	133.527	125.78	124.0397	107.374
C	0.677	0.881	0.881	0.531	0.563	0.555	0.075	0.074	0.075	0.087	0.096	0.091	450	2A-未经刺激的+ TIL 1:9	96.66	113.737	113.077	107.8247	
	0.043	0.043	0.044	0.044	0.045	0.043	0.042	0.042	0.042	0.045	0.045	0.042	570	2A-未经刺激的+ TIL 1:27	76.848	131.834	113.974	107.552	
	0.634	0.637	0.637	0.488	0.518	0.511	0.033	0.032	0.033	0.045	0.05	0.049	δ	2A-未经刺激的+ TIL 1:81	71.65	82.102	116.487	90.07967	
	245.876	247.384	247.428	182.102	195.039	192.221	<0.000	<0.000	<0.000	2.846	4.883	4.221	[浓度]						
				4916.763	5266.064	5189.955	<0.000	<0.000	<0.000	76.848	131.834	113.974	X dil因子	2B-未经刺激的+ TIL 1:3	317.235	324.909	224.765	288.9797	236.1614
D	0.406	0.405	0.407	0.251	0.257	0.25	0.075	0.075	0.077	0.082	0.081	0.084	450	2B-未经刺激的+ TIL 1:9	286.917	302.211	210.37	266.166	
	0.044	0.043	0.044	0.044	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.044	0.042	0.044	570	2B-未经刺激的+ TIL 1:27	205.324	161.226	93.466	153.3387	
	0.363	0.362	0.363	0.207	0.214	0.208	0.033	0.032	0.035	0.039	0.039	0.04	δ	2B-未经刺激的+ TIL 1:81					
	128.798	128.379	128.798	64.814	67.463	65.095	<0.000	<0.000	<0.000	0.885	1.014	1.438	[浓度]						
				5249.956	5464.506	5272.686	<0.000	<0.000	<0.000	71.65	82.102	116.487	X dil因子	2A-培养基对照1:3	1.137	0.861	1.417	1.138333	1.138778
E	0.244	0.241	0.241	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.35	0.356	0.275	0.078	0.079	0.079	450	2A-培养基对照1:9					
	0.042	0.042	0.042	0.067	0.063	0.066	0.043	0.043	0.043	0.042	0.042	0.043	570	2A-培养基对照1:27					
	0.201	0.199	0.199	?????	?????	?????	0.307	0.314	0.232	0.036	0.036	0.036	δ	2A-培养基对照1:81					
	65.323	61.493	61.533	?????	?????	?????	105.745	108.313	74.922	0.079	0.079	<0.000	[浓度]						
				?????	?????	?????	317.235	324.939	224.765	0.237	0.237	<0.000	X dil因子	2B-培养基对照1:3	0.237	0.953	<0.000	0.595	1.47425
F	0.166	0.165	0.161	3.24	2.828	3.224	0.165	0.17	0.146	0.078	0.079	0.078	450	2B-培养基对照1:9	0.457	4.25	<0.000	2.3535	
	0.042	0.043	0.043	0.055	0.053	0.055	0.043	0.042	0.045	0.042	0.042	0.042	570	2B-培养基对照1:27					
	0.124	0.122	0.119	3.185	2.775	3.169	0.123	0.128	0.101	0.036	0.037	0.035	δ	2B-培养基对照1:81					
	31.999	31.384	30.079	>1500.000	1346.731	>1500.000	31.769	33.579	23.374	0.051	0.472	<0.000	[浓度]						
				>13500.000	12120.579	>13500.000	285.917	302.211	210.37	0.457	4.25	<0.000	X dil因子						
G	0.122	0.119	0.117	1.371	1.194	1.448	0.102	0.097	0.092	0.072	0.072	0.07	450						
	0.043	0.042	0.043	0.052	0.048	0.052	0.043	0.044	0.045	0.043	0.045	0.043	570						
	0.078	0.076	0.074	1.319	1.146	1.396	0.058	0.054	0.046	0.029	0.028	0.027	δ						
	14.956	14.181	13.334	566.107	482.193	603.959	7.605	5.971	3.462	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				15284.891	13019.2	16306.887	205.324	161.226	93.466	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子						
H	0.077	0.084	0.077	0.572	0.489	0.563	0.098	0.082	0.086	0.074	0.073	0.07	450						
	0.042	0.042	0.042	0.046	0.045	0.046	0.049	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	570						
	0.036	0.042	0.036	0.526	0.443	0.537	0.05	0.038	0.043	0.031	0.03	0.027	δ						
	<0.000	2.136	0.023	198.6	163.034	203.299	4.534	0.756	2.305	<0.000	<0.000	<0.000	[浓度]						
				16086.64	13205.761	16467.237	367.254	61.271	186.666	<0.000	<0.000	<0.000	X dil因子						

图25B



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1 2000	STD1 2000	STD1 2000	GEN 3-第7天第1次运行	GEN 3-第7天第1次运行	GEN 3-第7天第1次运行	GEN 3-第7天第2次运行	GEN 3-第7天第2次运行	GEN 3-第7天第2次运行				孔LID Conc/Dil
B	STD2 1000	STD2 1000	STD2 1000	GEN 3-第11天第1次运行	GEN 3-第11天第1次运行	GEN 3-第11天第1次运行	GEN 3-第11天第2次运行	GEN 3-第11天第2次运行	GEN 3-第11天第2次运行				孔LID Conc/Dil
C	STD3 500	STD3 500	STD3 500	GEN 3-第16天第1次运行	GEN 3-第16天第1次运行	GEN 3-第16天第1次运行	GEN 3-第16天第2次运行	GEN 3-第16天第2次运行	GEN 3-第16天第2次运行				孔LID Conc/Dil
D	STD4 250	STD4 250	STD4 250	GEN 2-第11天第1次运行	GEN 2-第11天第1次运行	GEN 2-第11天第1次运行	GEN 2-第11天第2次运行	GEN 2-第11天第2次运行	GEN 2-第11天第2次运行				孔LID Conc/Dil
E	STD5 125	STD5 125	STD5 125	GEN 2-第16天第1次运行	GEN 2-第16天第1次运行	GEN 2-第16天第1次运行	GEN 2-第16天第2次运行	GEN 2-第16天第2次运行	GEN 2-第16天第2次运行				孔LID Conc/Dil
F	STD6 62.5	STD6 62.5	STD6 62.5	GEN 2-第22天第1次运行	GEN 2-第22天第1次运行	GEN 2-第22天第1次运行	GEN 2-第22天第2次运行	GEN 2-第22天第2次运行	GEN 2-第22天第2次运行				孔LID Conc/Dil
G	STD7 31.3	STD7 31.3	STD7 31.3	空	空	空	空	空	空				孔LID Conc/Dil
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	空	空	空	空	空	空				孔LID Conc/Dil

图26A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									
A	2.223	2.297	2.239	0.218	0.22	0.215	0.187	0.187	0.184				450	稀释因子 = 100							
	0.052	0.052	0.051	0.043	0.042	0.043	0.044	0.043	0.051				570								
	2.171	2.246	2.188	0.175	0.177	0.172	0.143	0.145	0.133				δ		读数A	读数B	读数C	读数 A*100	读数 B*100	读数 C*100	平均数
	1970.541	2046.905	1987.758	124.53	126.082	121.662	99.302	100.904	92.083				[浓度]	Gen 3 Rep启动第1次运行	124.530	126.082	121.662	12453.0	12608.2	12166.2	12409.1
B	1.095	1.281	1.276	0.415	0.412	0.435	0.384	0.392	0.356				450	Gen 3规模扩大第1次运行	282.400	280.328	269.854	28240.0	28032.8	26985.4	28252.7
	0.047	0.046	0.047	0.043	0.043	0.043	0.043	0.044	0.044				570	Gen 3采集第1次运行	252.774	247.768	250.557	25277.4	24776.8	25055.7	25036.6
	1.048	1.234	1.229	0.372	0.369	0.393	0.351	0.348	0.312				δ								
	877.734	1051.728	1047.027	282.4	280.328	299.854	264.954	262.893	233.453				[浓度]	Gen 2 Rep启动第1次运行	79.199	77.702	93.523	7919.9	7770.2	9352.3	8347.5
	0.683	0.683	0.68	0.379	0.372	0.376	0.356	0.338	0.33				450	Gen 2规模扩大第1次运行	136.754	131.526	131.682	13675.4	13152.6	13168.2	13332.1
C	0.045	0.044	0.044	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043				570	Gen 2采集第1次运行	117.564	130.125	121.895	11756.4	13012.5	12189.5	12319.5
	0.638	0.639	0.637	0.336	0.33	0.333	0.313	0.295	0.287				δ								
	510.008	510.619	508.261	252.774	247.768	250.557	233.9443	219.211	212.888				[浓度]								
	0.37	0.38	0.382	0.162	0.166	0.177	0.155	0.15	0.149				450	Gen 3 Rep启动第2次运行	99.302	100.904	92.083	9930.2	10090.4	9208.3	9743.0
	0.043	0.045	0.043	0.046	0.042	0.042	0.043	0.044	0.043				570	Gen 3规模扩大第2次运行	264.854	262.893	233.453	26495.4	26289.3	23345.3	25376.7
D	0.328	0.335	0.338	0.116	0.114	0.135	0.112	0.106	0.106				δ	Gen 3采集第2次运行	233.943	219.211	212.888	23394.3	21921.1	21288.8	22201.4
	246.046	252.035	254.91	79.199	77.702	93.523	76.431	71.588	71.737				[浓度]								
	0.216	0.219	0.22	0.235	0.227	0.228	0.253	0.231	0.222				450	Gen 2 Rep启动第2次运行	76.431	71.588	71.737	7643.1	7158.8	7173.7	7325.2
	0.043	0.043	0.045	0.044	0.043	0.043	0.048	0.045	0.045				570	Gen 2规模扩大第2次运行	147.607	132.695	125.539	14780.7	13269.5	12553.9	13534.7
E	0.173	0.176	0.175	0.191	0.185	0.185	0.205	0.186	0.177				δ	Gen 2采集第2次运行	139.491	135.738	149.456	13949.1	13573.8	14945.9	14156.3
	122.514	124.995	123.909	136.754	131.526	131.682	147.807	132.695	125.539				[浓度]								
	0.137	0.132	0.133	0.21	0.227	0.216	0.238	0.233	0.253				450								
F	0.047	0.043	0.044	0.043	0.044	0.044	0.043	0.043	0.045				570								
	0.069	0.069	0.089	0.166	0.183	0.172	0.195	0.19	0.207				δ								
	59.482	58.969	59.116	117.564	130.125	121.895	139.491	135.738	149.459				[浓度]								
	0.088	0.088	0.089	2.265	2.329	2.22	2.225	2.175	2.239				450								
G	0.042	0.043	0.043	0.05	0.05	0.049	0.051	0.052	0.053				570								
	0.046	0.046	0.046	2.215	2.28	2.171	2.174	2.122	2.186				δ								
	28.375	28.237	28.514	2014.9	2081.651	1970.439	1973.799	1920.845	1986.127				[浓度]								
	0.05	0.048	0.048	2.272	2.267	2.213	2.244	2.254	2.248				450								
H	0.043	0.042	0.041	0.05	0.05	0.052	0.057	0.052	0.059				570								
	0.007	0.006	0.007	2.223	2.217	2.161	2.187	2.202	2.188				δ								
	3.1	2.399	2.573	2023.073	2016.943	1960.16	1966.84	2002.036	1988.165				[浓度]								

图26B

样品编号#	描述	葡萄糖（g/L）	乳酸（g/L）	氨（mmol/L）	谷氨酰胺（mmol/L）	Glutamax (mmol/l)	Glutamax-谷氨酰胺（mmol/L）
1	Gen 2-Rep启动第一轮编号L4054	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen 2-规模扩大第一轮编号L4054	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen 2-采集第一轮编号L4054	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen 3-REP启动第一轮编号L4054	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen 3-规模扩大第一轮编号L4054	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen 3-采集第一轮编号L4054	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen 2-Rep启动第二轮编号L4055	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen 2-规模扩大第二轮编号L4055	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen 2-采集第二轮编号L4055	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen 3-REP启动第二轮编号L4055	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen 3-规模扩大第二轮编号L4055	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen 3-采集第二轮编号L4055	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

图27

	$FIL	S/L/1301|几何	S/L/Pt|几何平均值（FL03-A）
A1 gen2L4054阴性fcs	A1 gen2L4054阴性fcs	34.5	3.24
A2 gen2L4054阴性fcs	A2 gen2L4054阴性fcs	34	3.19
A3 gen2L4054阳性fcs	A3 gen2L4054阳性fcs	1834	70.6
A4 gen2L4054阳性fcs	A4 gen2L4054阳性fcs	1872	70.3
A5 gen2L4055阴性fcs	A5 gen2L4055阴性fcs	31.9	4.23
A6 gen2L4055阴性fcs	A6 gen2L4055阴性fcs	32.4	4.87
A7 gen2L4055阳性fcs	A7 gen2L4055阳性fcs	1941	88.7
A8 gen2L4055阳性fcs	A8 gen2L4055阳性fcs	1933	91.1
B1 gen3L4054阴性fcs	B1 gen3L4054阴性fcs	31.2	3.45
B2 gen3L4054阴性fcs	B2 gen3L4054阴性fcs	31.9	3.39
B3 gen3L4054阳性fcs	B3 gen3L4054阳性fcs	2016	61.3
B4 gen3L4054阳性fcs	B4 gen3L4054阳性fcs	2014	76.2
B5 gen3L4055阴性fcs	B5 gen3L4055阴性fcs	33.7	6.76
B6 gen3L4055阴性fcs	B6 gen3L4055阴性fcs	35.4	6.7
B7 gen3L4055阳性fcs	B7 gen3L4055阳性fcs	2158	99.4
B8 gen3L4055阳性fcs	B8 gen3L4055阳性fcs	1938	99.5
平均值	-	998	43.3
SD	-	999	41.3

图28

研究	样品	样品id	物种	链	读段	CDR3	独特CDR3	D50
20180511_研究1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_研究1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_研究1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_研究1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

图29

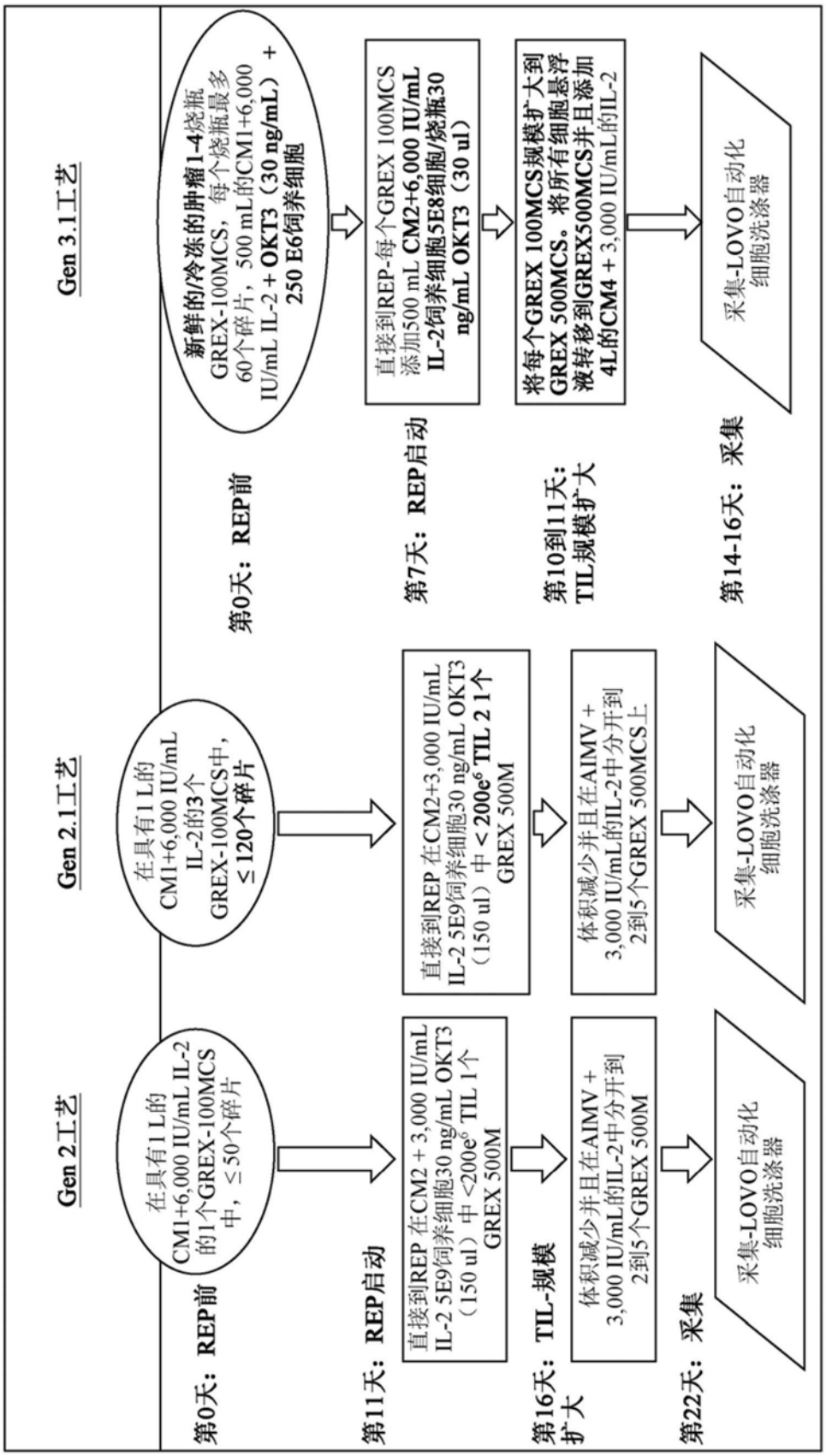
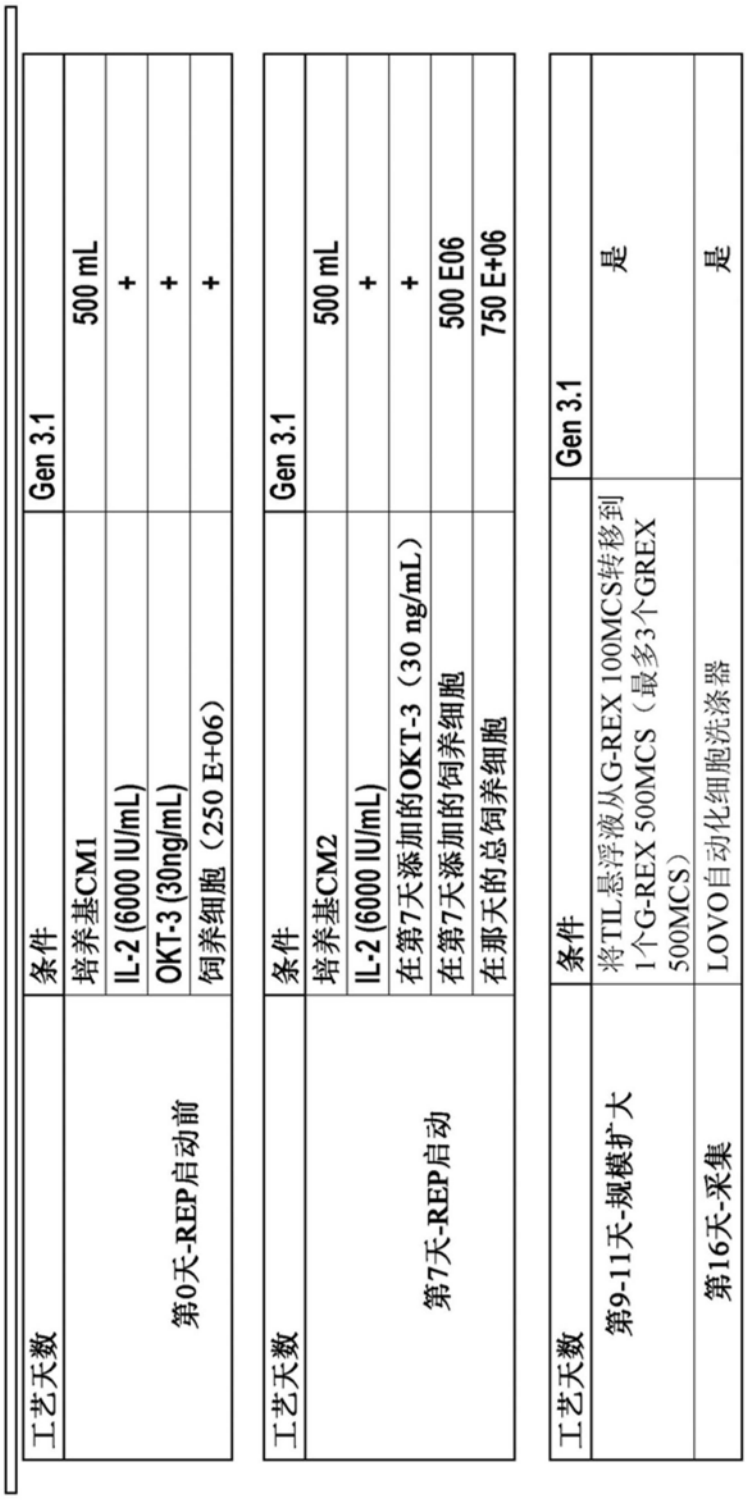

Gen 2工艺
Gen 2.1工艺
Gen 3.1工艺
第0天：REP前
在具有1 L的CM1+6,000 IU/mL IL-2的1个GREX-100MCS中，≤ 50个碎片
在具有1 L的CM1+6,000 IU/mL IL-2的3个GREX-100MCS中，≤ 120个碎片
新鲜的/冷冻的肿瘤1-4烧瓶GREX-100MCS，每个烧瓶最多60个碎片，500 mL的CM1+6,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 250 E6饲养细胞
第11天：REP启动
直接到REP 在CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 5E9饲养细胞30 ng/mL OKT3（150 ul）中 <200e6 TIL 1个 GREX 500M
直接到REP 在CM2+3,000 IU/mL IL-2 5E9饲养细胞30 ng/mL OKT3（150 ul）中 < 200e6 TIL 2 1个 GREX 500M
第16天：TIL-规模扩大
体积减少并且在AIMV + 3,000 IU/mL的IL-2中分开到2到5个GREX 500M
体积减少并且在AIMV + 3,000 IU/mL的IL-2中分开到2到5个GREX 500MCS上
第22天：采集
采集-LOVO自动化细胞洗涤器
采集-LOVO自动化细胞洗涤器
第7天：REP启动
直接到REP-每个GREX 100MCS添加500 mL CM2+6,000 IU/mL IL-2饲养细胞5E8细胞/烧瓶30 ng/mL OKT3（30 ul）
第10到11天：TIL规模扩大
将每个GREX 100MCS规模扩大到GREX 500MCS。将所有细胞悬浮液转移到GREX500MCS并且添加4L的CM4 + 3,000 IU/mL的IL-2
第14-16天：采集
采集-LOVO自动化细胞洗涤器

图30

步骤	Gen 2	Gen 2.1	优化的Gen 3.0
REP前-第0天	≤50个碎片/1个G-Rex 100MCS-**第11天**	≤180个碎片/3G-Rex，预调配的CM1温热培养基100MCS-**第11天**	***新鲜或冷冻的肿瘤*** 具有≤30个碎片到60个碎片的全肿瘤每1个G-Rex. 100 MCS（最多4个G-Rex），预调配的温热培养基-**第7天。REP前，饲养2.5 E8细胞 + OKT-3（30 ng/mL）**
REP启动	直接到REP-第11天-**< 200 E6 TIL** 1 G-Rex 500MCS	直接到REP-**第7天-所有细胞TIL—相同的G-Rex 100MCS（100MC，最多4个GREX），标准培养基或确定成分培养基（无血清）。添加饲养5E8细胞 + OKT-3（30 ng/mL）**	
TIL增殖或规模扩大	1到5个G-REX 500MCS **第16天分开**	直接到REP-第11天-**<200 E6 TIL** 在一个G-Rex 500MCS中预调配的CM2温热培养基 2到5个G-REX 500MCS预调配的CM4温热培养基**第16天分开**	将TIL悬浮液从G-REX 100MCS转移到G-REX 500MCS，最多4个GREX 500MCS标准培养基或确定成分培养基（无血清）**在第10或11天规模扩大**
采集	**第22天采集，**LOVO自动化细胞洗涤器	**第22天采集**，LOVO自动化细胞洗涤器（5次洗涤循环）	**第14或16天采集** LOVO自动化细胞洗涤器（5次洗涤循环）
最终调配	低温保存的产物，含300 IU/ml IL2-CS10的LN_2，多个等分试样	低温保存的产物，含300 IU/ml IL2-CS10的LN_2，多个等分试样	低温保存的产物，含300 IU/ml IL2-CS10的LN_2，多个等分试样
工艺时间	**第22天**	**第22天**	**第16天**

图31



工艺天数	条件	Gen 3.1
第0天-REP启动前	培养基CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	饲养细胞（250 E+06）	+

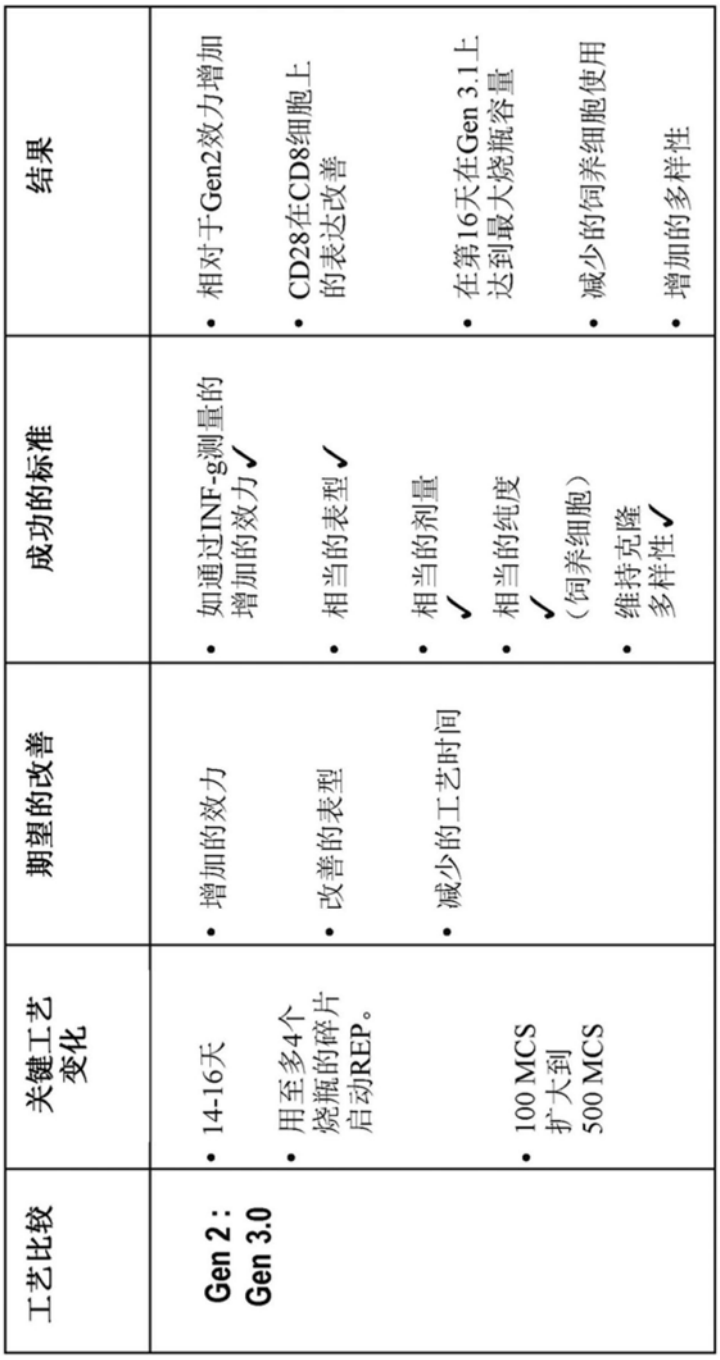
工艺天数	条件	Gen 3.1
第7天-REP启动	培养基CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	在第7天添加的OKT-3（30 ng/mL）	+
	在第7天添加的饲养细胞	500 E06
	在那天的总饲养细胞	750 E+06

工艺天数	条件	Gen 3.1
第9-11天-规模扩大	将TIL悬浮液从G-REX 100MCS转移到1个G-REX 500MCS（最多3个GREX 500MCS）	是
第16天-采集	LOVO自动化细胞洗涤器	是

图32

工艺比较	关键工艺变化	益处
Gen 2：Gen 2.1	• 用两个烧瓶代替一个烧瓶初始化工艺 • 在2个G-Rex500MCS烧瓶之间分配REP启动饲养层 • 使用之前预调配培养基并且温热	• 最终细胞计数的潜在加倍（具有增加的TIL谱的剂量。 • 贯穿整个工艺的过程冗余
Gen 2.1：Gen 3.1	• 新鲜或冷冻的肿瘤 • 14-16天过程（从第22天开始） • 减少工艺上的总饲养层 • 在第0天存在的饲养层和OKT3 • 以碎片启动的REP • 100MCS扩大到500MCS • 扩大到多个REP前烧瓶 • 标准培养基和确定成分培养基（无血清）	• 增加的效力 • 改善的表型 • 减少的工艺时间 • 减少的试剂测试 • 减少的工艺变异性 • 确认成分的试剂 • 增加的谱 • 减少杂质（饲养细胞） • 相当或较高剂量。

图33



工艺比较	关键工艺变化	期望的改善	成功的标准	结果
Gen 2：Gen 3.0	• 14-16天 • 用至多4个烧瓶的碎片启动REP。 • 100 MCS扩大到500 MCS	• 增加的效力 • 改善的表型 • 减少的工艺时间	• 如通过INF-g测量的增加的效力✓ • 相当的表型✓ • 相当的剂量✓ • 相当的纯度✓（饲养细胞） • 维持克隆多样性✓	• 相对于Gen2效力增加 • CD28在CD8细胞上的表达改善 • 在第16天在Gen 3.1上达到最大烧瓶容量 • 减少的饲养细胞使用 • 增加的多样性

图34

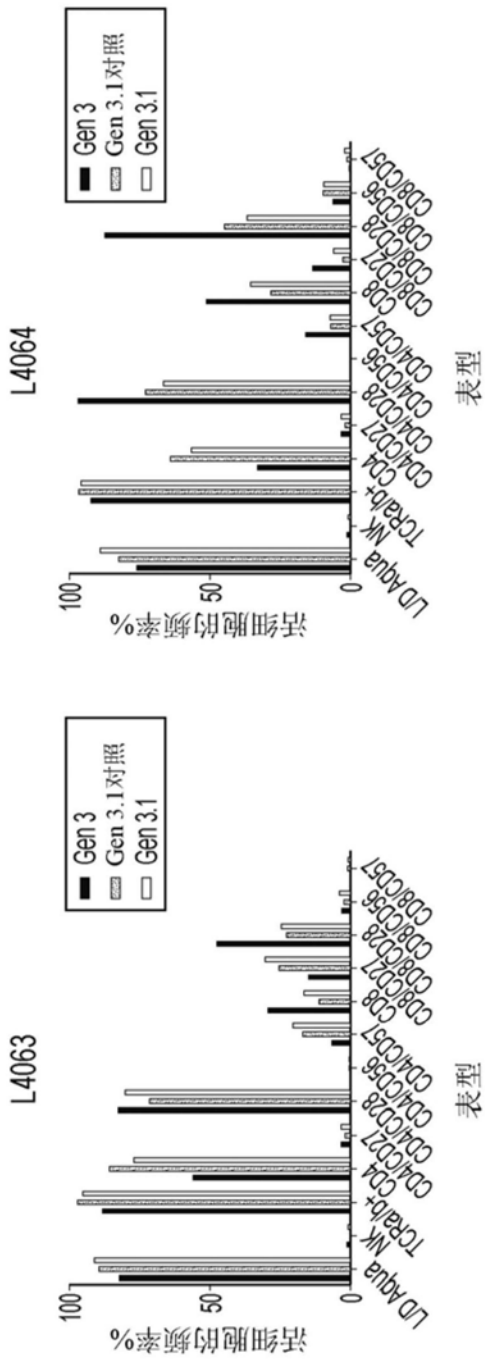
工艺	Gen 2	Gen 3
L4054	标准培养基	标准培养基
L4055	标准培养基	标准培养基
M1085T	标准培养基	标准培养基

标准培养基：
REP前：CM1
REP启动：CM2
分开或规模扩大：CM4

工艺	Gen 3	Gen 3.1对照	Gen 3.1
L4063	标准培养基	标准培养基	标准培养基
L4064	确定成分的培养基	确定成分的培养基	确定成分的培养基

确定成分的培养基：
在工艺的每一天的CTS优化器（无血清培养基）

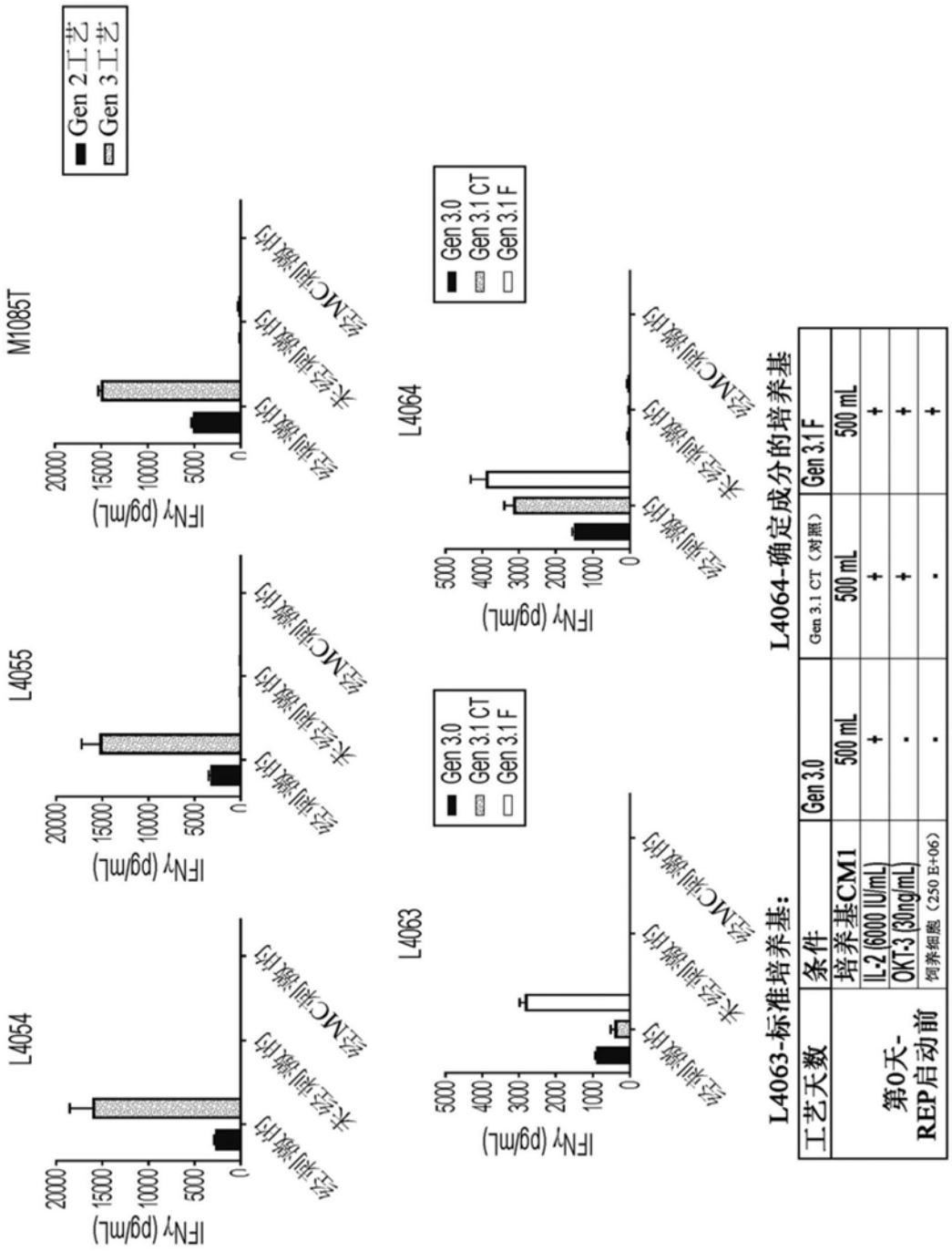
图35



肿瘤ID	L4063标准培养基			L4064确定成分的培养基		
工艺	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1
碎片数量	53	53	53	21	21	21

肿瘤ID	标准培养基中的L4063			CTS优化器培养基中的L4064		
工艺	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1 测试	Gen 3.0	Gen 3.1对照	Gen 3.1测试
碎片的数量	53	53	53	21	21	21
平均TVC每碎片	1.37E+08	3.19E+08	3.53E+08	5.90E+08	7.57E+08	9.29E+08
采集时的活力%	79.53%	89.43%	94.80%	88.80%	81.90%	84.90%
TVC采集	7.26E+09	1.69E+10	1.87E+10*	1.24E+10	1.59E+10	1.95E+10*

图36



L4063-标准培养基：

工艺天数	条件	Gen 3.0
第0天-REP启动前	培养基CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	-
	饲养细胞（250 E+06）	-

L4064-确定成分的培养基

Gen 3.1 CT（对照）	Gen 3.1 F
500 mL	500 mL
+	+
+	+
-	+

图37

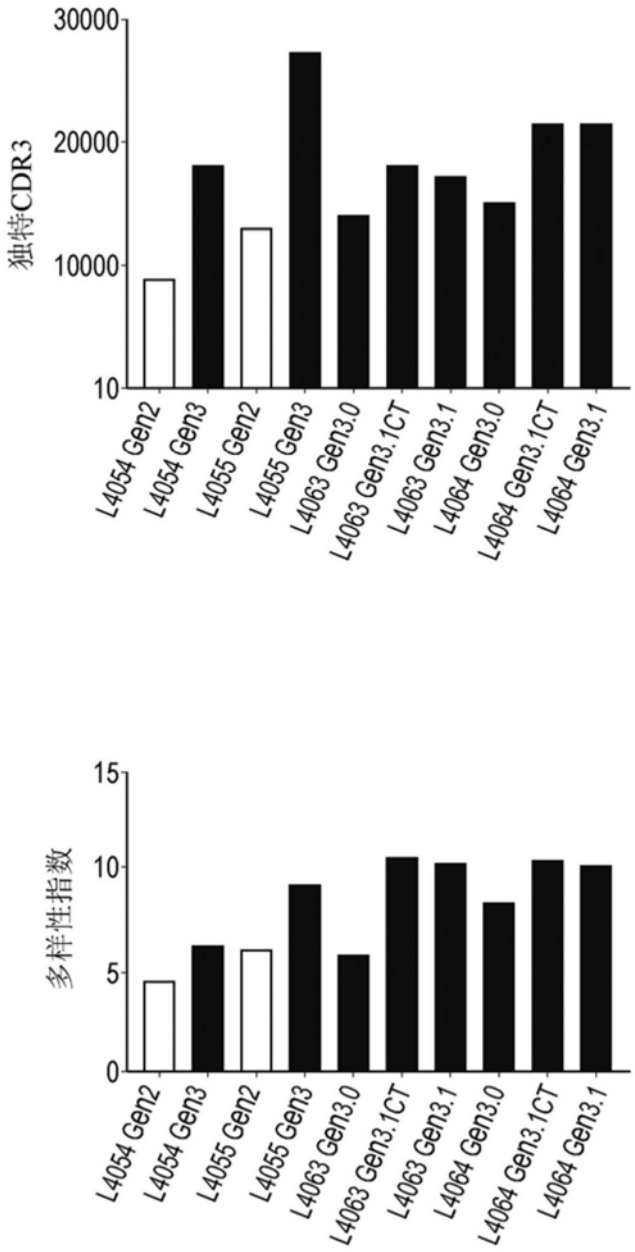
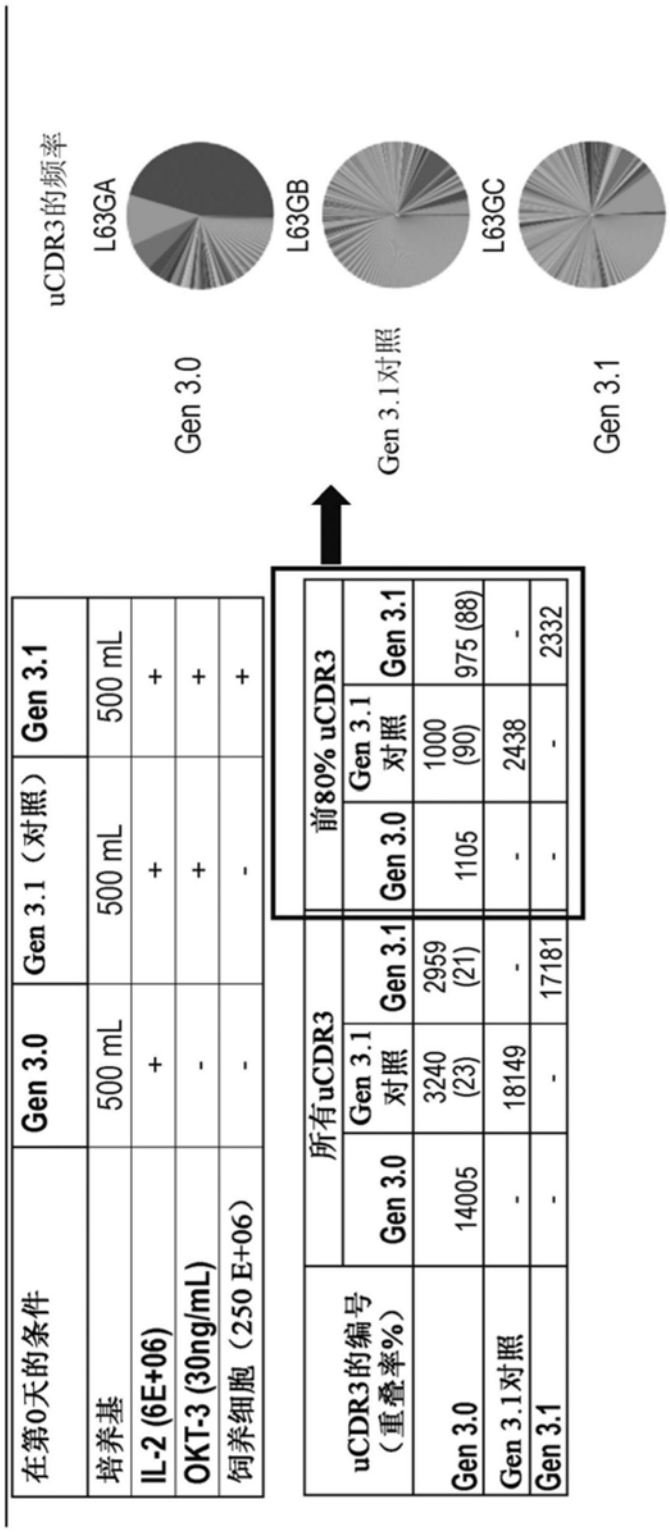

30000
20000
10000
10
独特CDR3
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1
15
10
5
0
多样性指数
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1

图38



在第0天的条件	Gen 3.0	Gen 3.1（对照）	Gen 3.1
培养基	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
饲养细胞（250 E+06）	-	-	+

uCDR3的编号（重叠率%）	所有uCDR3			前80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 对照	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1对照	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

图39

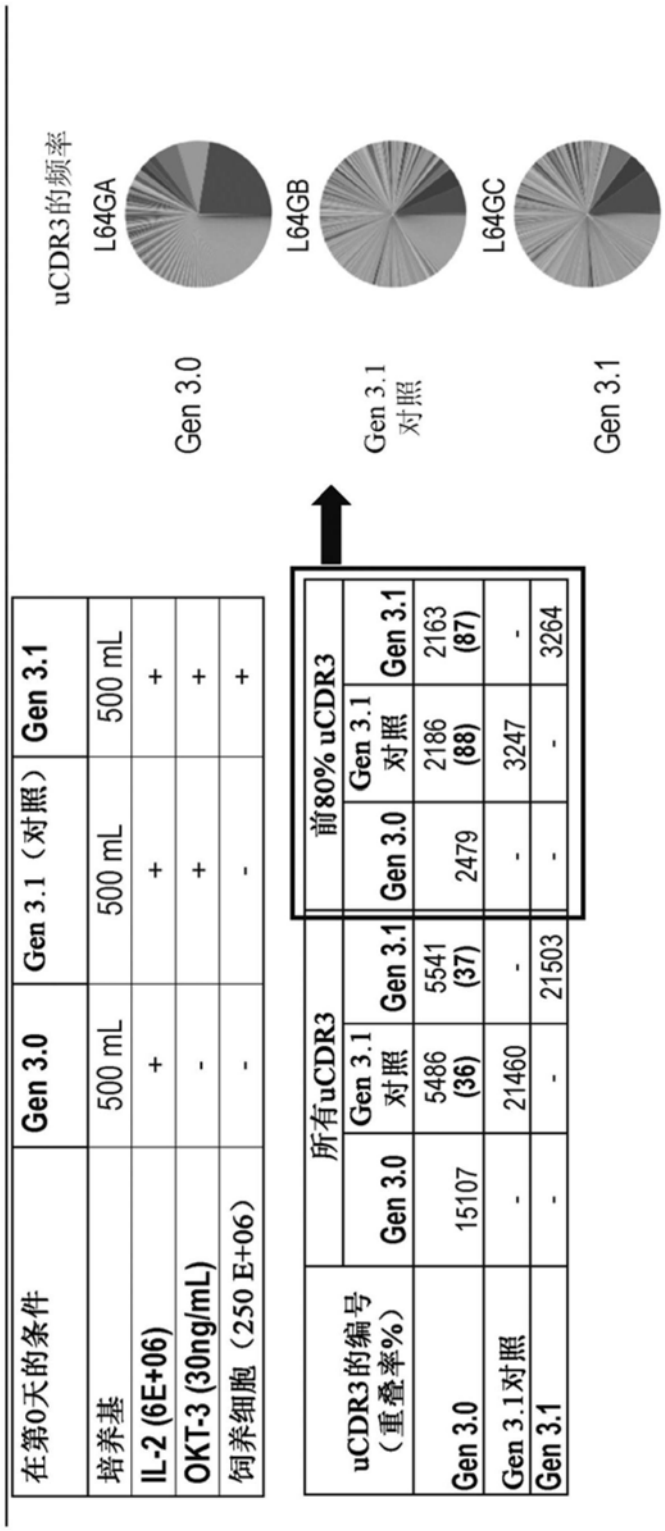

在第0天的条件
Gen 3.0
Gen 3.1（对照）
Gen 3.1
培养基
500 mL
500 mL
500 mL
IL-2 (6E+06)
+
+
+
OKT-3 (30ng/mL)
-
+
+
饲养细胞（250 E+06）
-
-
+
uCDR3的编号（重叠率%）
所有uCDR3
前80% uCDR3
Gen 3.0
Gen 3.1 对照
Gen 3.1
Gen 3.0
Gen 3.1 对照
Gen 3.1
Gen 3.0
15107
5486 (36)
5541 (37)
2479
2186 (88)
2163 (87)
Gen 3.1对照
-
21460
-
-
3247
-
Gen 3.1
-
-
21503
-
-
3264
uCDR3的频率
L64GA
L64GB
L64GC
Gen 3.0
Gen 3.1 对照
Gen 3.1

图40

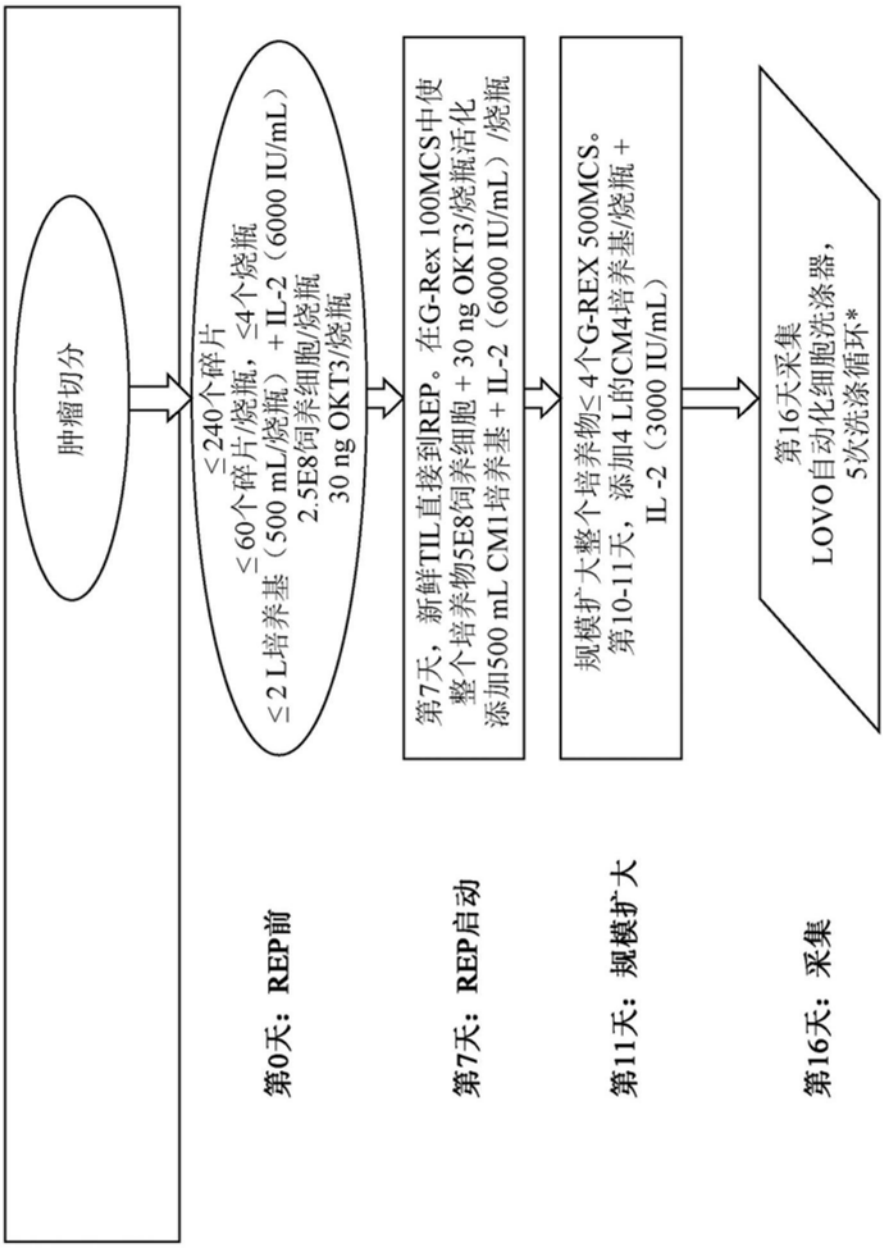

肿瘤切分
第0天：REP前
≤240个碎片
≤60个碎片/烧瓶，≤4个烧瓶
≤2 L培养基（500 mL/烧瓶）+IL-2（6000 IU/mL）
2.5E8饲养细胞/烧瓶
30 ng OKT3/烧瓶
第7天：REP启动
第7天，新鲜TIL直接到REP。在G-Rex 100MCS中使
整个培养物5E8饲养细胞 + 30 ng OKT3/烧瓶活化
添加500 mL CM1培养基 + IL-2（6000 IU/mL）/烧瓶
第11天：规模扩大
规模扩大整个培养物≤4个G-REX 500MCS。
第10-11天，添加4 L的CM4培养基/烧瓶 +
IL -2（3000 IU/mL）
第16天：采集
第16天采集
LOVO自动化细胞洗涤器，
5次洗涤循环*

图41

第0天
•在温和MACS OctoDissociator上消化经碎裂的肿瘤持续1小时
•从全肿瘤消化物中留出细胞以进行对照扩增
•冷冻全肿瘤消化物的另一部分，以得到最终产物的肿瘤反应性
•对细胞进行染色以得到PD1、CD3和活/死状态
•使用FX500仪器（索尼，美国），分选PD1-高和PD1-阴性细胞
•在G-Rex 24或G-Rex 10中启动分选的细胞和全消化物的培养物以进行REP1（用OKT 3+饲养细胞培养11天）
第11天
•体积减少板/烧瓶、计数和采集
•在G-Rex 10、G-Rex 100M中启动REP1产物（PD-1+、PD-1-和全消化物）的培养物以进行REP2（11天）
•冷冻剩余的细胞
第16天
•体积减少培养基
•用新鲜培养基（CM2或CM3）补充培养物
第22天
•体积减少培养基、细胞计数和采集最终产物
•对所采集的REP2产物运行以下测定
•细胞计数，活力
•表型（TIL1、TIL2、TIL3）
•CD107a
•IFNγ（再刺激测定）
•TCRvβ（通过流式细胞术）
•TCRvβ（冷冻1e6以通过iRepetoire进行RNA测序）
•肿瘤反应性（共培养测定）和细胞杀伤测定（X-Celligence系统）

图42

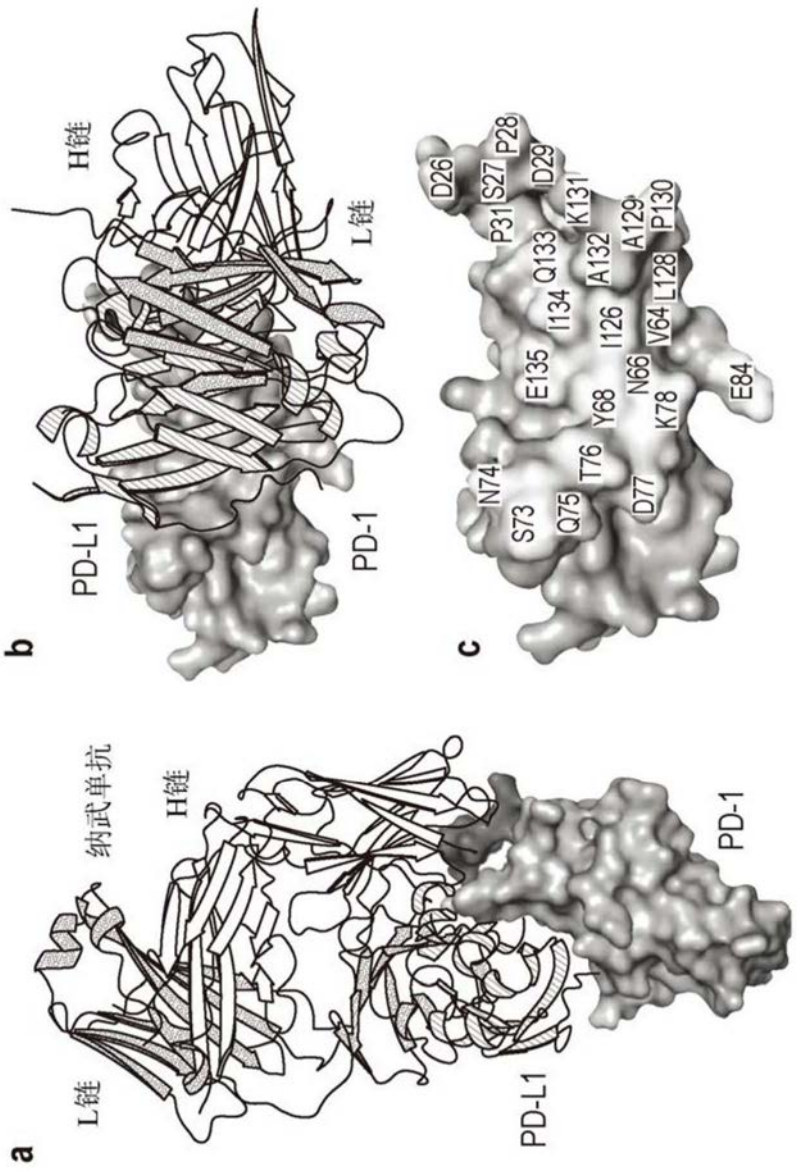

a
L链
纳武单抗
H链
PD-L1
PD-1
b
H链
L链
PD-L1
PD-1
c
D26
S27
P28
P31
D29
K131
A129
P130
Q133
A132
I134
I126
L128
V64
E135
N66
E84
Y68
K78
N74
T76
S73
Q75
D77

图43

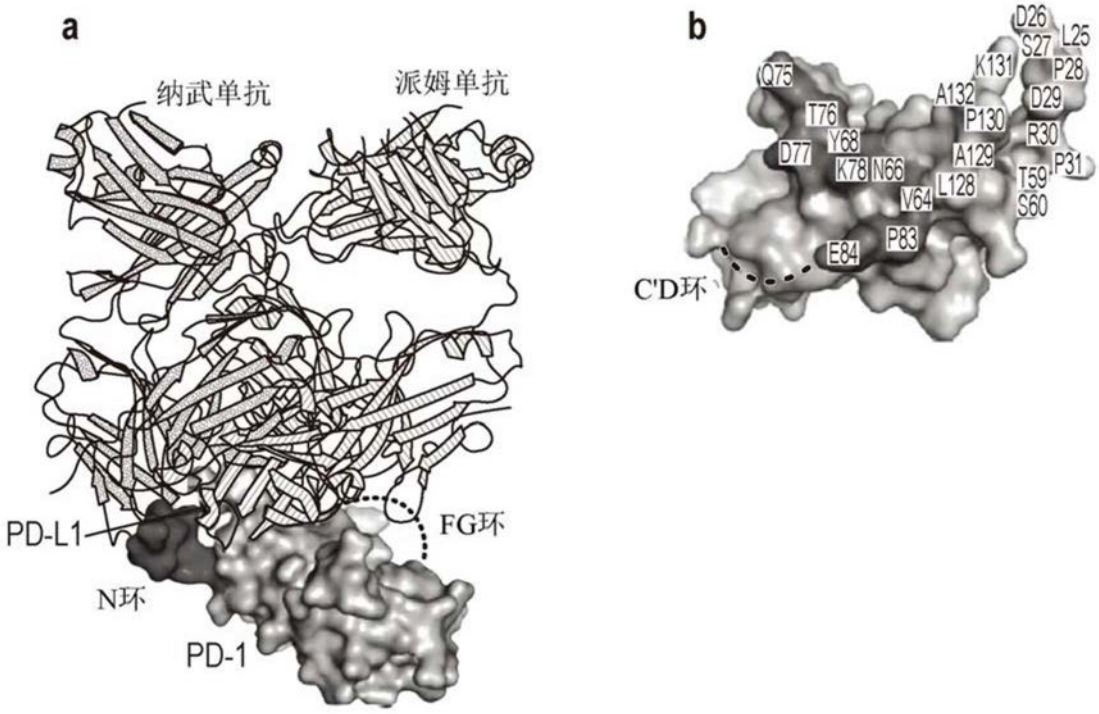

a
纳武单抗
派姆单抗
PD-L1
FG环
N环
PD-1
b
D26
S27
L25
K131
P28
Q75
A132
D29
T76
P130
R30
Y68
D77
A129
P31
K78
N66
T59
L128
S60
V64
P83
E84
C'D环

图44

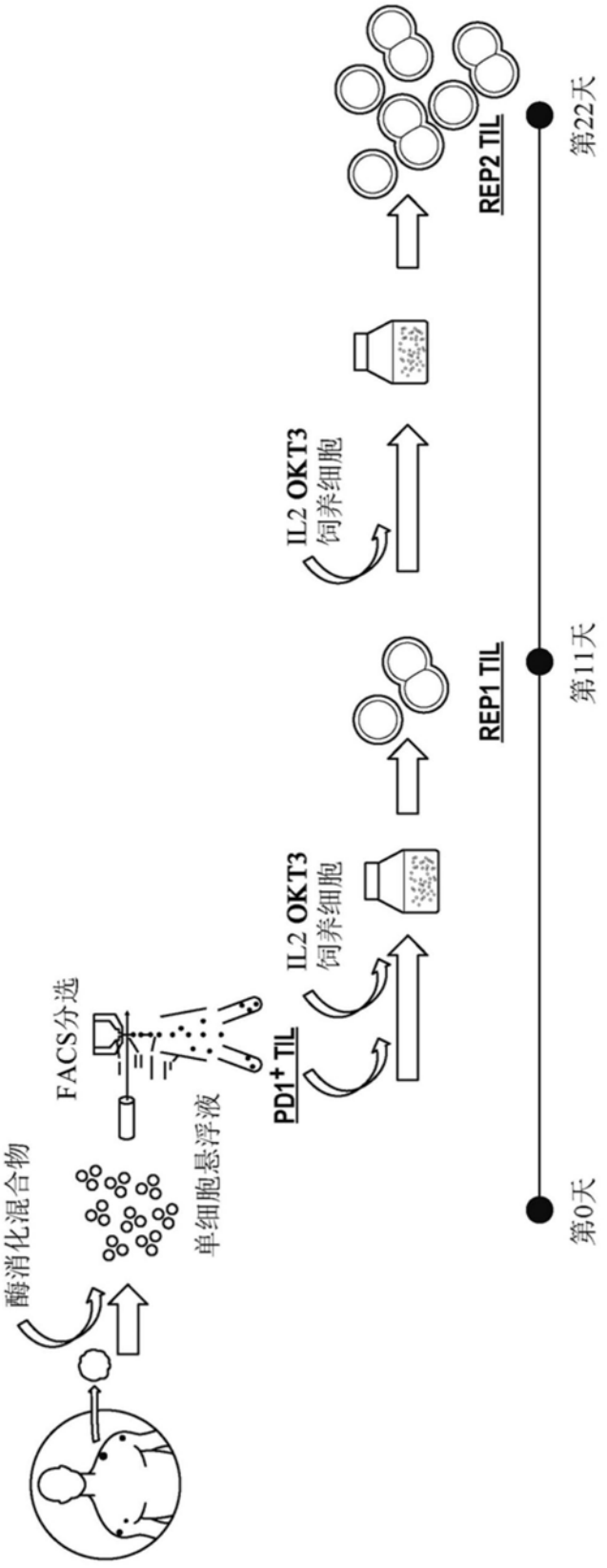

酶消化混合物
FACS分选
单细胞悬浮液
PD1+ TIL
IL2 OKT3
饲养细胞
REP1 TIL
IL2 OKT3
饲养细胞
REP2 TIL
第0天
第11天
第22天

图45

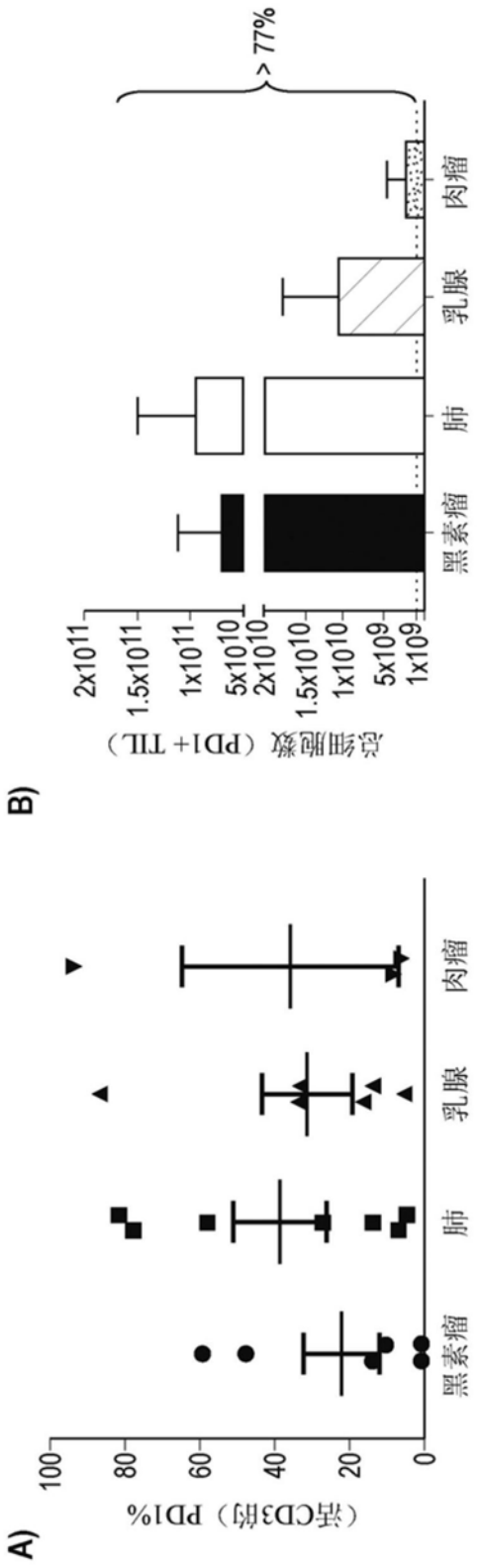

A)
（活CD3的）PD1%
100
80
60
40
20
0
黑素瘤
肺
乳腺
肉瘤
B)
总细胞数（PD1+ TIL）
2x10^11
1.5x10^11
1x10^11
5x10^10
2x10^10
1.5x10^10
1x10^10
5x10^9
1x10^9
> 77%
黑素瘤
肺
乳腺
肉瘤

图46

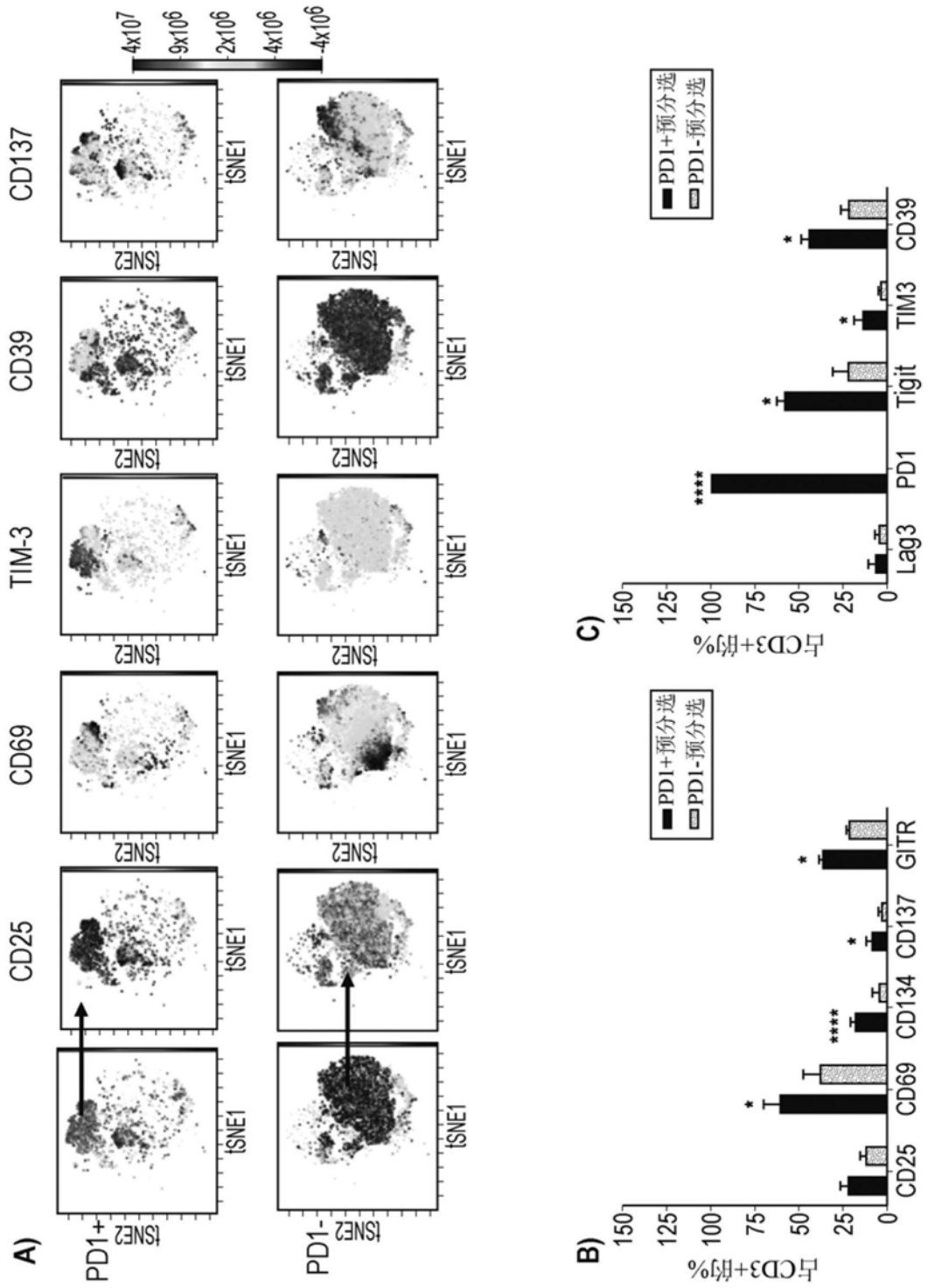

A)
CD25
CD69
TIM-3
CD39
CD137
PD1+
PD1-
tSNE1
tSNE2
4x10^7
9x10^6
2x10^6
4x10^6
4x10^6
B)
C)
占CD3+的%
PD1+预分选
PD1-预分选
CD25
CD69
CD134
CD137
GITR
Lag3
PD1
Tigit
TIM3
CD39
0
25
50
75
100
125
150
*
****

图47

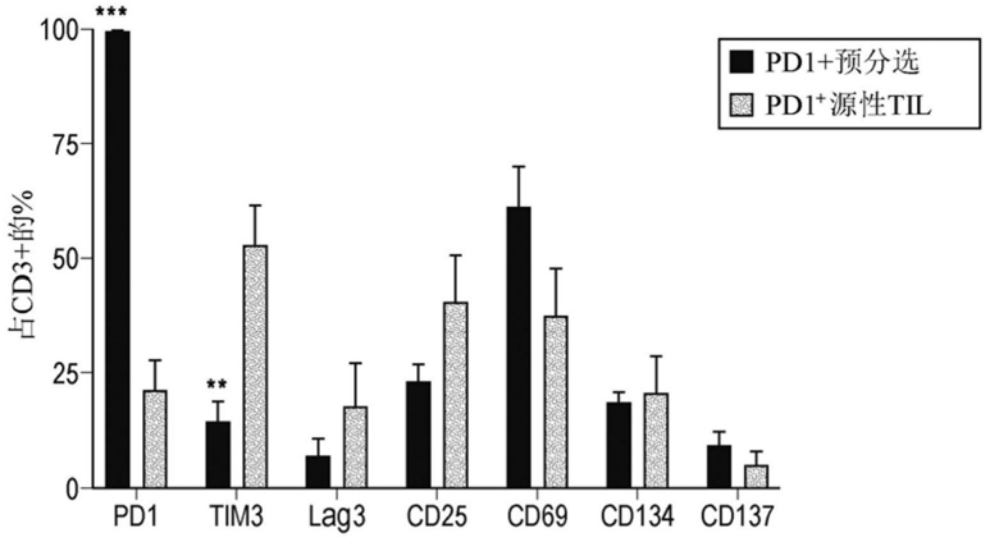

***
**
100
75
50
25
0
占CD3+的%
PD1+预分选
PD1+源性TIL
PD1
TIM3
Lag3
CD25
CD69
CD134
CD137

图48

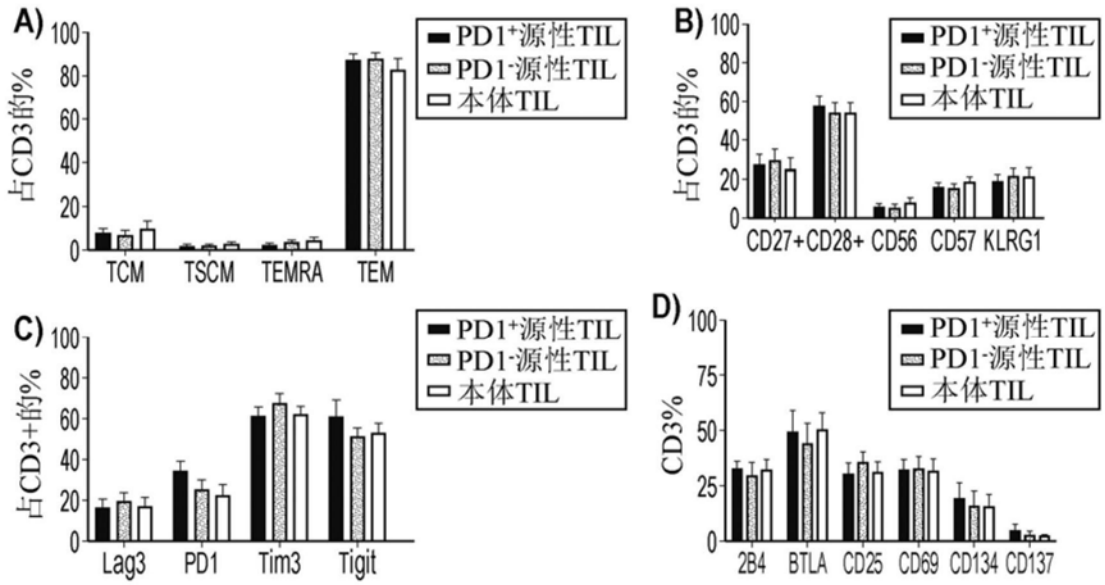
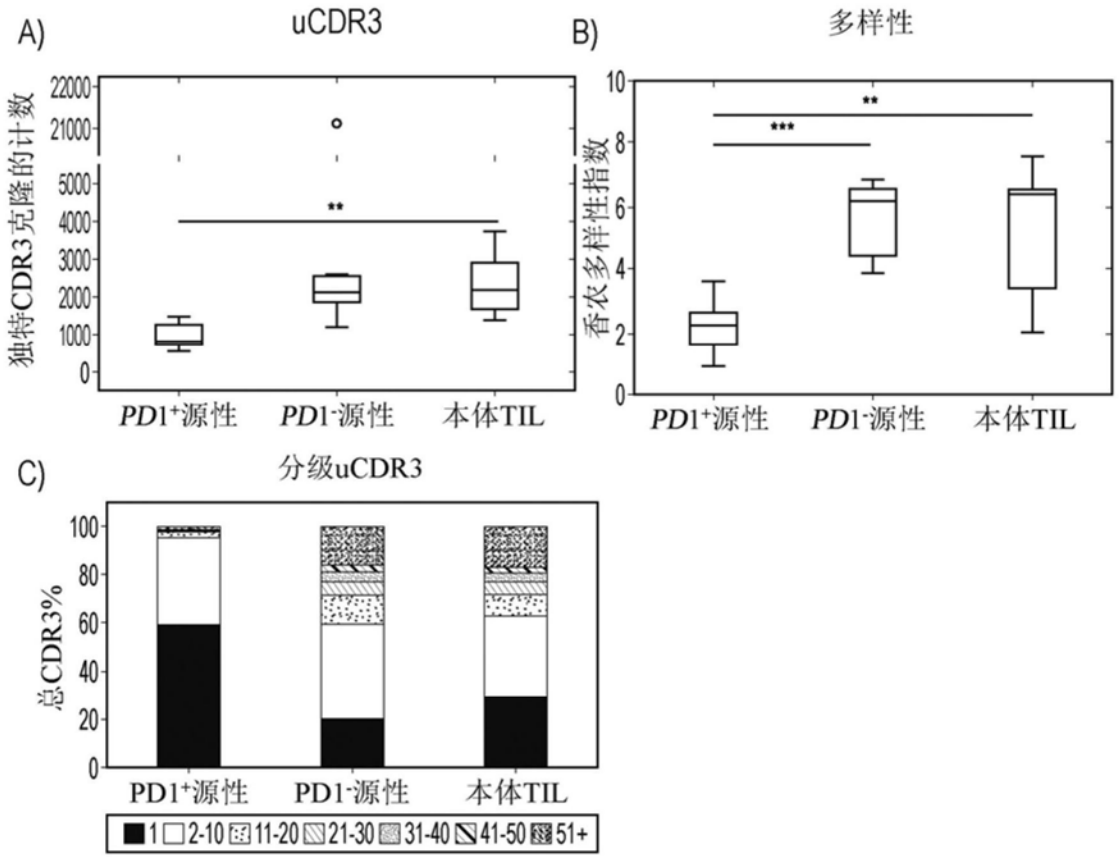

A)
占CD3的%
PD1+源性TIL
PD1-源性TIL
本体TIL
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
B)
占CD3的%
CD27+
CD28+
CD56
CD57
KLRG1
C)
占CD3+的%
Lag3
PD1
Tim3
Tigit
D)
CD3%
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD134
CD137

图49



C) *本体TIL与PD1+源性之间的共享克隆*

肿瘤	共享的uCDR3克隆的计数	所共享的本体TIL%	所共享的PD1+源性%
乳腺	43	0.61	78.95
乳腺	76	79.51	88.64
肺	40	5.26	35.16
肺	60	4.66	34.57
黑素瘤	59	21.14	53.84
黑素瘤	39	19.87	71.90

图50

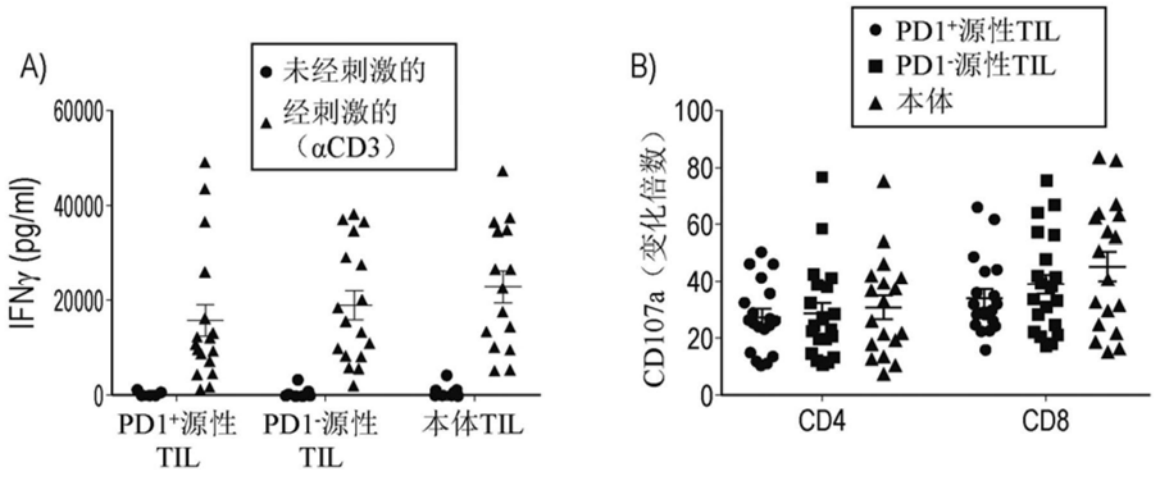

A)
未经刺激的
经刺激的
（αCD3）
IFNγ (pg/ml)
60000
40000
20000
0
PD1+源性TIL
PD1-源性TIL
本体TIL
B)
PD1+源性TIL
PD1-源性TIL
本体
CD107a（变化倍数）
100
80
60
40
20
0
CD4
CD8

图51

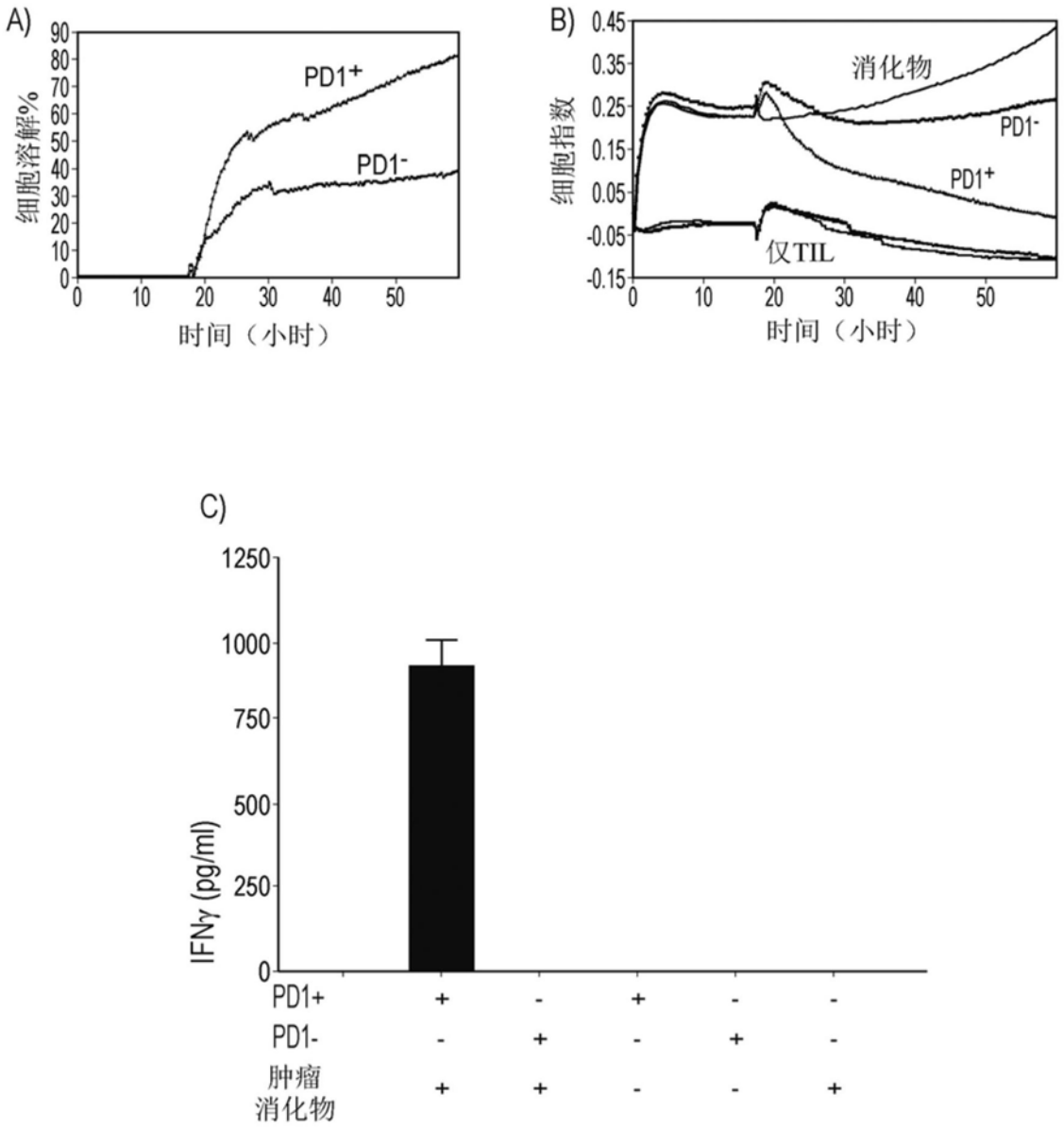

A)
细胞溶解%
PD1+
PD1-
时间（小时）
B)
细胞指数
消化物
PD1-
PD1+
仅TIL
时间（小时）
C)
IFNγ (pg/ml)
PD1+
PD1-
肿瘤
消化物

图52

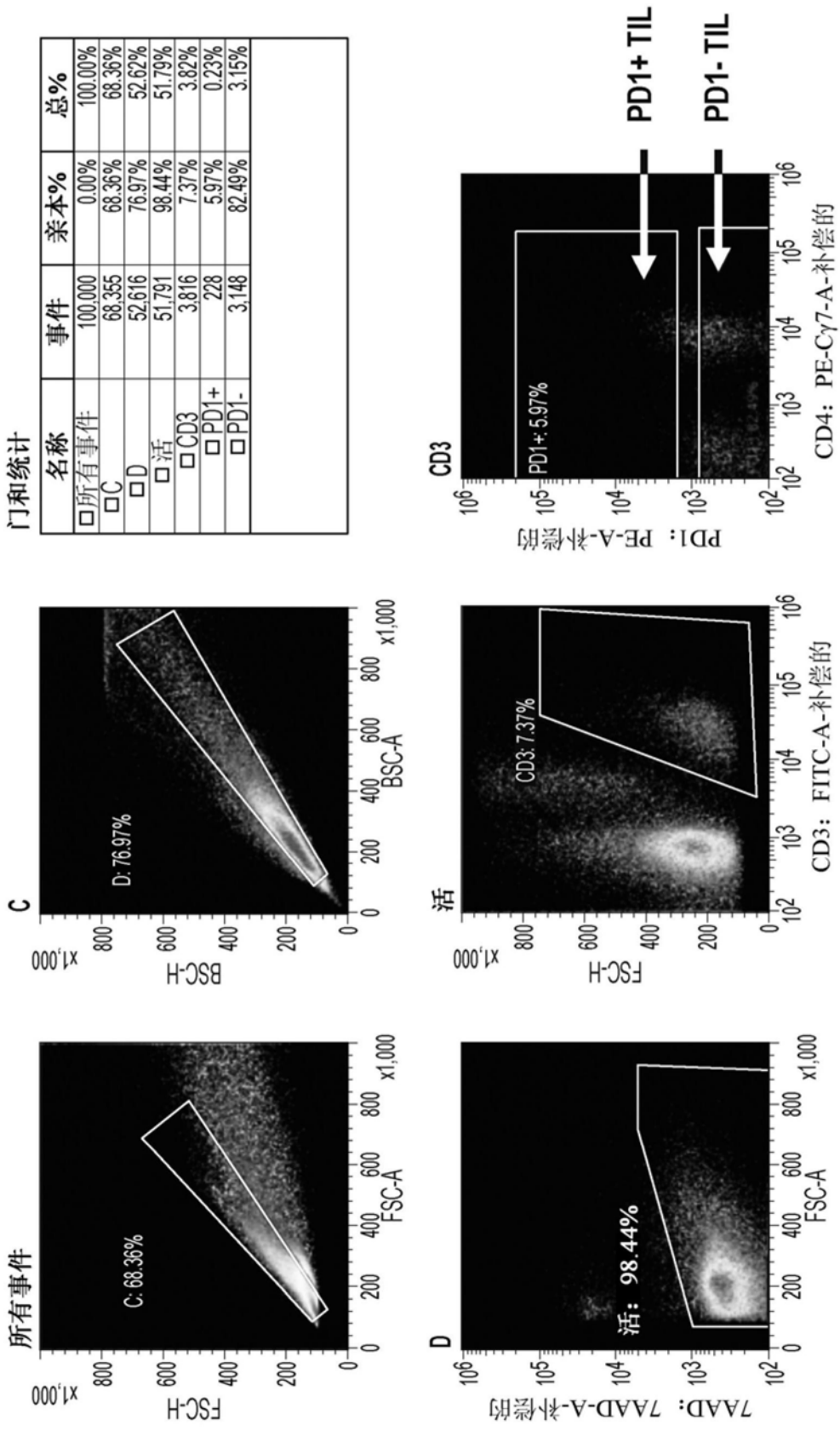

门和统计
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 68,355 68.36% 68.36%
D 52,616 76.97% 52.62%
活 51,791 98.44% 51.79%
CD3 3,816 7.37% 3.82%
PD1+ 228 5.97% 0.23%
PD1- 3,148 82.49% 3.15%
所有事件
C: 68.36%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 76.97%
BSC-H
BSC-A
D
活: 98.44%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 7.37%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1+: 5.97%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
PD1+ TIL
PD1- TIL

图53

第1种方法
第2种方法
第3种方法
第4种方法
活细胞的数量
8x10^6
6x10^6
4x10^6
2x10^6
0
L4071
P7046
EP11057
L4059
肿瘤
第1种方法产生最高细胞数和更大比例的T细胞。
第1种方法*： 10 ng/ml的胶原酶
1 mg/ml的透明质酸酶
500 IU/ml的DNA酶I
第2种方法： 10 ng/ml的胶原酶
第3种方法： 美天旎肿瘤解离试剂盒
第4种方法**： 170 mg/L的胶原酶I
56 mg/L胶原酶II
170 mg/L胶原酶IV
25 mg/L弹性蛋白酶
*NIH癌症研究中心，《三酶小鼠肿瘤消化（Triple Enzyme Mouse Tumor Digestion）》2006, https://ccr.cancer.gov/sites/default/files/triple enzyme mouse tumor digestion.pdf
**Quatromoni等人, 用于保存免疫细胞的表型和功能的人肺肿瘤的优化解聚方法（An optimized disaggregation method for human lung tumors that preserves phenotype and function of immune cells），《白细胞生物学杂志（J Leukoc Biol.）》2015年1月: 97 (1): 201-209

图54

GMP1
GMP2
GMP3
GMP4
IOVA
**
1.5x10^07
1.0x10^07
5.0x10^06
0
所产生的总细胞
GMP1 GMP2 GMP3 GMP4 IOVA
**可能与GMP条件的细胞数类似。更多肿瘤用于IOVA条件，因为这种条件用于分选。未来实验将对肿瘤重量进行归一化
第1种方法：
0.008 DMC U/ml中性蛋白酶
0.12 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第2种方法：
0.008 DMC U/ml中性蛋白酶
5.5 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第3种方法：
0.36 DMC U/ml中性蛋白酶
0.12 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第4种方法：
0.36 DMC U/ml中性蛋白酶
5.5 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第5种方法：
10 ng/ml的胶原酶
1 mg/ml的透明质酸酶
500 IU/ml的DNA酶I

图55

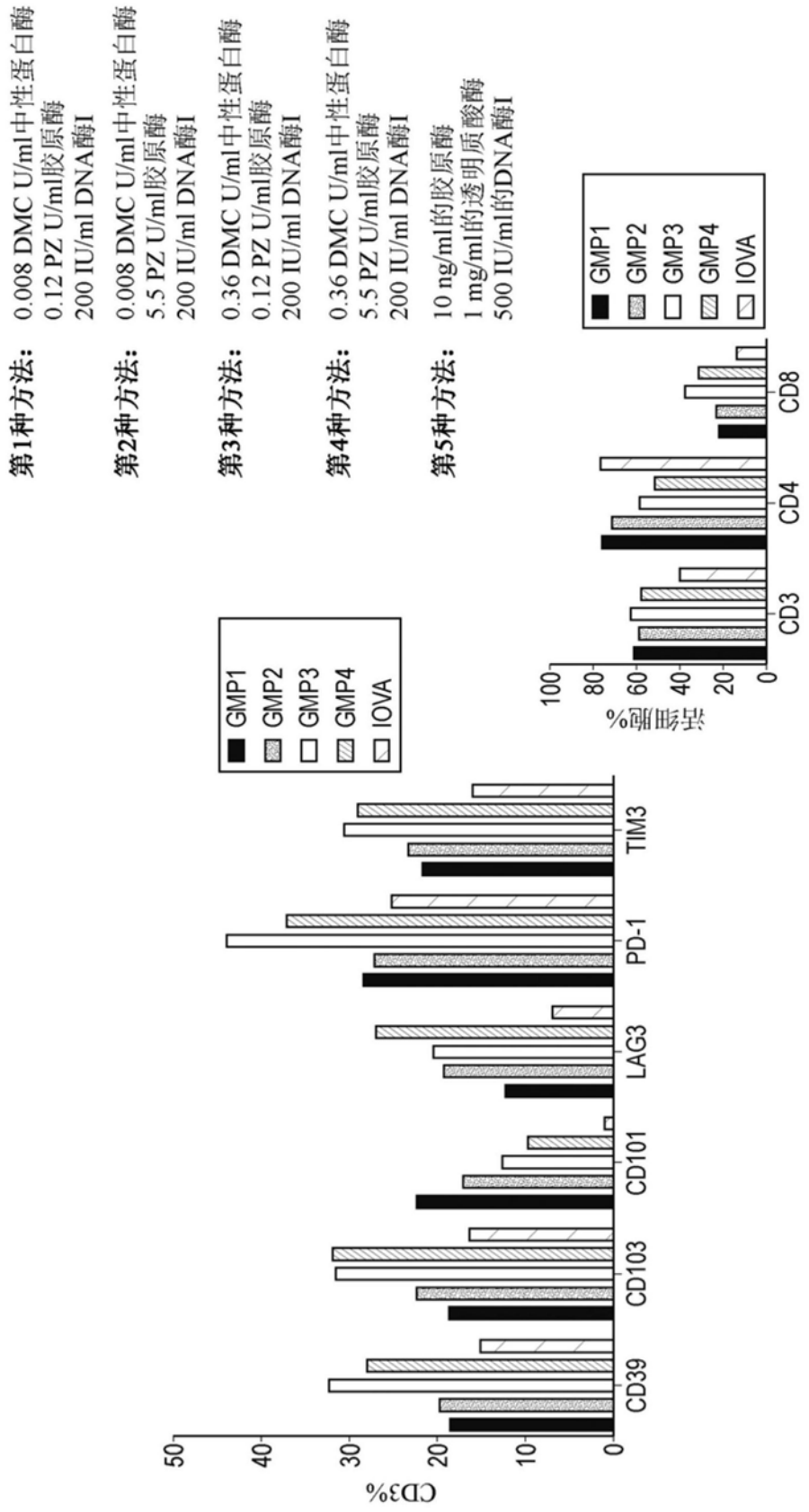

第1种方法：
0.008 DMC U/ml中性蛋白酶
0.12 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第2种方法：
0.008 DMC U/ml中性蛋白酶
5.5 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第3种方法：
0.36 DMC U/ml中性蛋白酶
0.12 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第4种方法：
0.36 DMC U/ml中性蛋白酶
5.5 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第5种方法：
10 ng/ml的胶原酶
1 mg/ml的透明质酸酶
500 IU/ml的DNA酶I
GMP1
GMP2
GMP3
GMP4
IOVA
CD3%
CD39
CD103
CD101
LAG3
PD-1
TIM3
活细胞%
CD3
CD4
CD8

图56

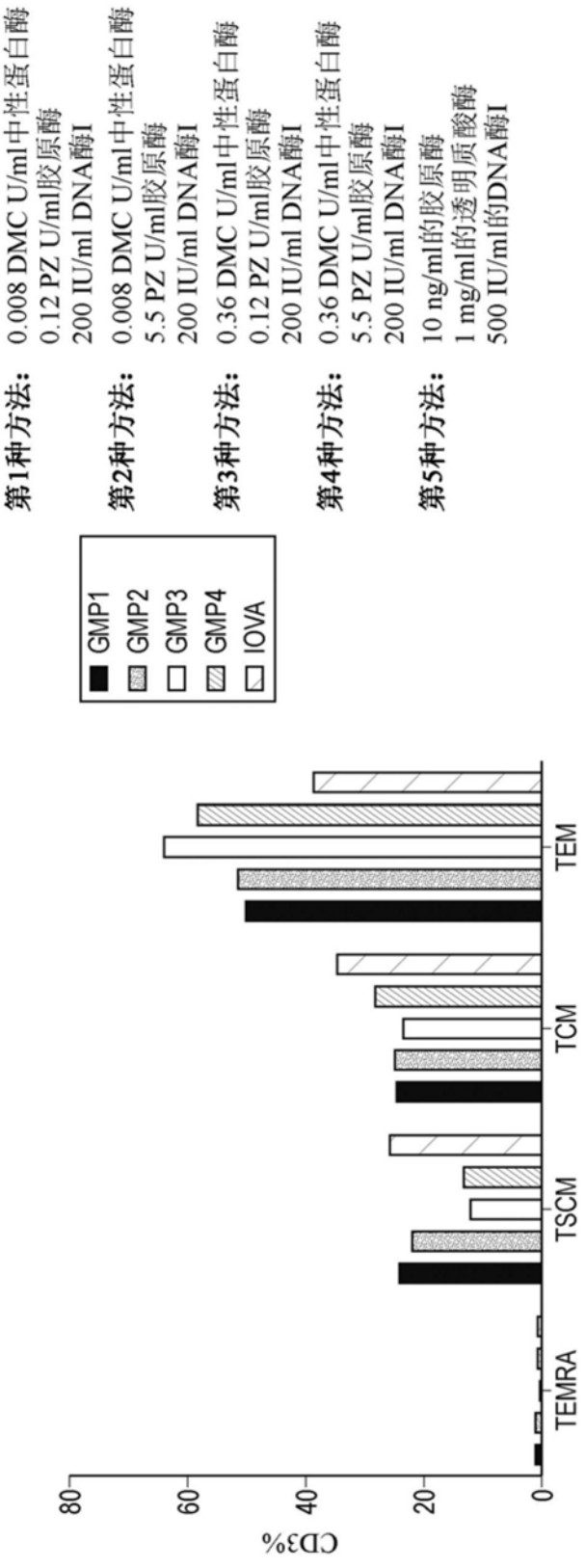

第1种方法：
0.008 DMC U/ml中性蛋白酶
0.12 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第2种方法：
0.008 DMC U/ml中性蛋白酶
5.5 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第3种方法：
0.36 DMC U/ml中性蛋白酶
0.12 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第4种方法：
0.36 DMC U/ml中性蛋白酶
5.5 PZ U/ml胶原酶
200 IU/ml DNA酶I
第5种方法：
10 ng/ml的胶原酶
1 mg/ml的透明质酸酶
500 IU/ml的DNA酶I
GMP1
GMP2
GMP3
GMP4
IOVA
CD3%
80
60
40
20
0
TEMRA
TSCM
TCM
TEM

图57

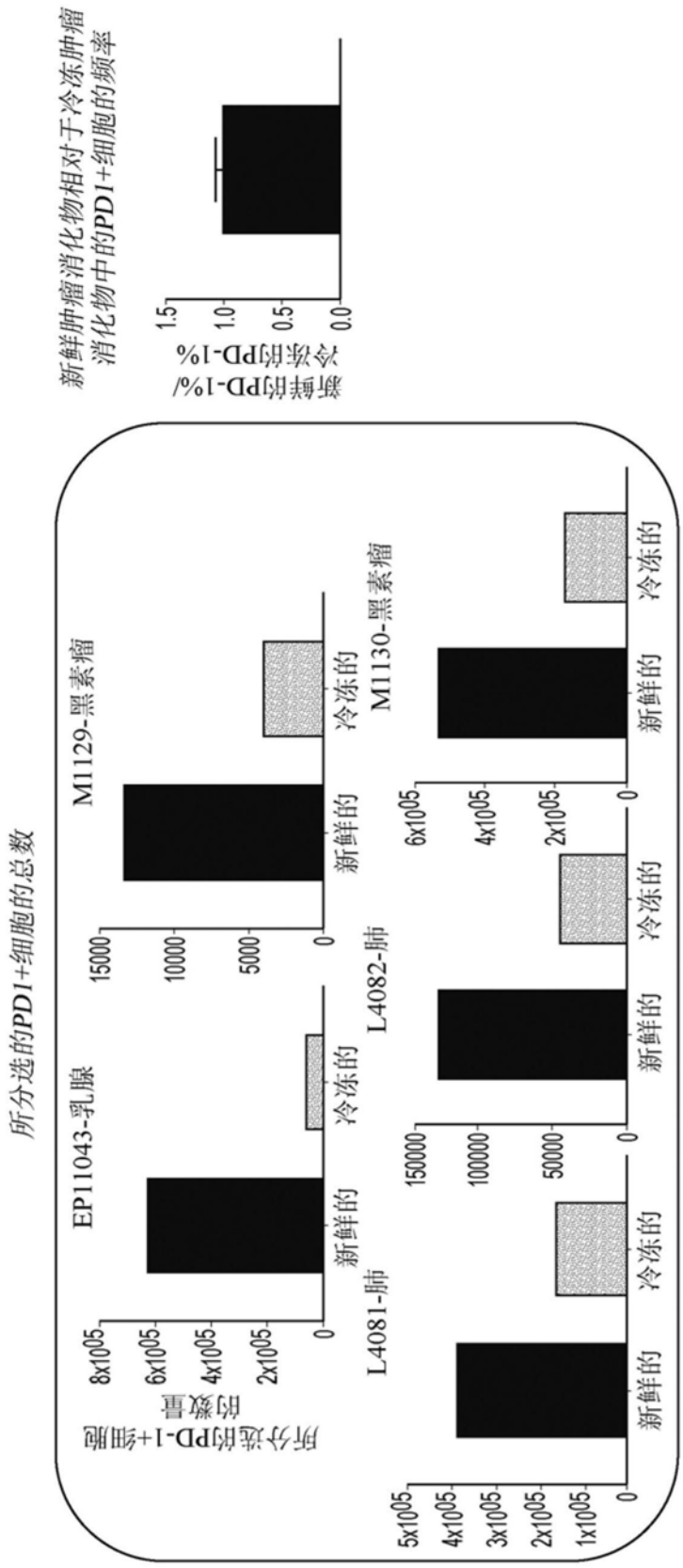

新鲜肿瘤消化物相对于冷冻肿瘤
消化物中的PD1+细胞的频率
新鲜的PD-1%/
冷冻的PD-1%
1.5
1.0
0.5
0.0
所分选的PD1+细胞的总数
所分选的PD-1+细胞
的数量
EP11043-乳腺
M1129-黑素瘤
M1130-黑素瘤
L4081-肺
L4082-肺
8x10^5
6x10^5
4x10^5
2x10^5
0
15000
10000
5000
150000
100000
50000
6x10^5
4x10^5
2x10^5
5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
新鲜的
冷冻的

图58

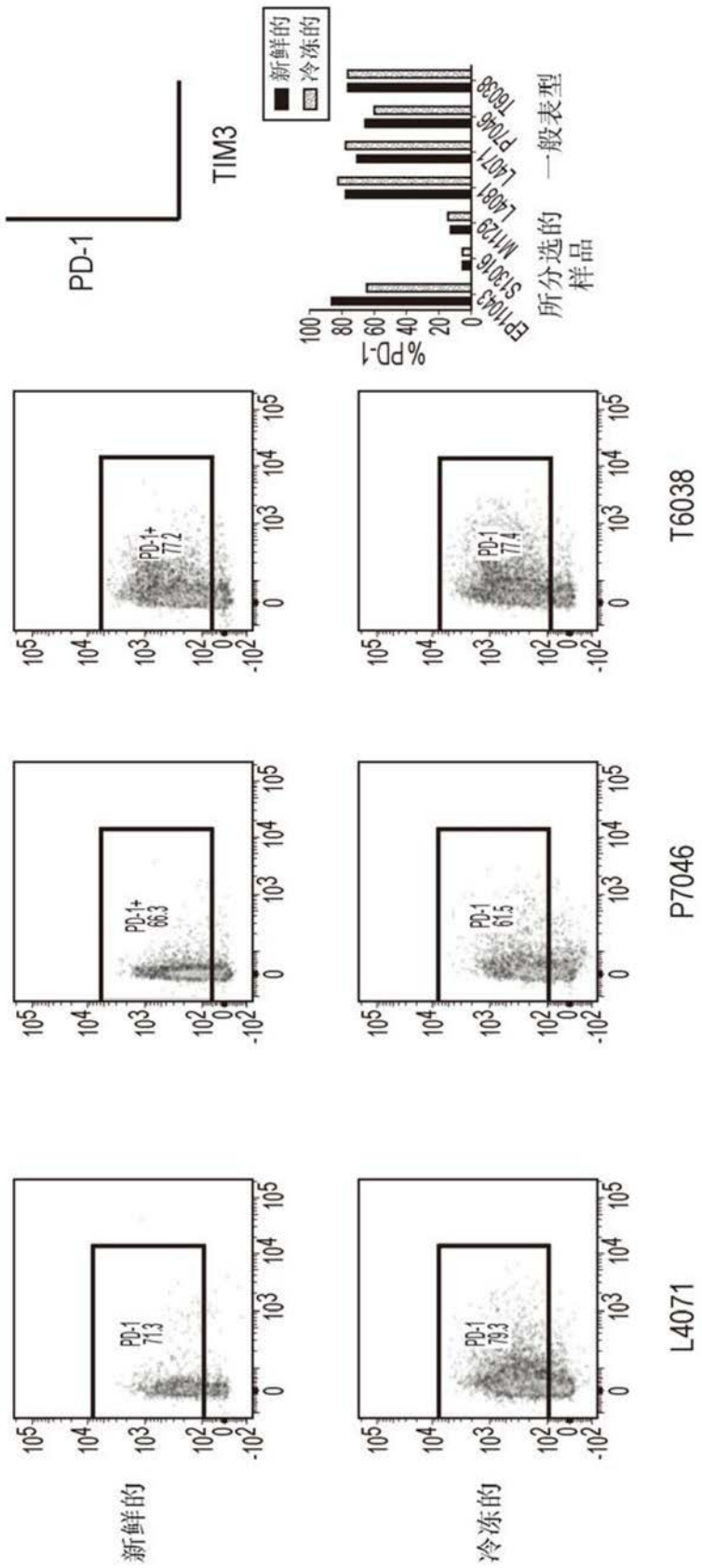

PD-1
TIM3
新鲜的
冷冻的
%PD-1
所分选的样品
一般表型
EP1043
S13016
M1129
L4081
L4071
P7046
T6038
PD-1+ 77.2
PD-1 77.4
PD-1+ 66.3
PD-1 61.5
PD-1 71.3
PD-1 79.3
T6038
P7046
L4071
新鲜的
冷冻的

图59

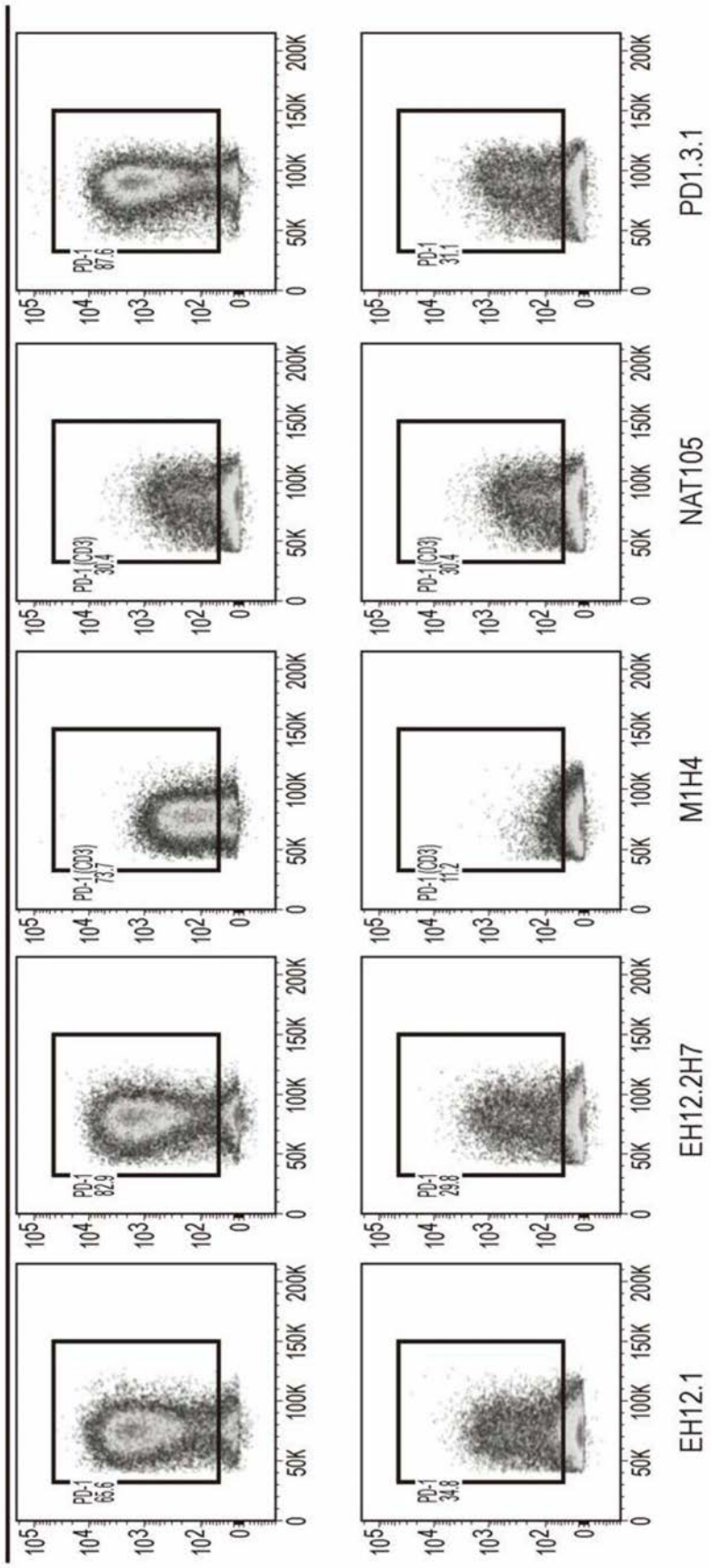

EH12.1
EH12.2H7
M1H4
NAT105
PD1.3.1
PD-1 65.6
PD-1 34.8
PD-1 82.9
PD-1 29.8
PD-1(CD3) 73.7
PD-1(CD3) 11.2
PD-1(CD3) 30.4
PD-1(CD3) 30.4
PD-1 87.6
PD-1 31.1
0
50K
100K
150K
200K
10^2
10^3
10^4
10^5

图60

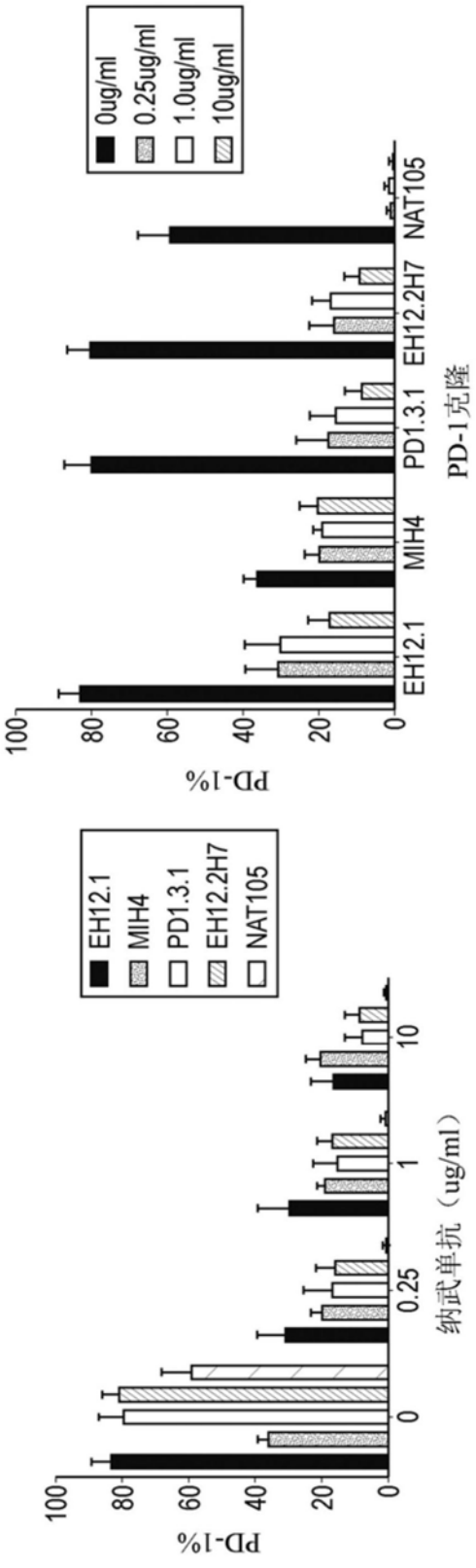

0ug/ml
0.25ug/ml
1.0ug/ml
10ug/ml
PD-1%
100
80
60
40
20
0
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
PD-1克隆
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
PD-1%
100
80
60
40
20
0
0
0.25
1
10
纳武单抗（ug/ml）

图61

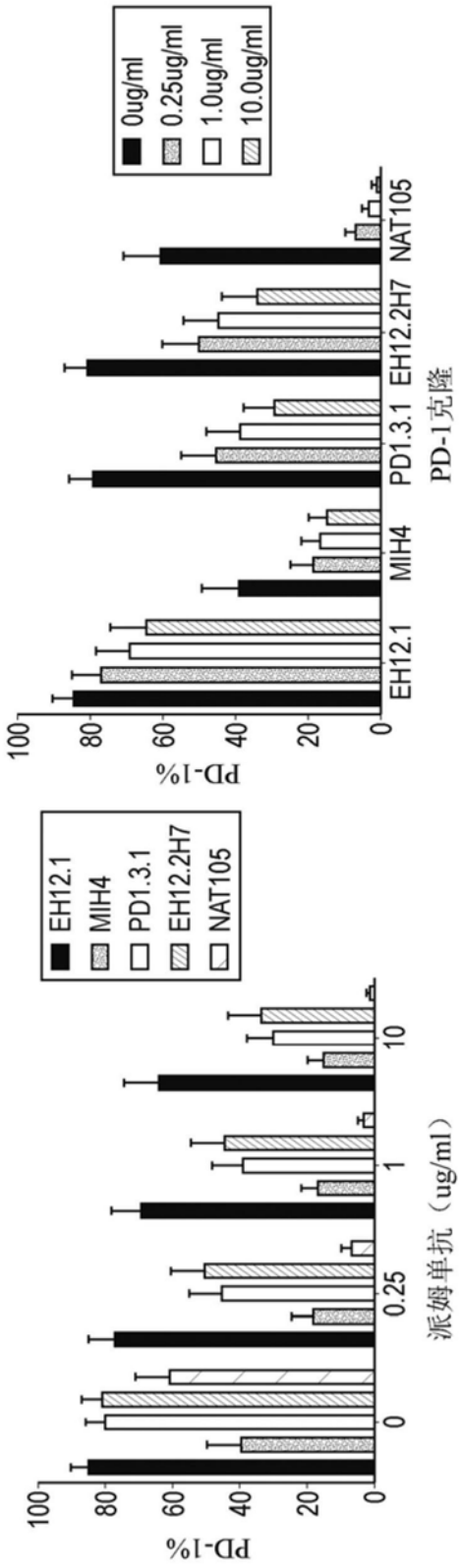

0ug/ml
0.25ug/ml
1.0ug/ml
10.0ug/ml
PD-1%
100
80
60
40
20
0
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
PD-1克隆
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
PD-1%
100
80
60
40
20
0
0
0.25
1
10
派姆单抗（ug/ml）

图62

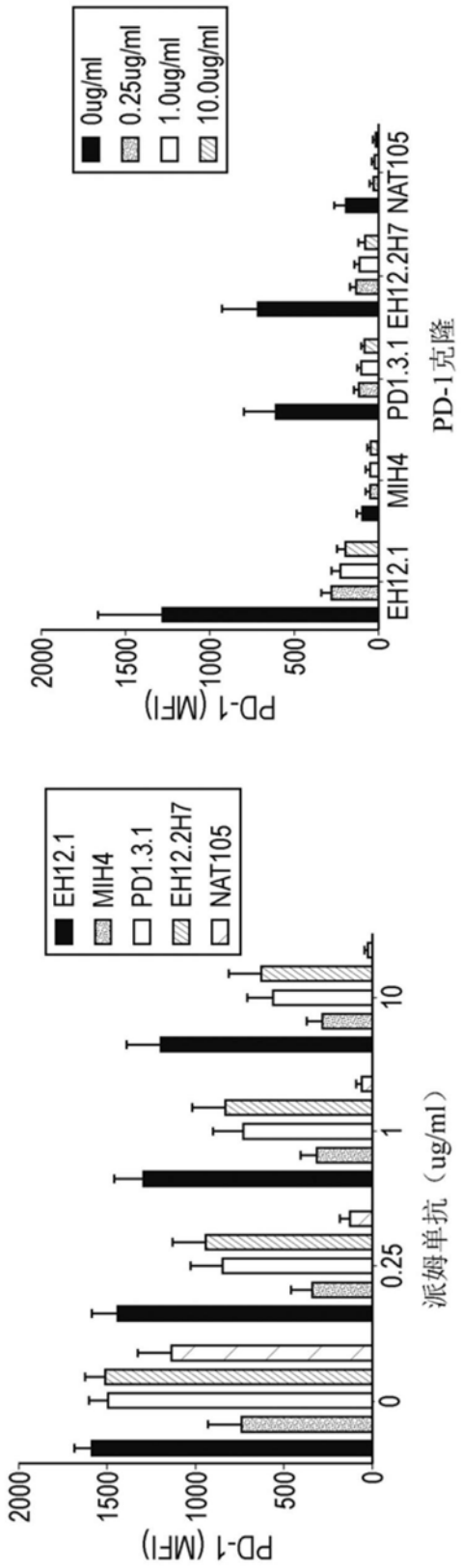

0ug/ml
0.25ug/ml
1.0ug/ml
10.0ug/ml
PD-1 (MFI)
2000
1500
1000
500
0
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
PD-1克隆
EH12.1
MIH4
PD1.3.1
EH12.2H7
NAT105
PD-1 (MFI)
2000
1500
1000
500
0
0
0.25
1
10
派姆单抗（ug/ml）

图63

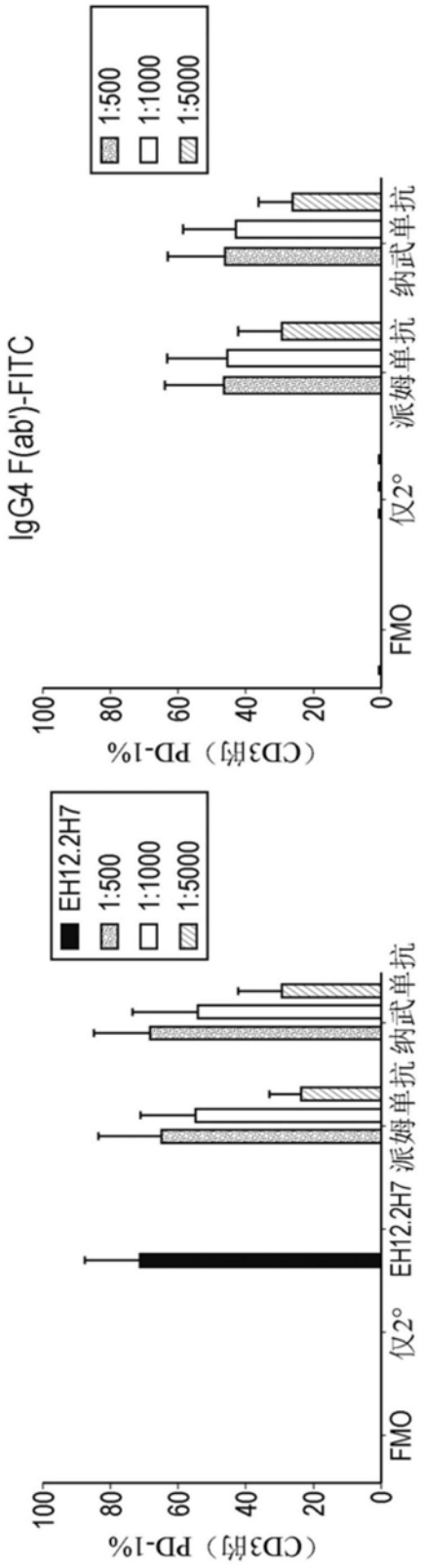

IgG4 F(ab')-FITC
1:500
1:1000
1:5000
(CD3的) PD-1%
100
80
60
40
20
0
FMO
仅2°
派姆单抗
纳武单抗
EH12.2H7
1:500
1:1000
1:5000
(CD3的) PD-1%
100
80
60
40
20
0
FMO
仅2°
EH12.2H7
派姆单抗
纳武单抗

图64

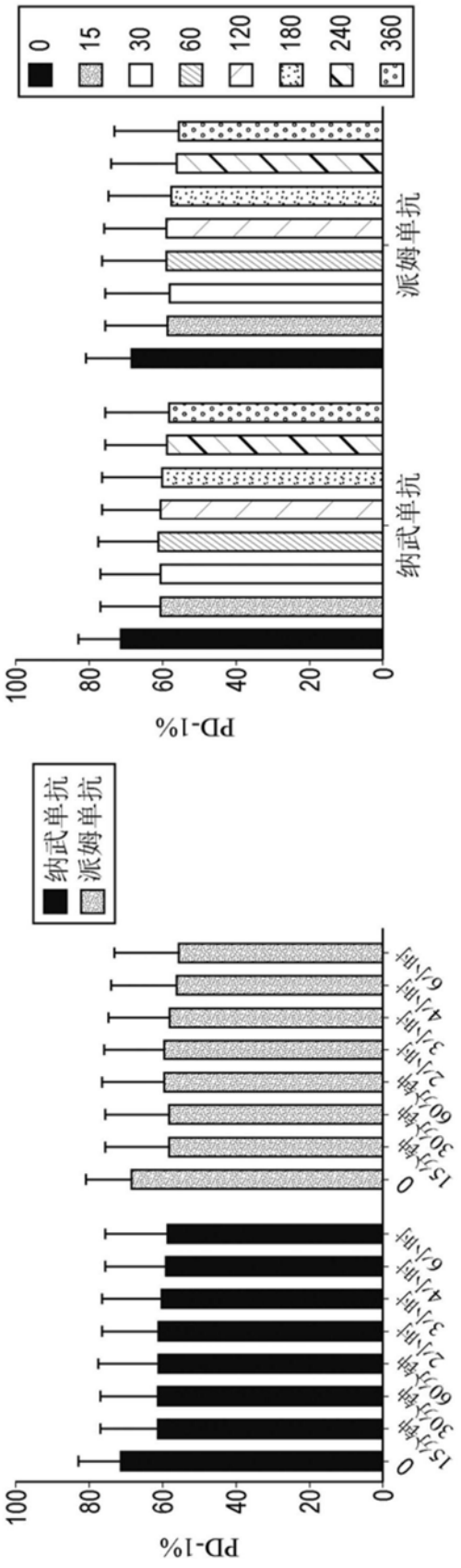

0
15
30
60
120
180
240
360
派姆单抗
纳武单抗
100
80
60
40
20
0
PD-1%
纳武单抗
派姆单抗
0
15分钟
30分钟
60分钟
2小时
3小时
4小时
6小时
0
15分钟
30分钟
60分钟
2小时
3小时
4小时
6小时
100
80
60
40
20
0
PD-1%

图65

	M1121	M1123	M1125	M1126	M1129	M1130	EP11032	EP11040	EP11043
%PD1+	10.1%	0.66%	47.6%	0.78%	13.9%	59.5%	16.3%	33.5%	87%
所分选的数量	30,231	2,000	143,000	3,000	13,393	529,000	23,415	5,693	628,000
分选后纯度	NT	86%	62%	35%	73%	96%	NT	96%	94.6%
REP1种子（#/G-ReX24/10）	30,231	2,000	19,000	3,000	13,393	100,000	23,415	5,693	92,000
REP1产生PD1+	1.9e7	8.0e5	8.21e5	1.5e7	1.5e7	2.3e7	2.63e7	1.3e6	1.33e6
扩增倍数	**628**	**400**	**43**	**5000**	**1045**	**230**	**1,123**	**228**	**15**
REP2种子（#/G-Rex10/100M）	100,000	80,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
REP2产生PD1+	1.44e8 (~27e9)	3.0e6 (~3e7)	3.03e7 (~2/5e8)	9.48e7 (~14e9)	1.28e8 (~192e9)	2.38e8 (~203e9)	1.68e8 (~44e9)	1.26e8 (~14e9)	1.7e8 (~1.5e9)
扩增倍数	**1,440**	**37.5**	**303**	**948**	**1280**	**1670**	**1,680**	**1,260**	**1,170**

用抗PD1治疗的黑素瘤患者

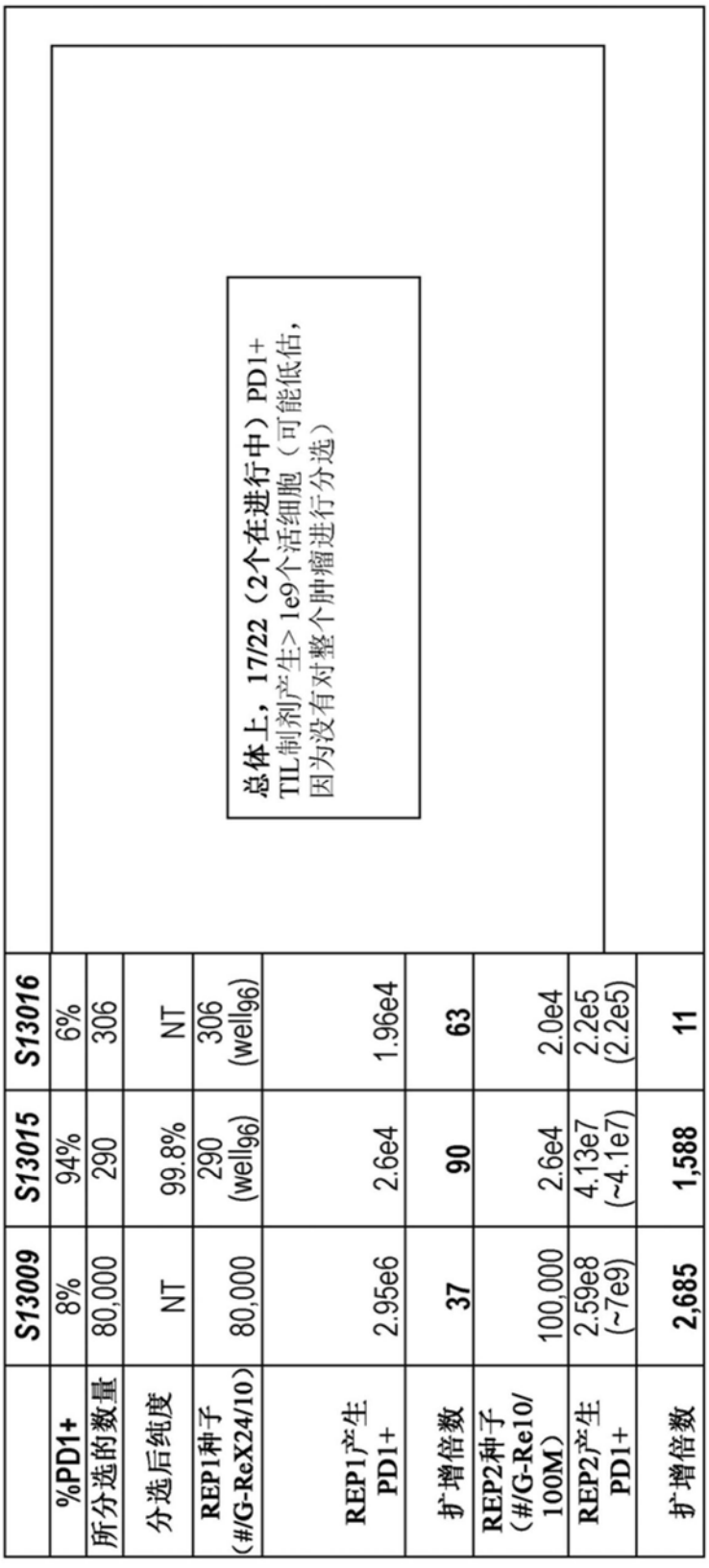
全规模制剂

© 2018, Iovance生物治疗有限公司

图66

	T6042	EP11055	EP11061	L4067	L4068	L4073	*L4074*	L4075	L4081	L4082
%PD1+	33%	13.3%	5.2%	58%	4.6%	27%	6.7%	13.5%	78%	81.8%
所分选的数量	23,320	33,000	5,500	115,000	32,500	88,426	8,384	11,000	390,000	135,012
分选后纯度	90%	72%	65%	95%	59.2%	78%	81%	78%	61%	90%
REP1种子（#/G-ReX24/10）	23,000	1K/2K/10K 20K	5,500	100,000	32,500	10K/25K/ 50K	8,384	1K/2K/ 5K	50,000	30,000
REP1产生 PD1+	5.54e6	2.6e4/ 5.3e5/ 6.8e5/ 3.28e6	6.71e5	3.0e7	2.32e7	8.5e6/ 3.77e7/ 6.09e7	2.72e6	2.4e4/ 3.4e4/ 2.64e5	1.24e8	6.36e7
扩增倍数	**240**	**26/61/67 164**	**122**	**300**	**73**	**850/1508/ 1218**	**324**	**25/17 /53**	**2480**	**2120**
REP2种子（#/G-Re10/ 100M）	5.54e6	3.3e6	100,000	100,000	100,000	3.77e7	2.72e6	8.5e5	100,000	100,000
REP2产生 PD1+	1.82e9 (1.82e9)	1.83e9 (~1.83e9)	1.6e8 (~1.0e9)	3.63e8 (~108e9)	1.17e8 (~27e9)	3.64e8 (~2.2e9)	1.97e9 (~2e9)	1.83e8 (~2e8)	1.1e8 (~138e9)	1.99e8 (~396e9)
扩增倍数	**328**	**554**	**1570**	**3,600**	**1170**	**20**	**724**	**2,152**	**1110**	**1990**

图67



	S13009	S13015	S13016
%PD1+	8%	94%	6%
所分选的数量	80,000	290	306
分选后纯度	NT	99.8%	NT
REP1种子（#/G-ReX24/10）	80,000	290 ($well_{96}$)	306 ($well_{96}$)
REP1产生 PD1+	2.95e6	2.6e4	1.96e4
扩增倍数	37	90	63
REP2种子（#/G-Re10/100M）	100,000	2.6e4	2.0e4
REP2产生 PD1+	2.59e8 (~7e9)	4.13e7 (~4.1e7)	2.2e5 (2.2e5)
扩增倍数	2,685	1,588	11

图68

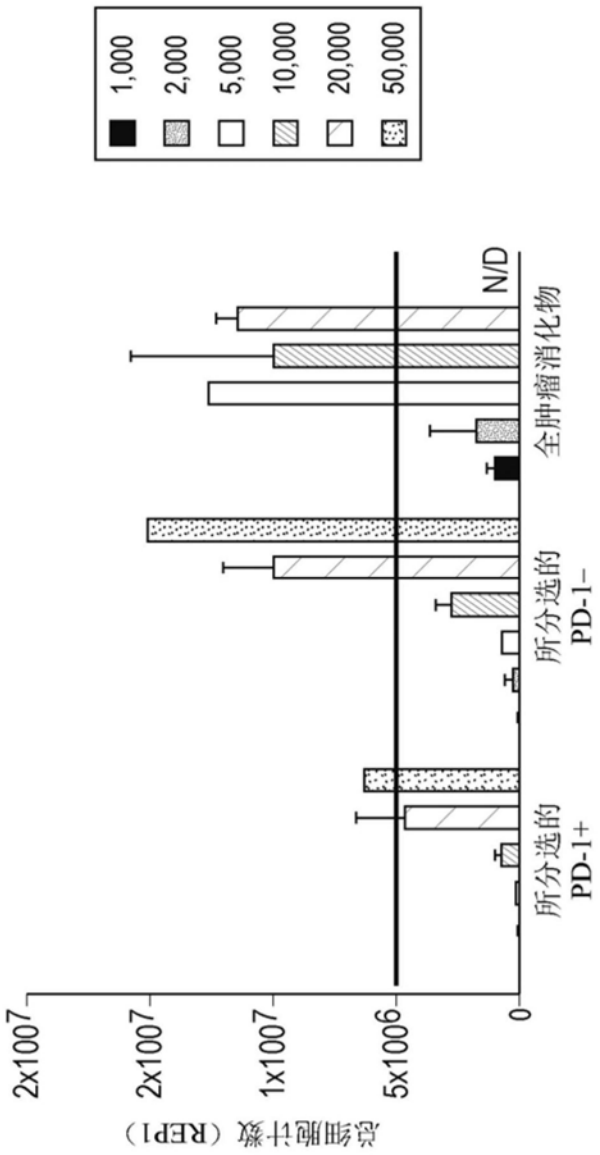

1,000
2,000
5,000
10,000
20,000
50,000
总细胞计数（REP1）
2x1007
2x1007
1x1007
5x1006
0
所分选的 PD-1+
所分选的 PD-1−
全肿瘤消化物
N/D

图69

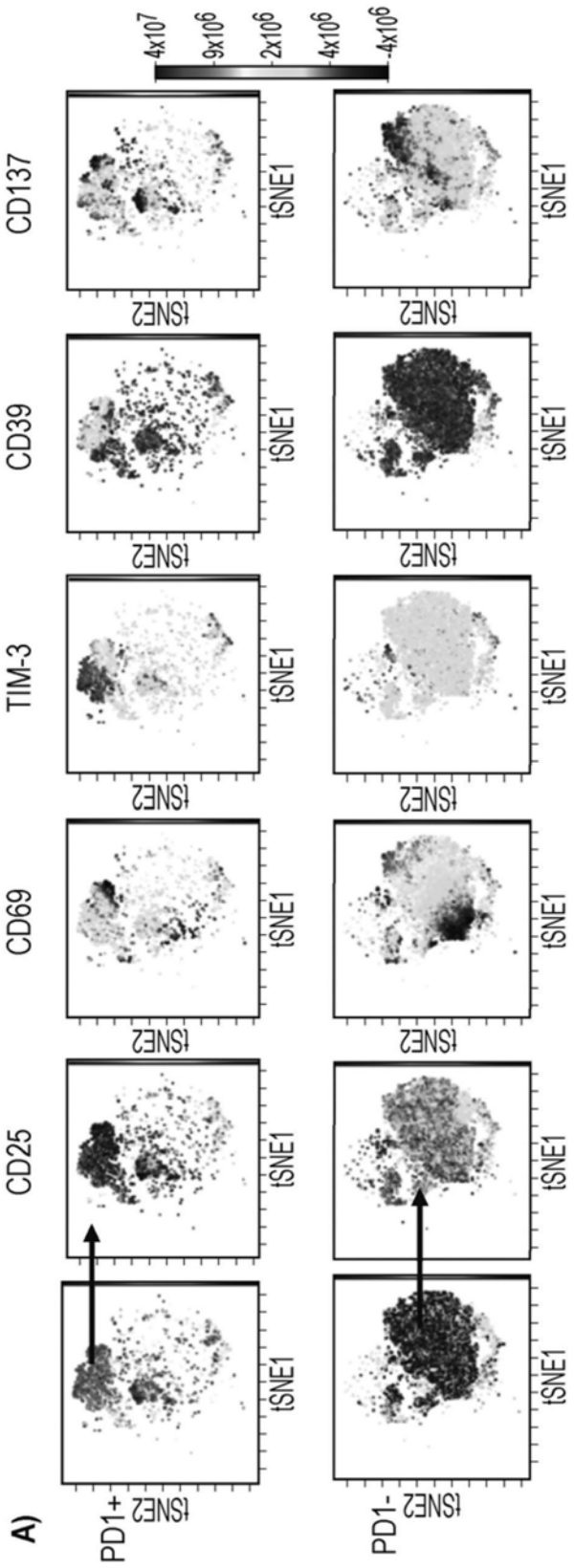

4x10^7
9x10^6
2x10^6
4x10^6
4x10^6
CD137
CD39
TIM-3
CD69
CD25
tSNE1
tSNE2
A)
PD1+
PD1-

图70

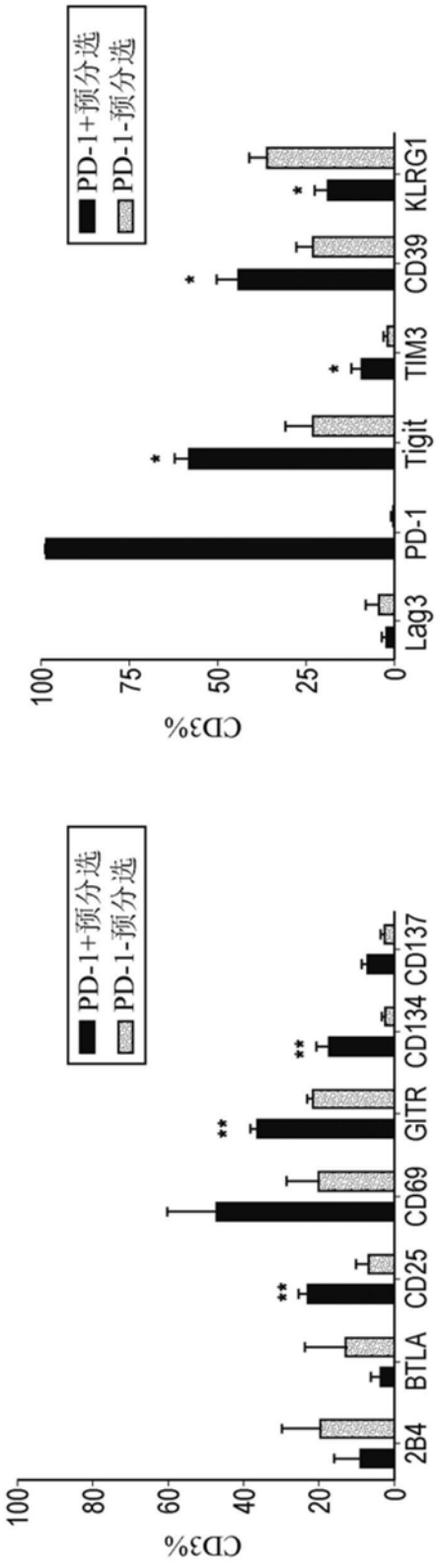

PD-1+预分选
PD-1-预分选
CD3%
100
75
50
25
0
Lag3
PD-1
Tigit
TIM3
CD39
KLRG1
PD-1+预分选
PD-1-预分选
CD3%
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CD25
CD69
GITR
CD134
CD137

图71

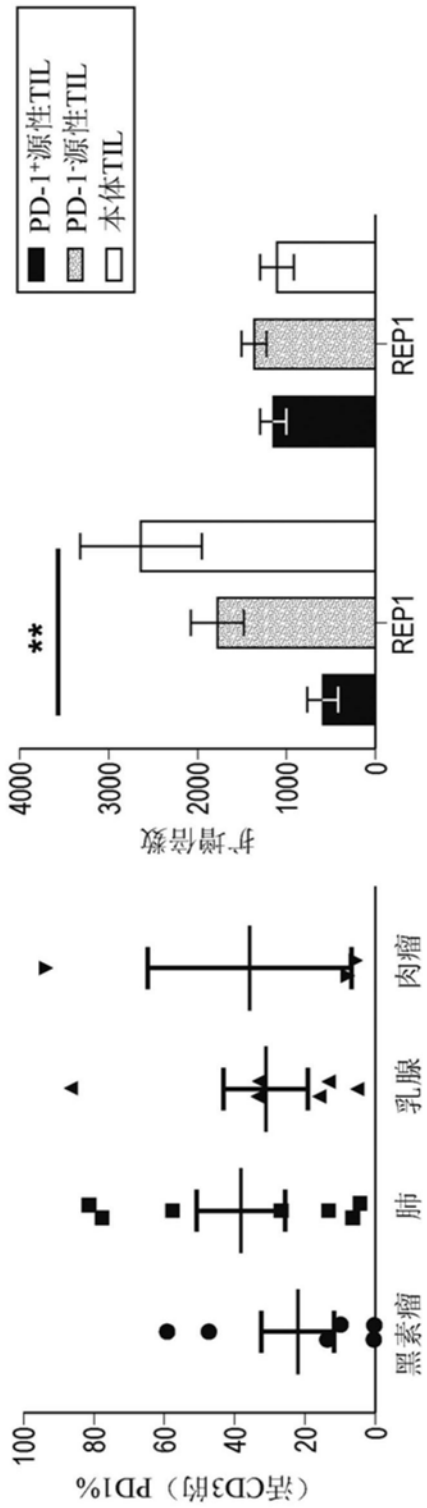

PD-1+源性TIL
PD-1-源性TIL
本体TIL
**
REP1
REP1
扩增倍数
4000
3000
2000
1000
0
(活CD3的) PD1%
100
80
60
40
20
0
黑素瘤
肺
乳腺
肉瘤

图72

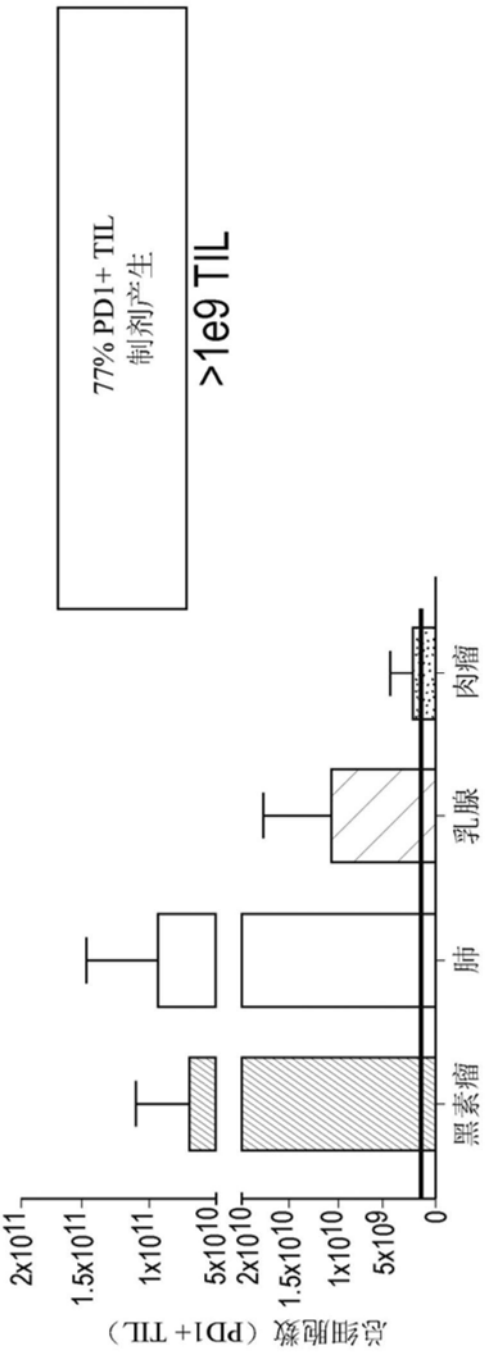

77% PD1+ TIL
制剂产生
>1e9 TIL
总细胞数（PD1+ TIL）
2x10^11
1.5x10^11
1x10^11
5x10^10
2x10^10
1.5x10^10
1x10^10
5x10^9
0
黑素瘤
肺
乳腺
肉瘤

图73

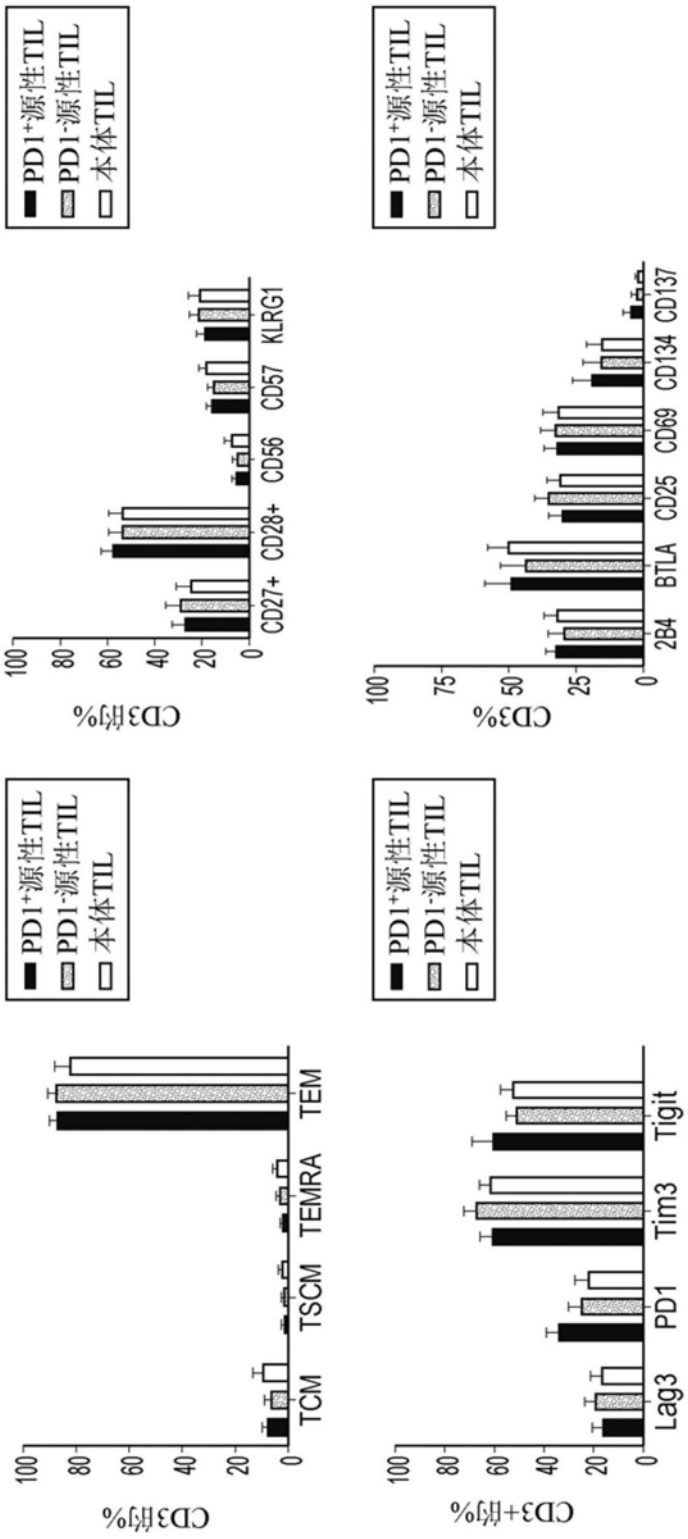

PD1+源性TIL
PD1-源性TIL
本体TIL
CD3的%
CD27+
CD28+
CD56
CD57
KLRG1
CD3%
2B4
BTLA
CD25
CD69
CD134
CD137
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
CD3+的%
Lag3
PD1
Tim3
Tigit

图74

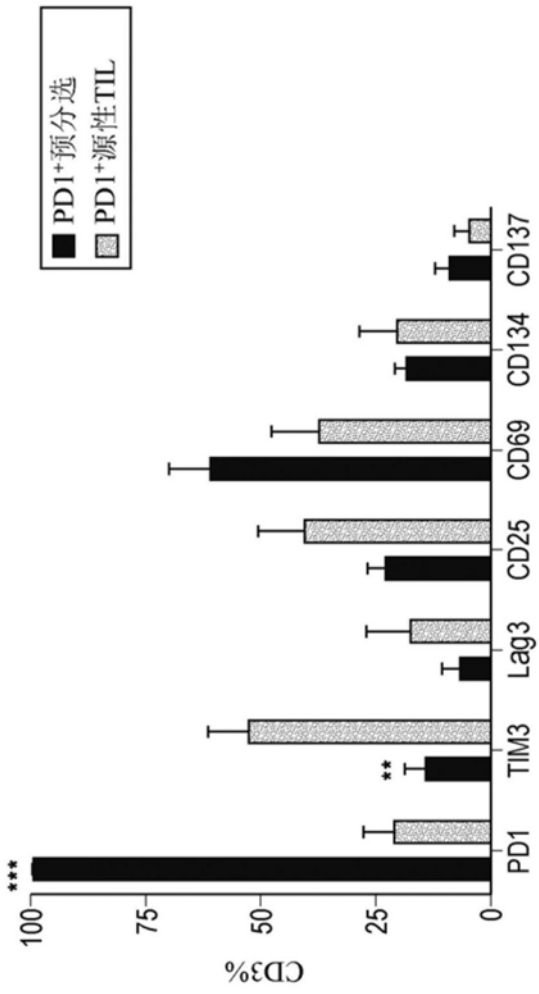

PD1+预分选
PD1+源性TIL
CD3%
100
75
50
25
0
***
**
PD1
TIM3
Lag3
CD25
CD69
CD134
CD137

图75

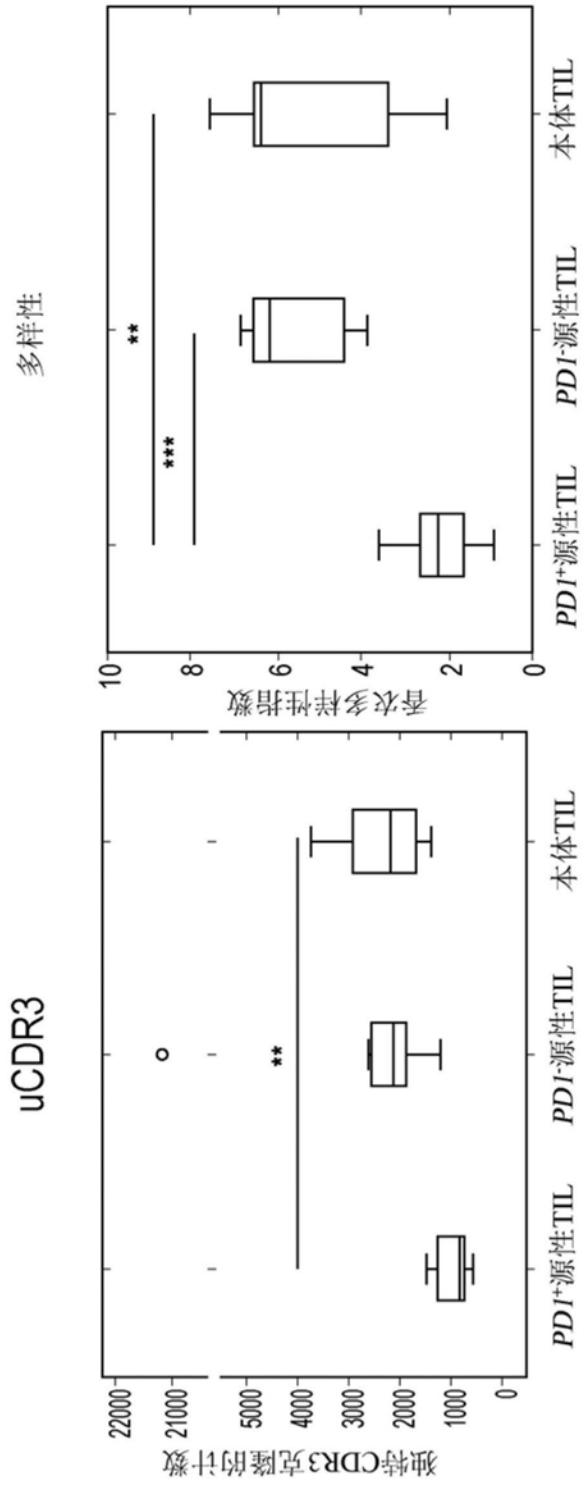


图76

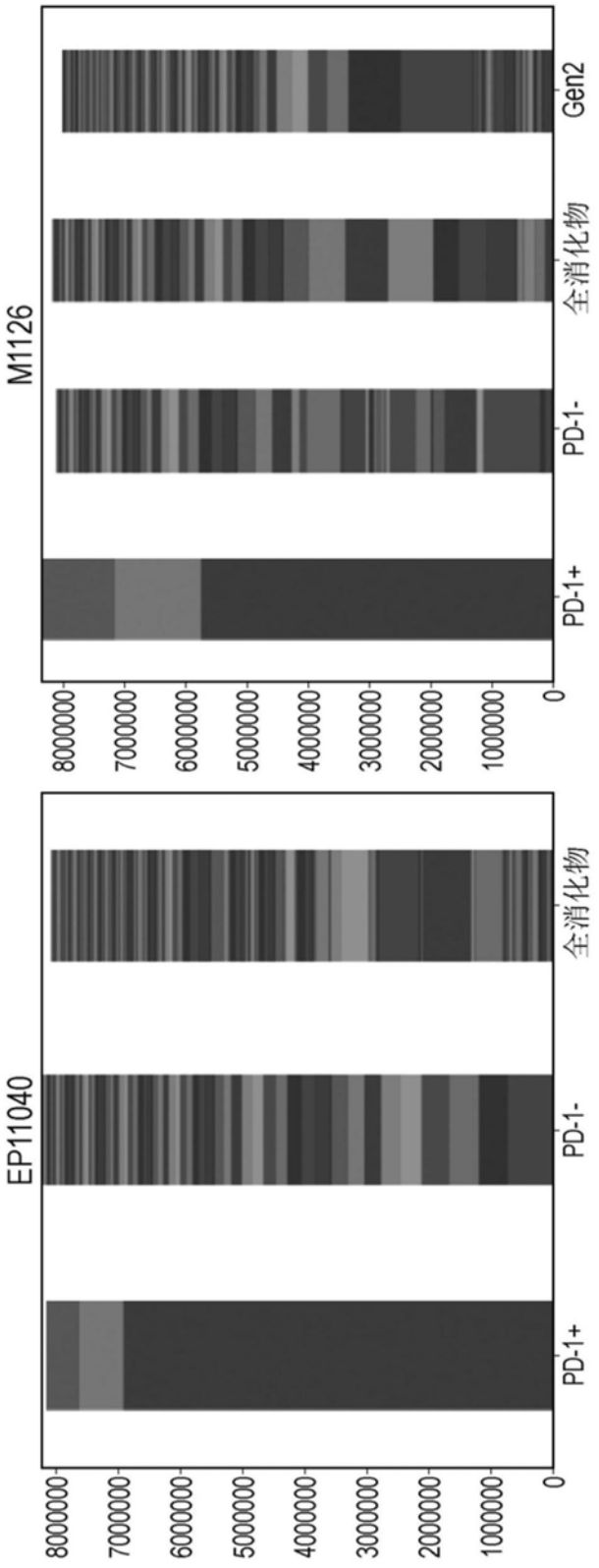

M1126
EP11040
PD-1+
PD-1-
全消化物
Gen2
0
1000000
2000000
3000000
4000000
5000000
6000000
7000000
8000000

图77

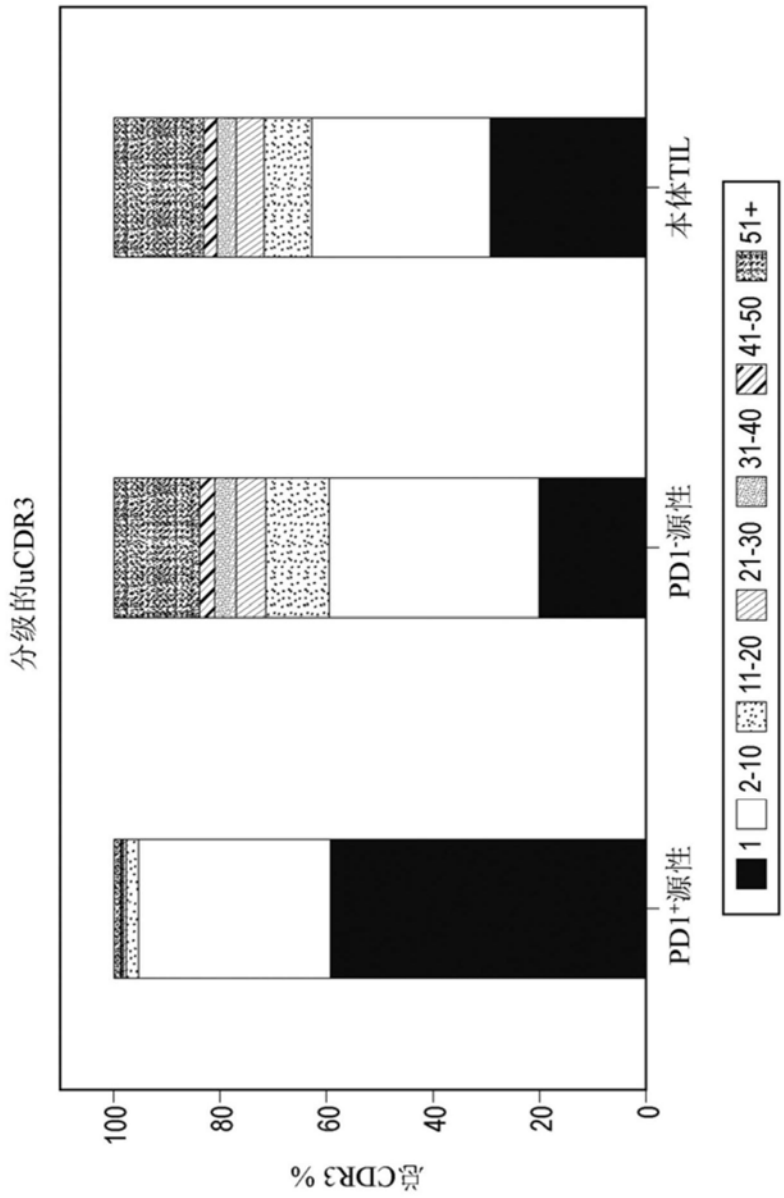
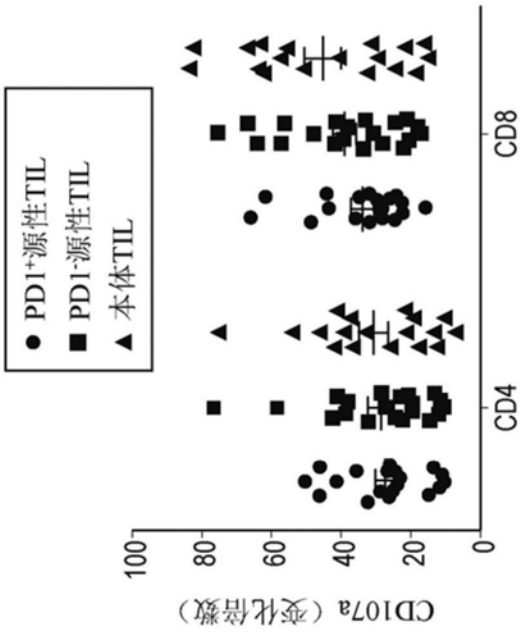

分级的uCDR3
总CDR3 %
100
80
60
40
20
0
PD1+源性
PD1-源性
本体TIL
1
2-10
11-20
21-30
31-40
41-50
51+

图78

本体TIL与PD1+源性之间的共享克隆

肿瘤	共享的uCDR3克隆的计数	所共享的本体TIL%	所共享的PD1+源性%
乳腺	43	0.61	78.95
乳腺	76	79.51	88.64
肺	40	5.26	35.16
肺	60	4.66	34.57
黑素瘤	59	21.14	53.84
黑素瘤	39	19.87	71.90

图79


● PD1+源性TIL
■ PD1-源性TIL
▲ 本体TIL
CD4
CD8
CD107a（变化倍数）
100
80
60
40
20
0

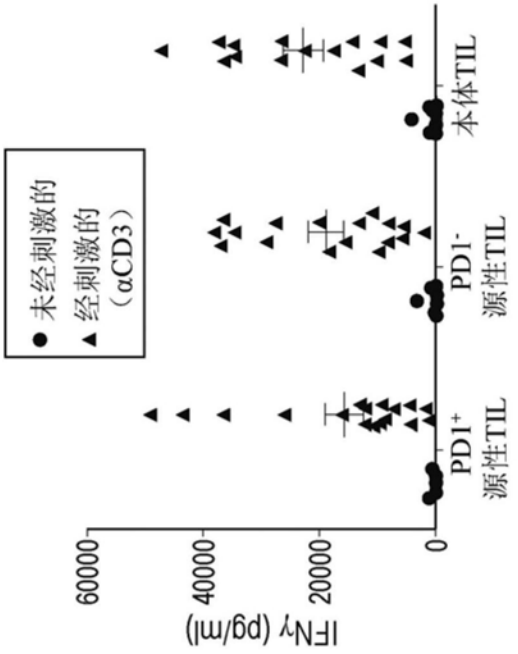

● 未经刺激的
▲ 经刺激的（αCD3）
IFNγ (pg/ml)
60000
40000
20000
0
PD1+ 源性TIL
PD1- 源性TIL
本体TIL

图80

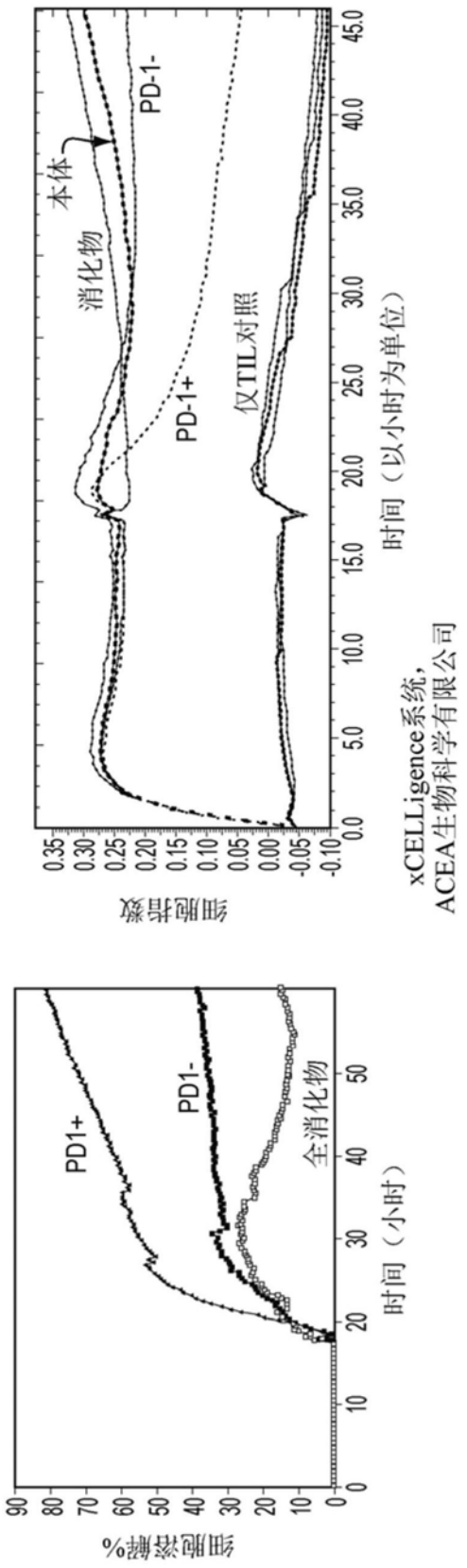

细胞指数
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-0.10
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
时间（以小时为单位）
本体
消化物
PD-1-
PD-1+
仅TIL对照
xCELLigence系统，
ACEA生物科学有限公司
细胞溶解%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
时间（小时）
PD1+
PD1-
全消化物

图81

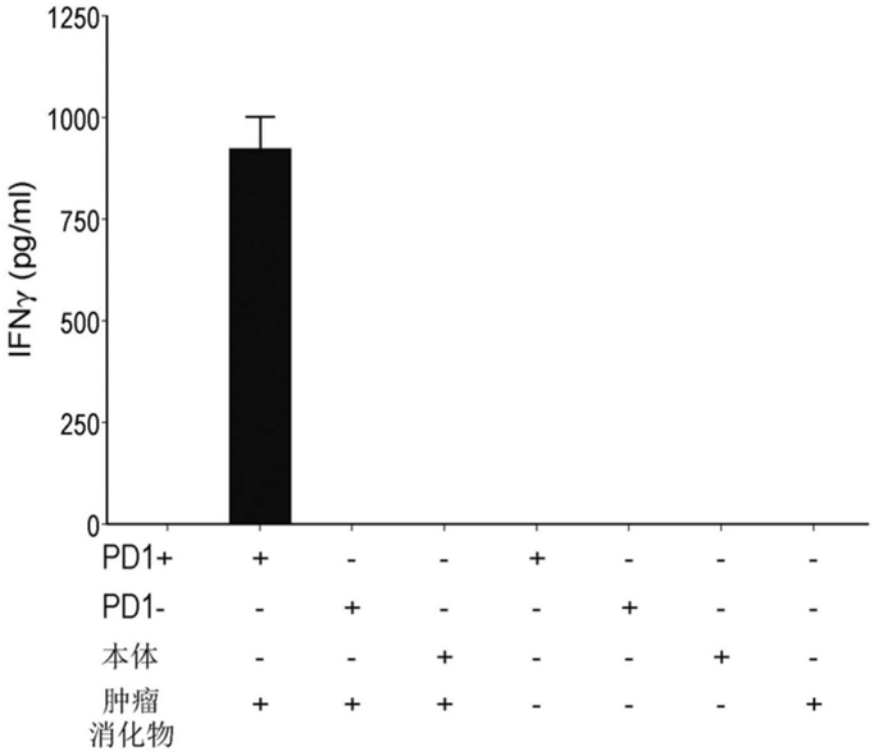


图82

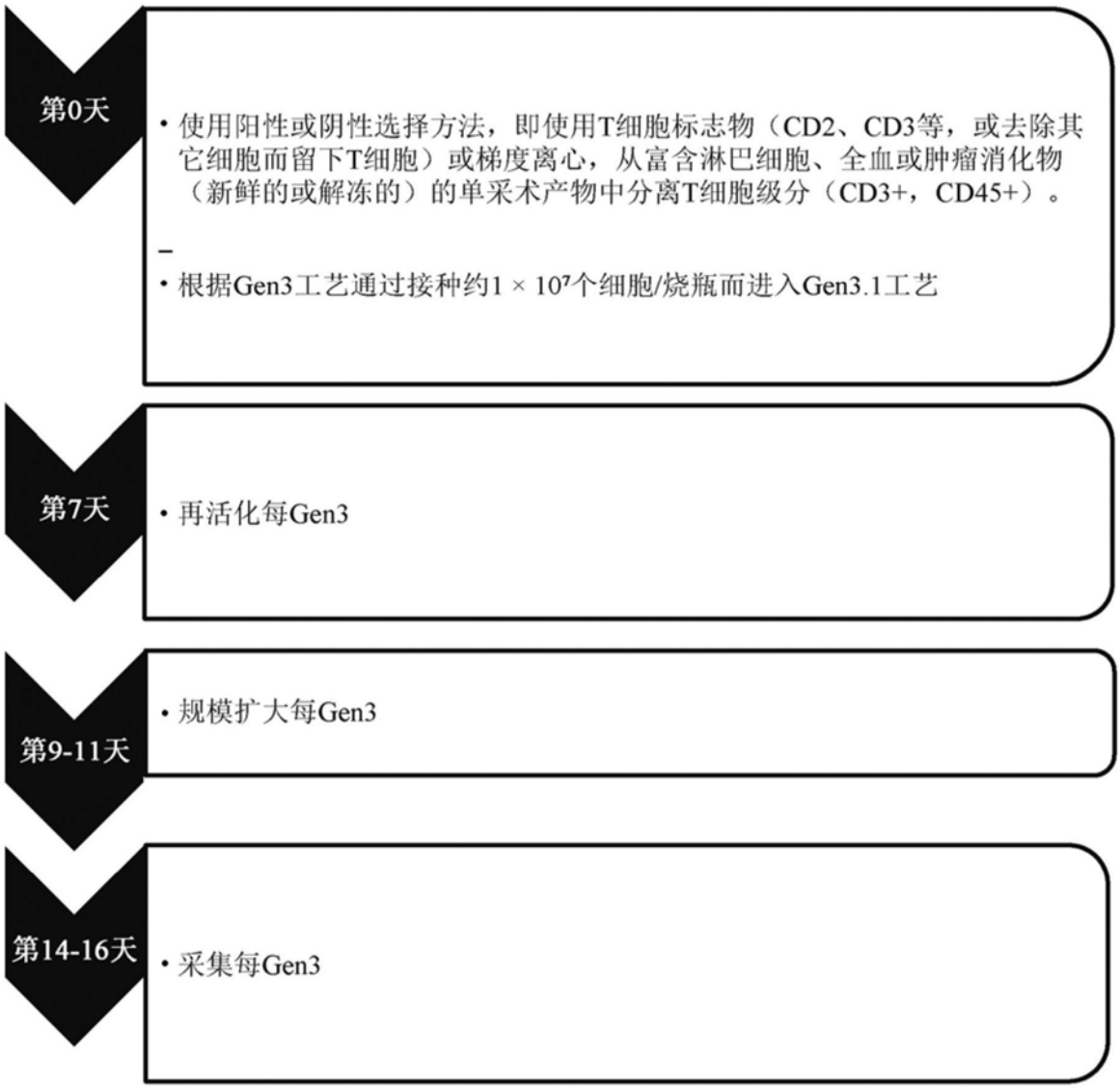

第0天
• 使用阳性或阴性选择方法，即使用T细胞标志物（CD2、CD3等，或去除其它细胞而留下T细胞）或梯度离心，从富含淋巴细胞、全血或肿瘤消化物（新鲜的或解冻的）的单采术产物中分离T细胞级分（CD3+，CD45+）。
–
• 根据Gen3工艺通过接种约1 × 10⁷个细胞/烧瓶而进入Gen3.1工艺
第7天
• 再活化每Gen3
第9-11天
• 规模扩大每Gen3
第14-16天
• 采集每Gen3

图83

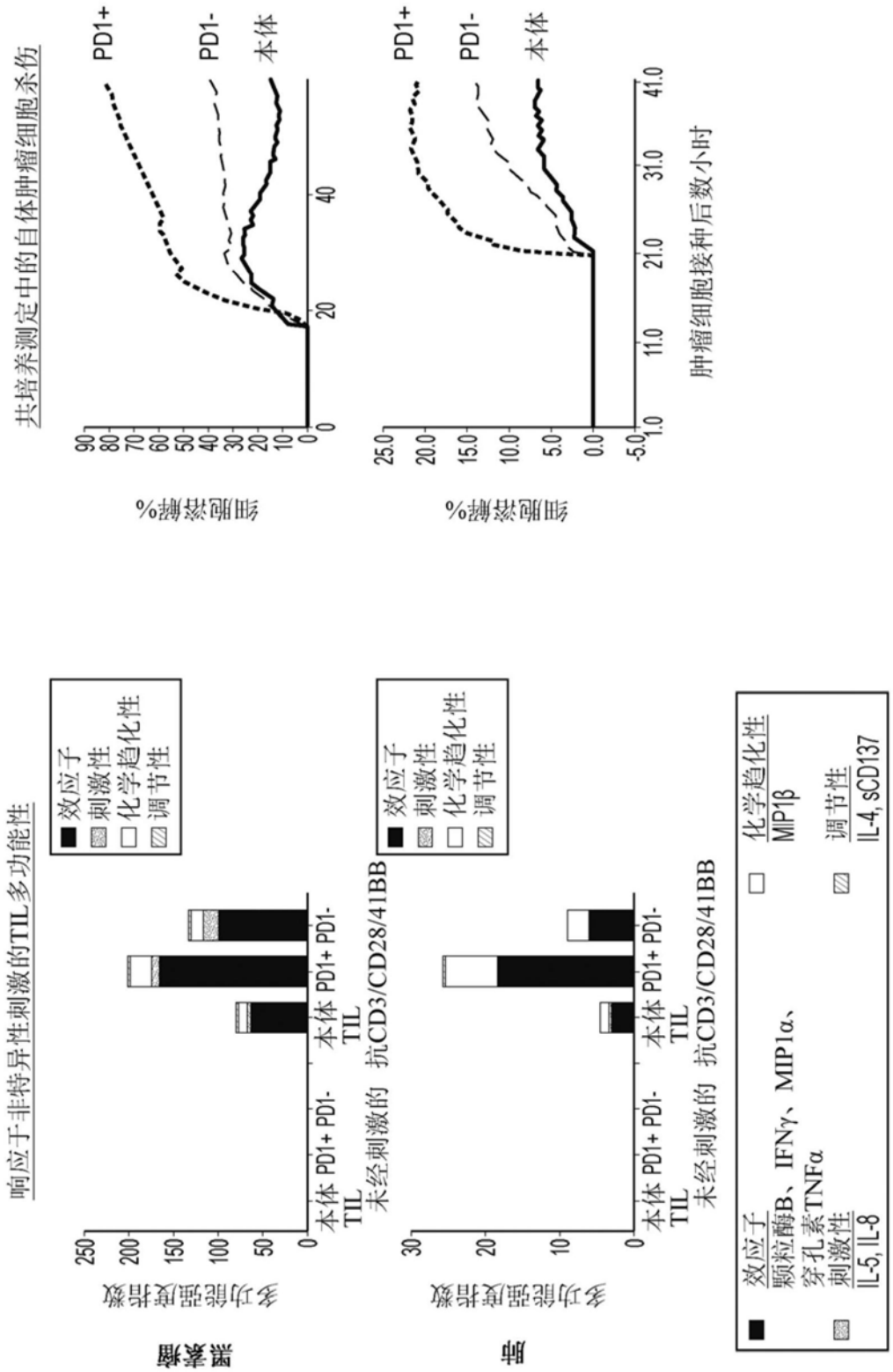

共培养测定中的自体肿瘤细胞杀伤
PD1+
PD1-
本体
细胞溶解%
肿瘤细胞接种后数小时
响应于非特异性刺激的TIL多功能性
效应子
刺激性
化学趋化性
调节性
多功能强度指数
黑素瘤
肺
本体 PD1+ PD1- TIL
未经刺激的
抗CD3/CD28/41BB
效应子
颗粒酶B、IFNγ、MIP1α、穿孔素TNFα
刺激性
IL-5, IL-8
化学趋化性
MIP1β
调节性
IL-4, sCD137

图84

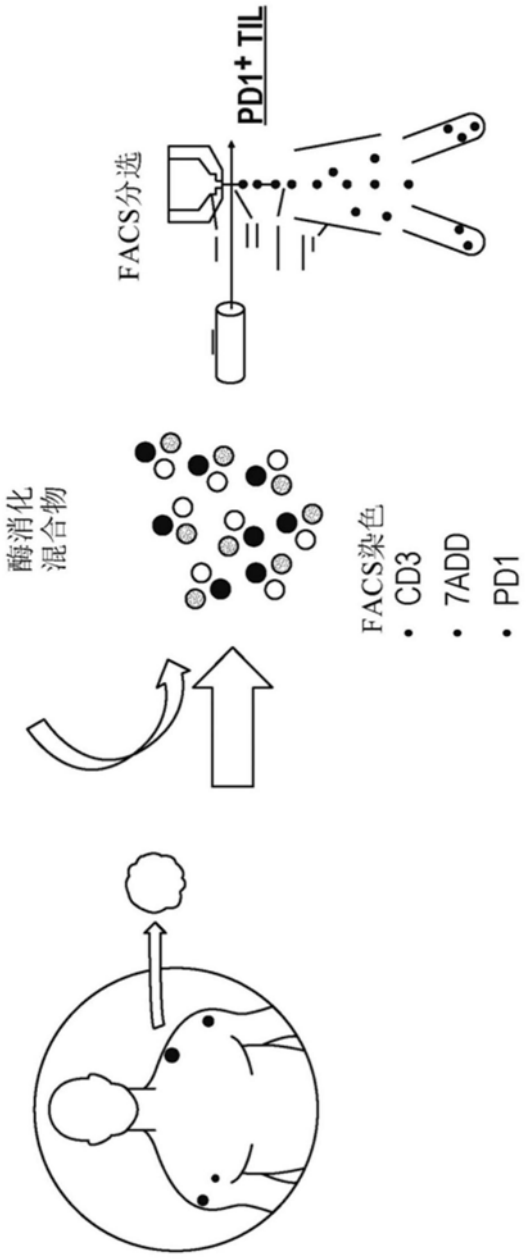


图85

	αPD1克隆	消化物中的PD1+%	分选的PD1+细胞的数量	扩增倍数[REP1；REP2]	总产率（外推）	uCDR3的数量	熵	所共享的部分（%）[本体；PD1+]
M1125	M1H4	***47.60%***	143,000	43; 303	(~2.5e8)	1281	3.6	29;36
M1126	M1H4	***0.78%***	3,000	5000; 948	(~14e9)	786	2.3	19.9; 71.9
M1129	M1H4	***13.90%***	13,393	1045; 1280	(~192e9)	18,234	7.4	38.1; 50.9
EP11040	M1H4	***33.50%***	5,693	228; 1260	(~14e9)	823	2.1	0.6; 78.9
EP11043	M1H4	***87%***	628,000	15; 1170	(~1.5e9)	1518	1.4	79.5; 88.6
L4067	M1H4	***58%***	115,000	300; 3600	(~108e9)	566	2.4	5.3; 35.2
L4068	M1H4	***4.60%***	32,500	73; 1170	(~27e9)	806	3.4	4.7; 34.6
L4073	M1H4	***27%***	88,426	1218; 20	(~2.2e9)	45,947	12.5	28.7; 39.5
L4074	M1H4	***6.70%***	8,384	324; 742	(~2e9)	1694	4.5	5.6; 72.2
L4075	M1H4	***13.50%***	11,000	53; 2152	(~2e8)	1416	4.1	17.9; 53.3
M1130	EH12.2H7	***59.50%***	529,000	230; 1670	(~203e9)	2815	6	5.7; 52.9
L4081	EH12.2H7	***78%***	390,000	2480; 1110	(~138e9)	5373	8.7	41.4; 65.5
L4082	EH12.2H7	***81.80%***	135,012	2120; 1990	(~396e9)	4467	6.4	57.8; 56.7
L4089	EH12.2H7	***75%***	826,000	46; 2491	(~950e9)	10093	9.9	58.9; 38.7
H3027	EH12.2H7	***92%***	71,929	31; 1470	(~3.17e9)	808	0.8	0.06; 0.03
L4093	***EH12.2H7***	***79%***	***448,000***	***1336, 483***	***~97e9***	***2886***	***5.7***	***18; 46***
M1135	***EH12.2H7***	***64%***	***48,000***	***5670, 497***	***~99e9***	***2371***	***5.5***	***4.8; 11.6***

图86

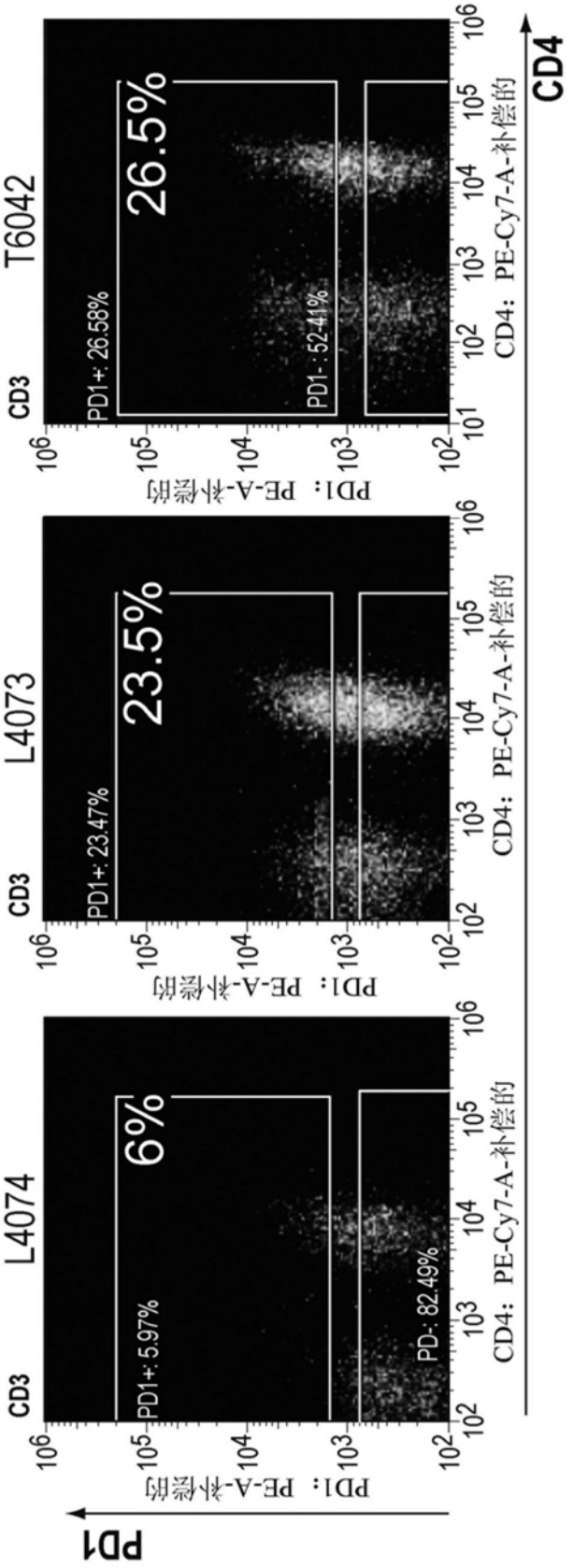

T6042
CD3
PD1+: 26.58%
26.5%
PD1-: 52.41%
L4073
CD3
PD1+: 23.47%
23.5%
L4074
CD3
PD1+: 5.97%
6%
PD-: 82.49%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
PD1
CD4

图87

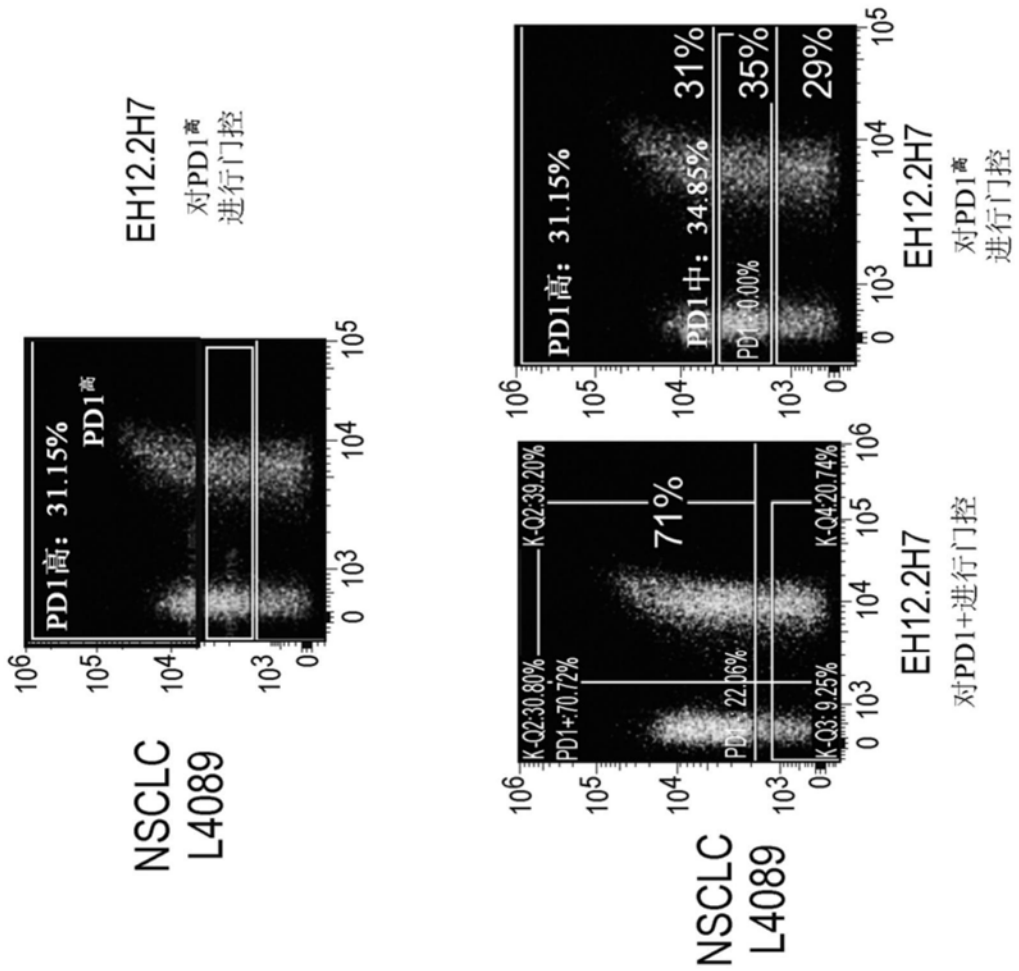

NSCLC
L4089
EH12.2H7
对PD1高
进行门控
PD1高：31.15%
PD1高
NSCLC
L4089
EH12.2H7
对PD1+进行门控
K-Q2:30.80%
PD1+:70.72%
K-Q2:39.20%
71%
PD1-:22.06%
K-Q3:9.25%
K-Q4:20.74%
EH12.2H7
对PD1高
进行门控
PD1高：31.15%
PD1中：34.85%
31%
35%
PD1低:0.00%
29%

图88

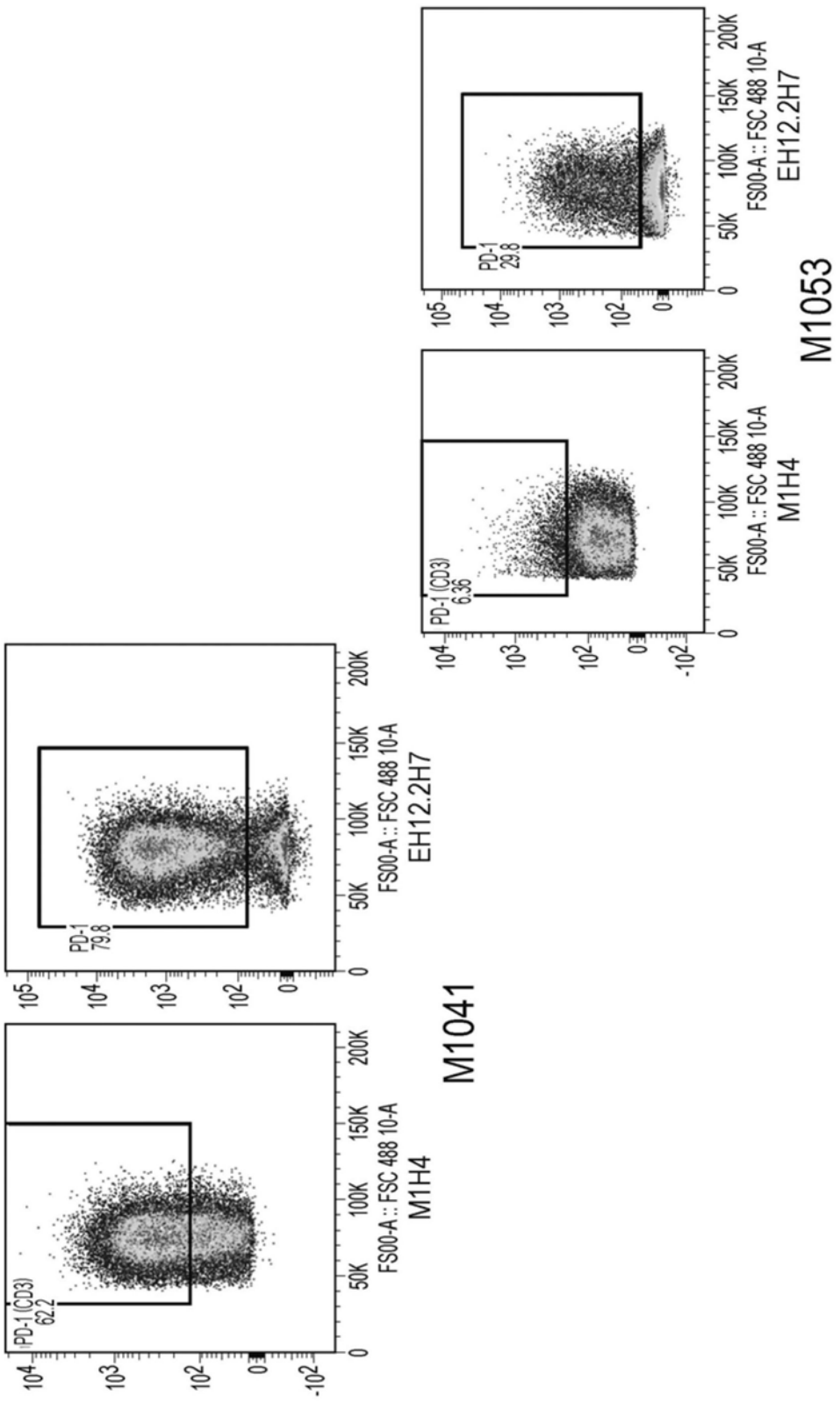

M1041
M1053
PD-1 (CD3)
62.2
PD-1
79.8
PD-1 (CD3)
6.36
PD-1
29.8
M1H4
EH12.2H7
FS00-A :: FSC 488 10-A

图89

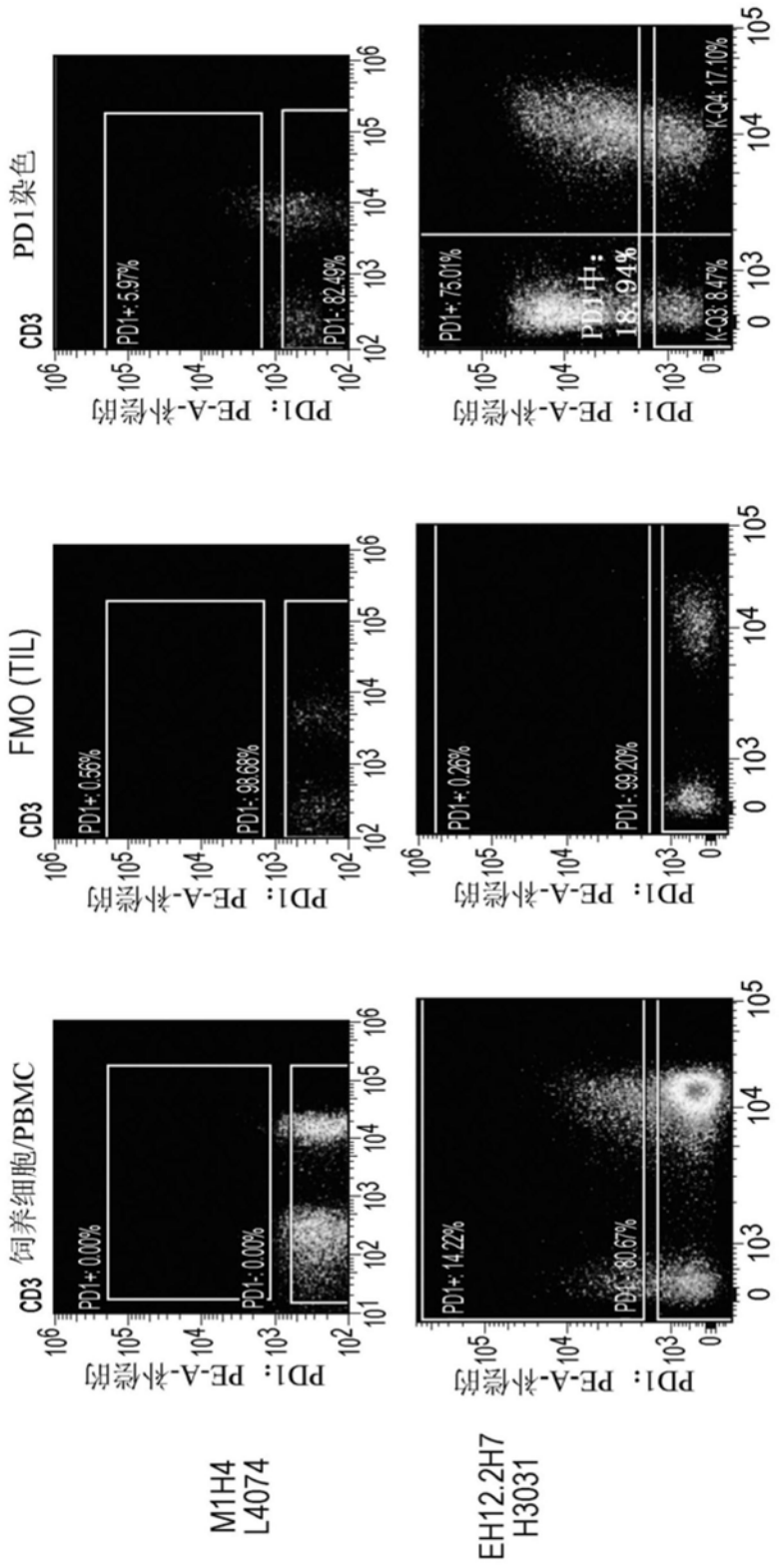

PD1染色
FMO (TIL)
饲养细胞/PBMC
CD3
PD1+ 5.97%
PD1- 82.49%
PD1+ 75.01%
PD1中：18.94%
K-Q3: 8.47%
K-Q4: 17.10%
PD1+ 0.56%
PD1- 98.68%
PD1+ 0.26%
PD1- 99.20%
PD1+ 0.00%
PD1- 0.00%
PD1+ 14.22%
PD1- 80.67%
PD1：PE-A-补偿的
M1H4
L4074
EH12.2H7
H3031

图90

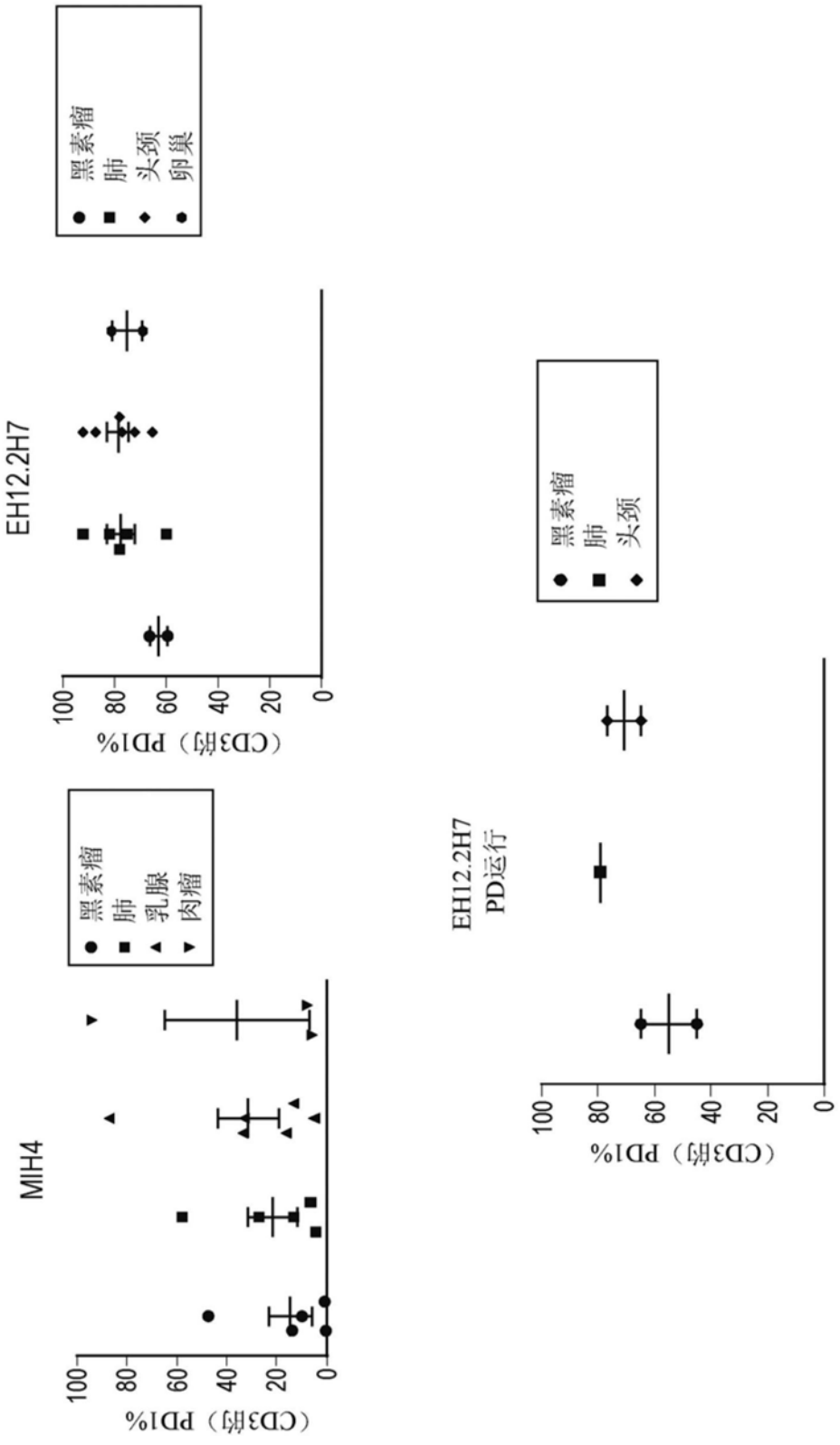

黑素瘤
肺
头颈
卵巢
EH12.2H7
（CD3的）PD1%
100
80
60
40
20
0
黑素瘤
肺
乳腺
肉瘤
MIH4
（CD3的）PD1%
100
80
60
40
20
0
黑素瘤
肺
头颈
EH12.2H7
PD运行
（CD3的）PD1%
100
80
60
40
20
0

图91

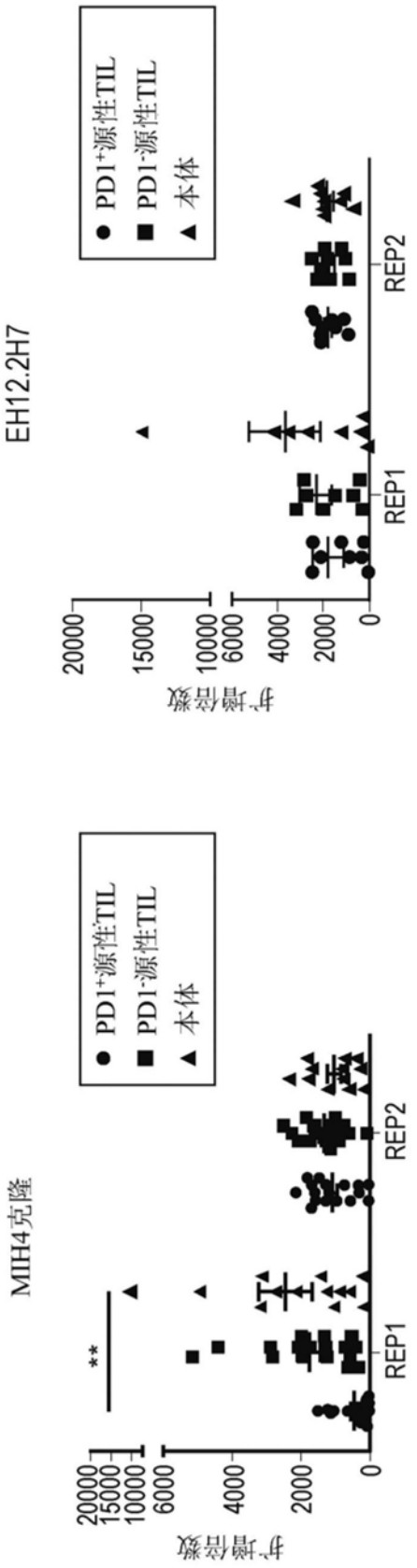

EH12.2H7
PD1+源性TIL
PD1-源性TIL
本体
扩增倍数
20000
15000
10000
6000
4000
2000
0
REP1
REP2
MIH4克隆
**
PD1+源性TIL
PD1-源性TIL
本体
扩增倍数
20000
15000
10000
6000
4000
2000
0
REP1
REP2

图92

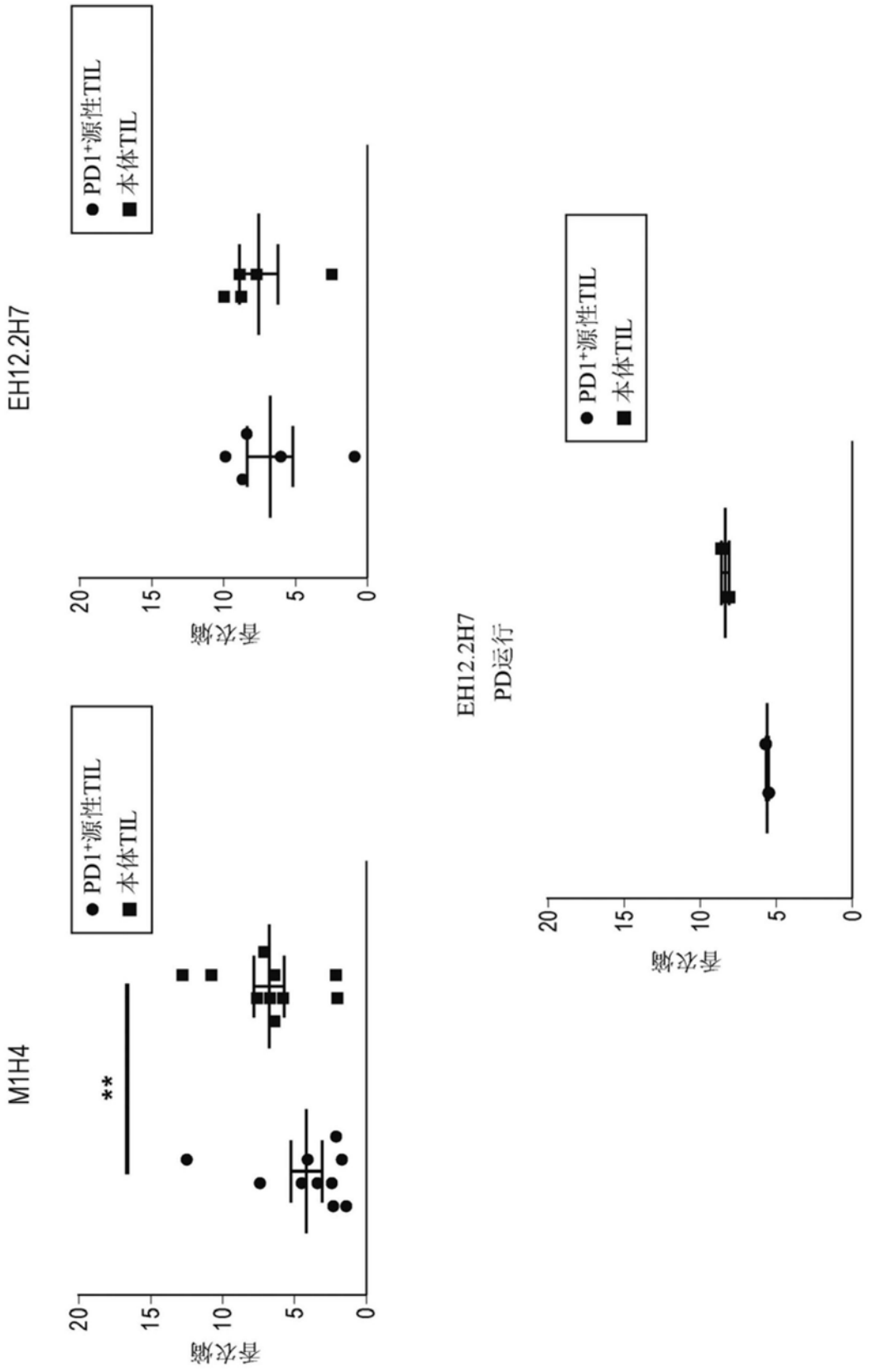

M1H4
**
PD1+源性TIL
本体TIL
香农熵
20
15
10
5
0
EH12.2H7
PD1+源性TIL
本体TIL
香农熵
20
15
10
5
0
EH12.2H7
PD运行
PD1+源性TIL
本体TIL
香农熵
20
15
10
5
0

图93

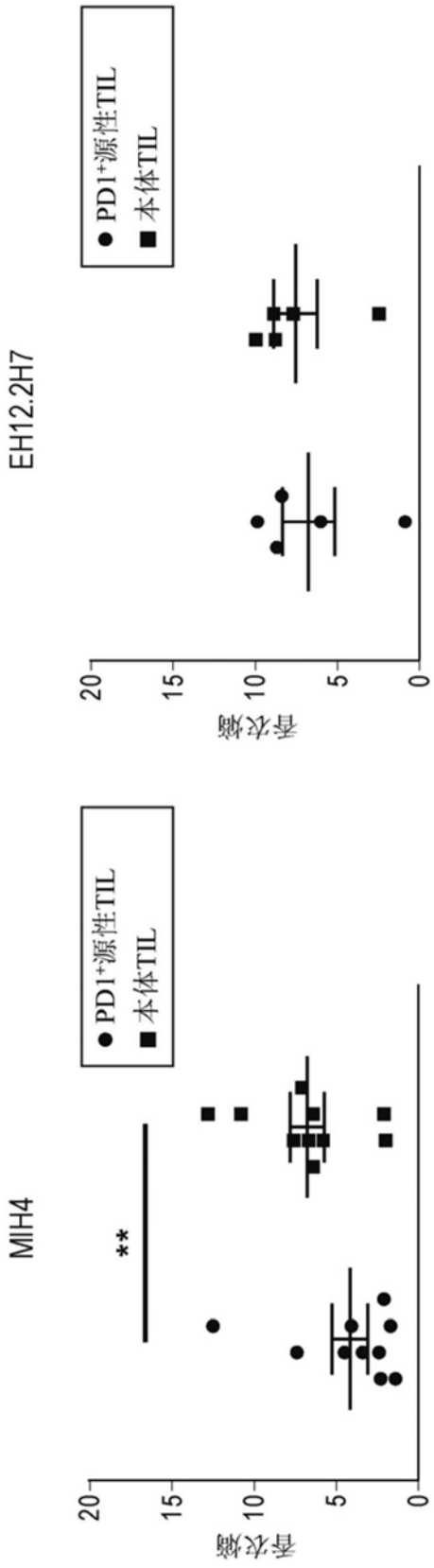

EH12.2H7
● PD1+源性TIL
■ 本体TIL
香农熵
20
15
10
5
0
MIH4
**
● PD1+源性TIL
■ 本体TIL
香农熵
20
15
10
5
0

图94

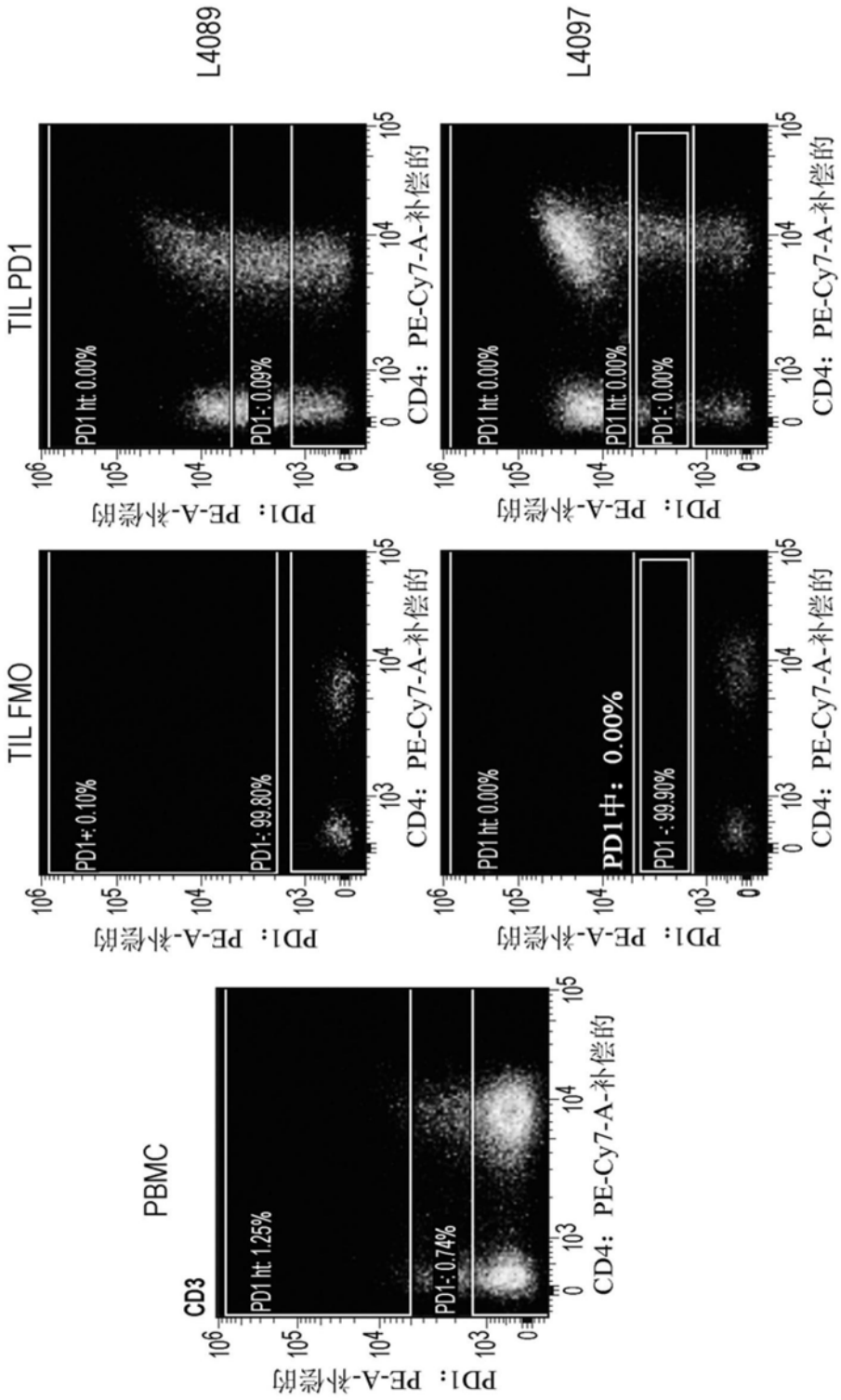
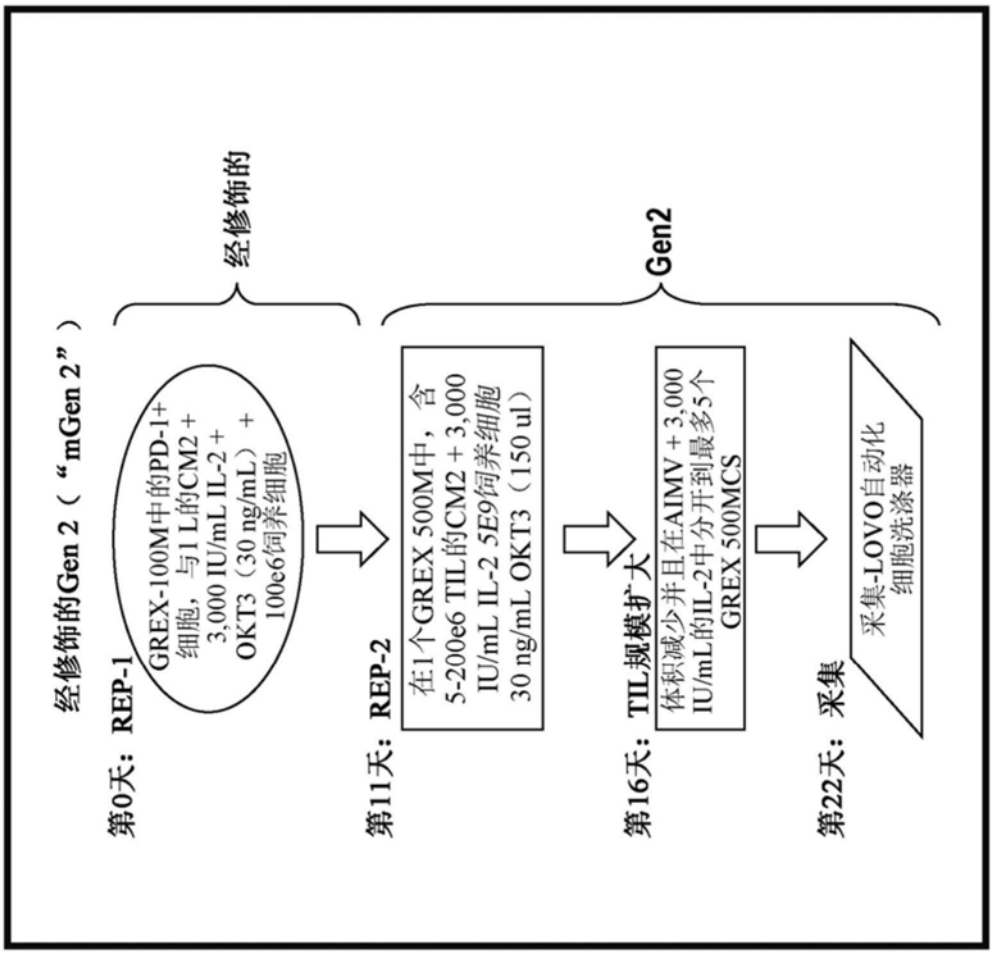

L4089
L4097
TIL PD1
TIL FMO
PBMC
CD3
PD1 ht: 0.00%
PD1-: 0.09%
PD1 ht: 0.00%
PD1-: 0.00%
PD1+: 0.10%
PD1-: 99.80%
PD1 ht: 0.00%
PD1中： 0.00%
PD1-: 99.90%
PD1 ht: 1.25%
PD1-: 0.74%
PD1： PE-A-补偿的
CD4： PE-Cy7-A-补偿的

图95


经修饰的Gen 2（“mGen 2”）
经修饰的
Gen2
第0天：REP-1
GREX-100M中的PD-1+细胞，与1 L的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 100e6饲养细胞
第11天：REP-2
在1个GREX 500M中，含5-200e6 TIL的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 5E9饲养细胞 30 ng/mL OKT3（150 ul）
第16天：TIL规模扩大
体积减少并且在AIMV + 3,000 IU/mL的IL-2中分开到最多5个GREX 500MCS
第22天：采集
采集-LOVO自动化细胞洗涤器

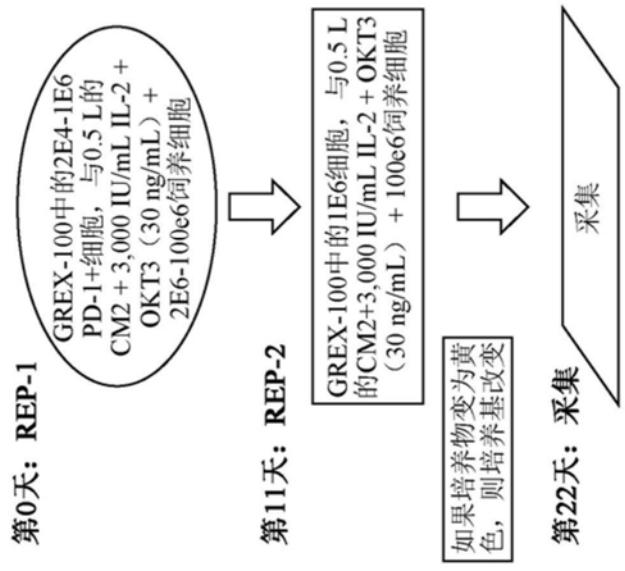

第0天：REP-1
GREX-100中的2E4-1E6 PD-1+细胞，与0.5 L的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 2E6-100e6饲养细胞
第11天：REP-2
GREX-100中的1E6细胞，与0.5 L的CM2+3,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 100e6饲养细胞
如果培养物变为黄色，则培养基改变
第22天：采集
采集

图96

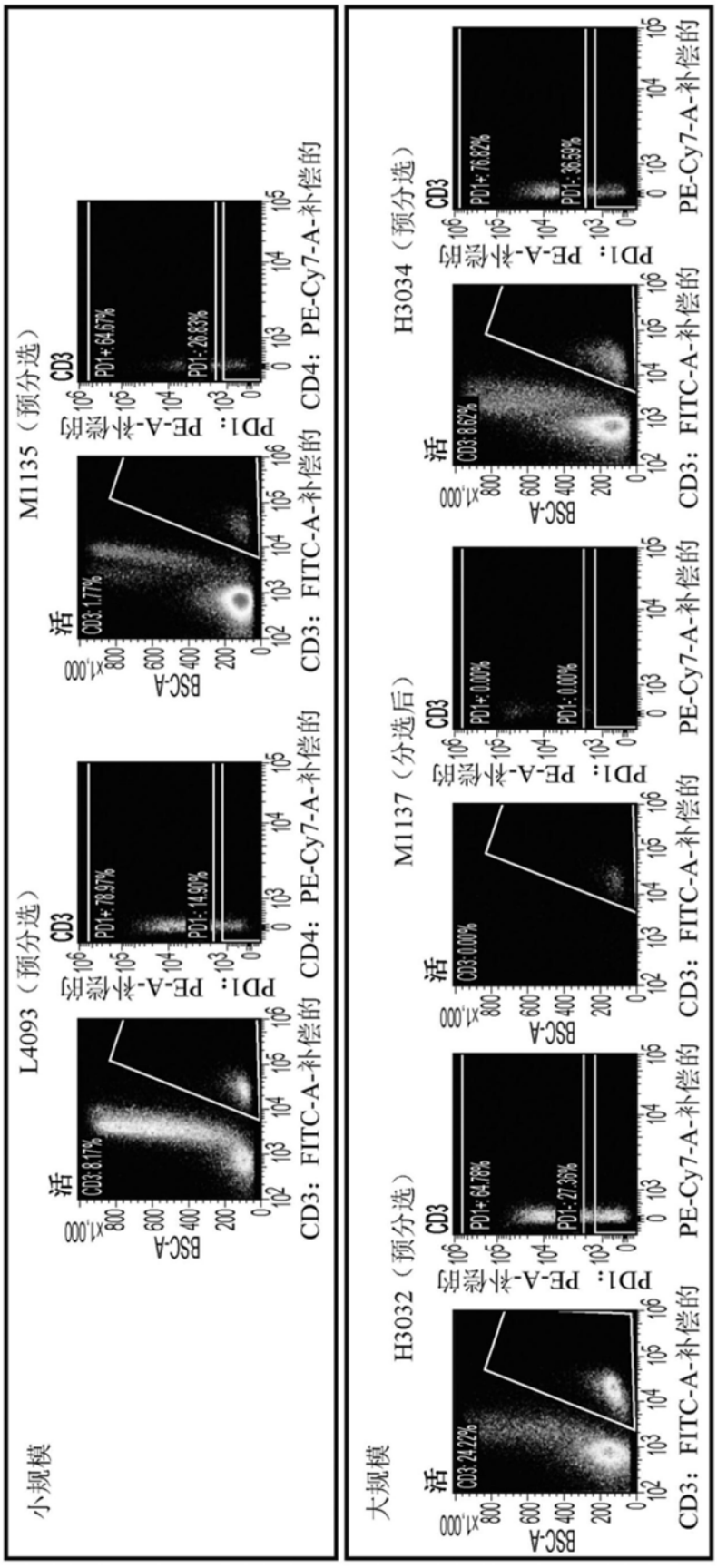

小规模
大规模
L4093（预分选）
M1135（预分选）
H3032（预分选）
M1137（分选后）
H3034（预分选）
活
CD3
BSC-A
PD1+ PE-A-补偿的
CD3: 8.17%
PD1+: 78.97%
PD1-: 14.90%
CD3: 1.77%
PD1+: 64.67%
PD1-: 26.83%
CD3: 24.22%
PD1+: 64.78%
PD1-: 27.36%
CD3: 0.00%
PD1+: 0.00%
PD1-: 0.00%
CD3: 8.62%
PD1+: 76.82%
PD1-: 30.59%
CD3：FITC-A-补偿的 CD4：PE-Cy7-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的 PE-Cy7-A-补偿的

图97

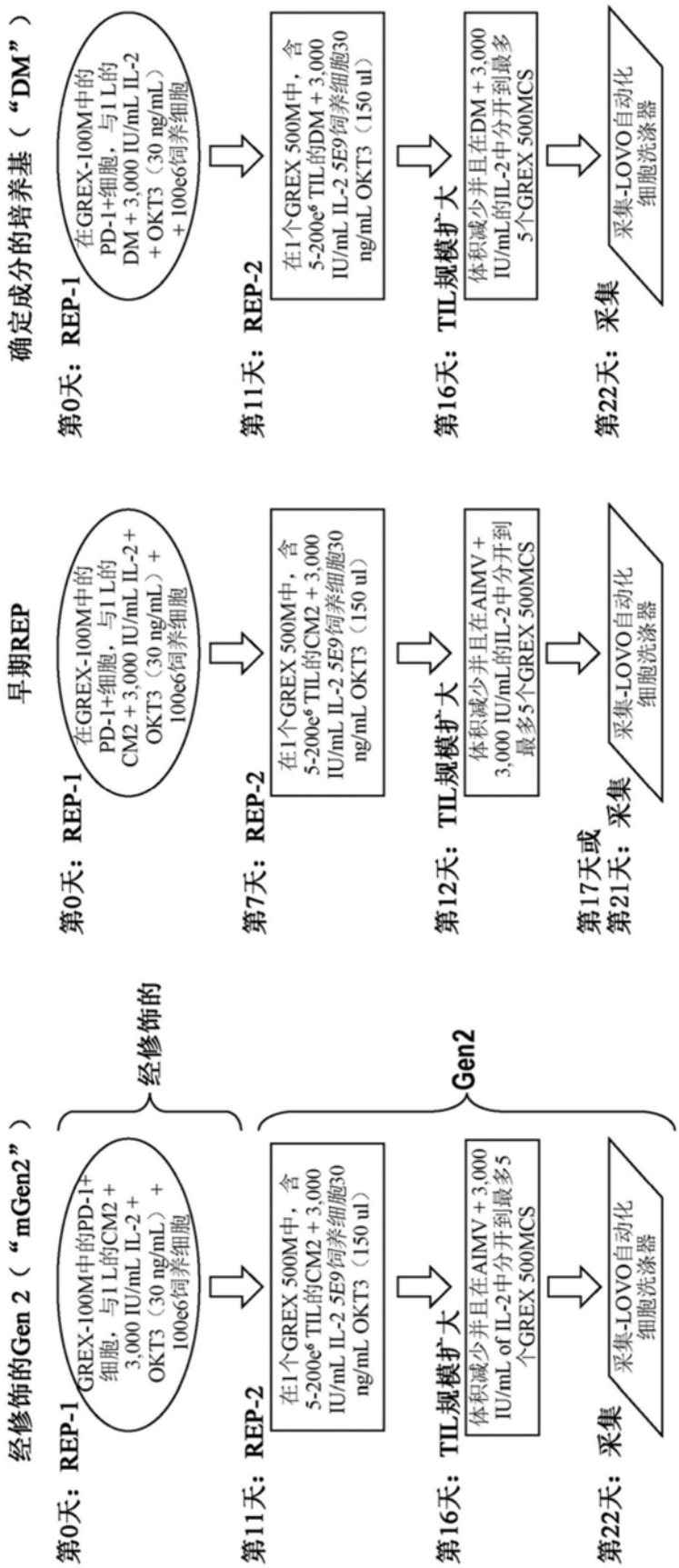

经修饰的Gen 2（“mGen2”）
第0天：REP-1
GREX-100M中的PD-1+细胞，与1 L的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 100e6饲养细胞
第11天：REP-2
在1个GREX 500M中，含5-200e6 TIL的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 5E9饲养细胞30 ng/mL OKT3（150 ul）
第16天：TIL规模扩大
体积减少并且在AIMV + 3,000 IU/mL of IL-2中分开到最多5个GREX 500MCS
第22天：采集
采集-LOVO自动化细胞洗涤器
经修饰的
Gen2
早期REP
第0天：REP-1
在GREX-100M中的PD-1+细胞，与1 L的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 100e6饲养细胞
第7天：REP-2
在1个GREX 500M中，含5-200e6 TIL的CM2 + 3,000 IU/mL IL-2 5E9饲养细胞30 ng/mL OKT3（150 ul）
第12天：TIL规模扩大
体积减少并且在AIMV + 3,000 IU/mL的IL-2中分开到最多5个GREX 500MCS
第17天或第21天：采集
采集-LOVO自动化细胞洗涤器
确定成分的培养基（“DM”）
第0天：REP-1
在GREX-100M中的PD-1+细胞，与1 L的DM + 3,000 IU/mL IL-2 + OKT3（30 ng/mL）+ 100e6饲养细胞
第11天：REP-2
在1个GREX 500M中，含5-200e6 TIL的DM + 3,000 IU/mL IL-2 5E9饲养细胞30 ng/mL OKT3（150 ul）
第16天：TIL规模扩大
体积减少并且在DM + 3,000 IU/mL的IL-2中分开到最多5个GREX 500MCS
第22天：采集
采集-LOVO自动化细胞洗涤器

图98

	肺（L4093）				黑素瘤（M1135）			
流动分选汇总								
预分选（CD3+PD1+%）的数量	5.6e5 (6.5%)				4.88 e4 (1.2%)			
所分选（产率%）的数量	4.5e5 (80.7%)				4.8e4 (98.4)			
*分选后纯度（%）	85%				75.7%			
TIL扩增汇总	***研究 PD1+***	***Gen 2 PD1+***	***Gen 2 DM PD1+***	***ΛER PD1+***	***研究 PD1+***	***Gen 2 PD1+***	***Gen 2 DM PD1+***	***ΛER PD1+***
REP1种子（G-Rex100/100M）的数量	4.48e5	4.48e5	4.48e5	4.48e5	4.8e4	4.8e4	4.8e4	4.8e4
REP1采集（外推）的数量	599e6	560e6	225e6	44e6	34e6	272e6	256e6	46e6
REP 1扩增倍数	1336	1249	503	99	705	5670	5334	958
REP2种子（G-Rex100/500M）的数量	1e6	200e6	200e6	44e6	1e6	200e6	200e6	44e6
REP2采集（外推）的数量	24e9	97e9	64e9	55e9	4.3e9	99e9	97e9	37e9
REP 2扩增倍数	404	483	318	247	1282	497	483	270

#，总活细胞（TVC）
*，纯度基于FSC/CD3+/PD1+，但不基于活细胞
λ，第7天的REP1，第17天的REP 2

图99

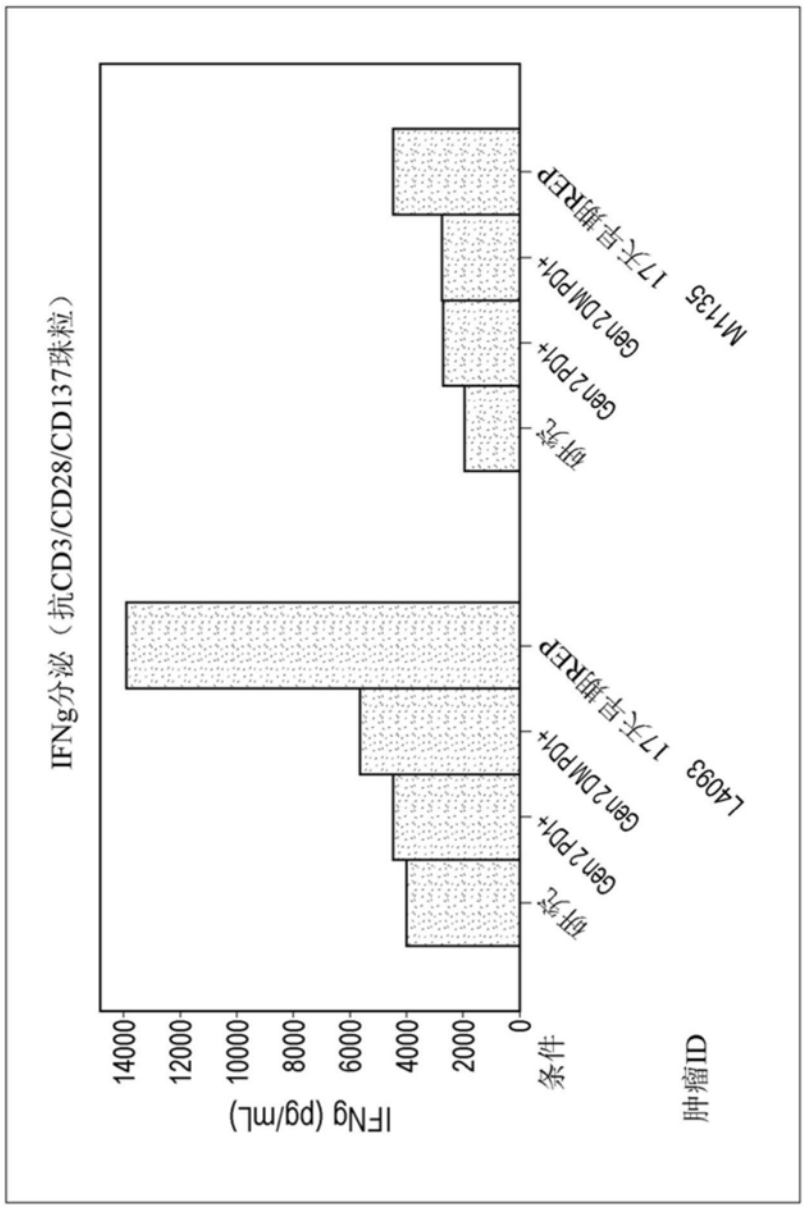

IFNg分泌（抗CD3/CD28/CD137珠粒）
IFNg (pg/mL)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
条件
肿瘤ID
研究
Gen 2 PDI+
Gen 2 DM PDI+
17天早期REP
L4093
研究
Gen 2 PDI+
Gen 2 DM PDI+
17天早期REP
M1135

图100

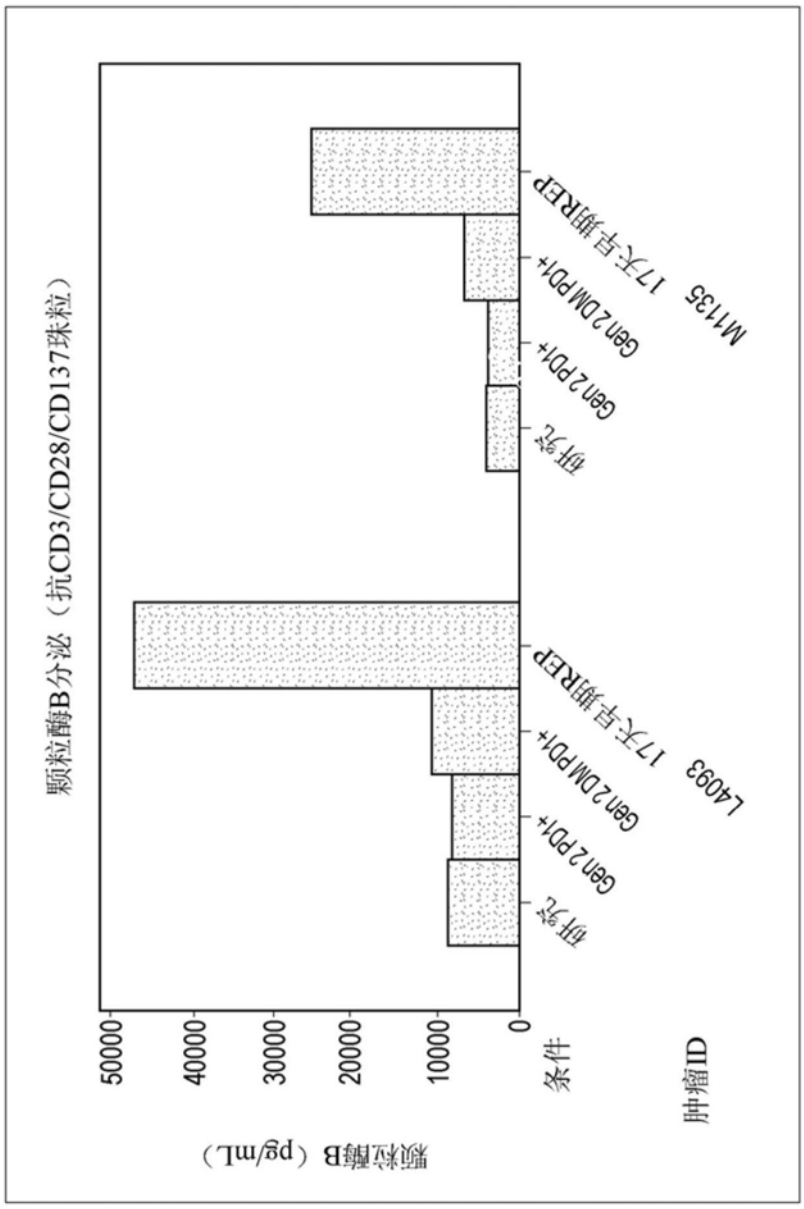

颗粒酶B分泌（抗CD3/CD28/CD137珠粒）
颗粒酶B（pg/mL）
50000
40000
30000
20000
10000
0
条件
肿瘤ID
研究
Gen 2 PDI+
Gen 2 DM PDI+
17天早期REP
L4093
M1135

图101

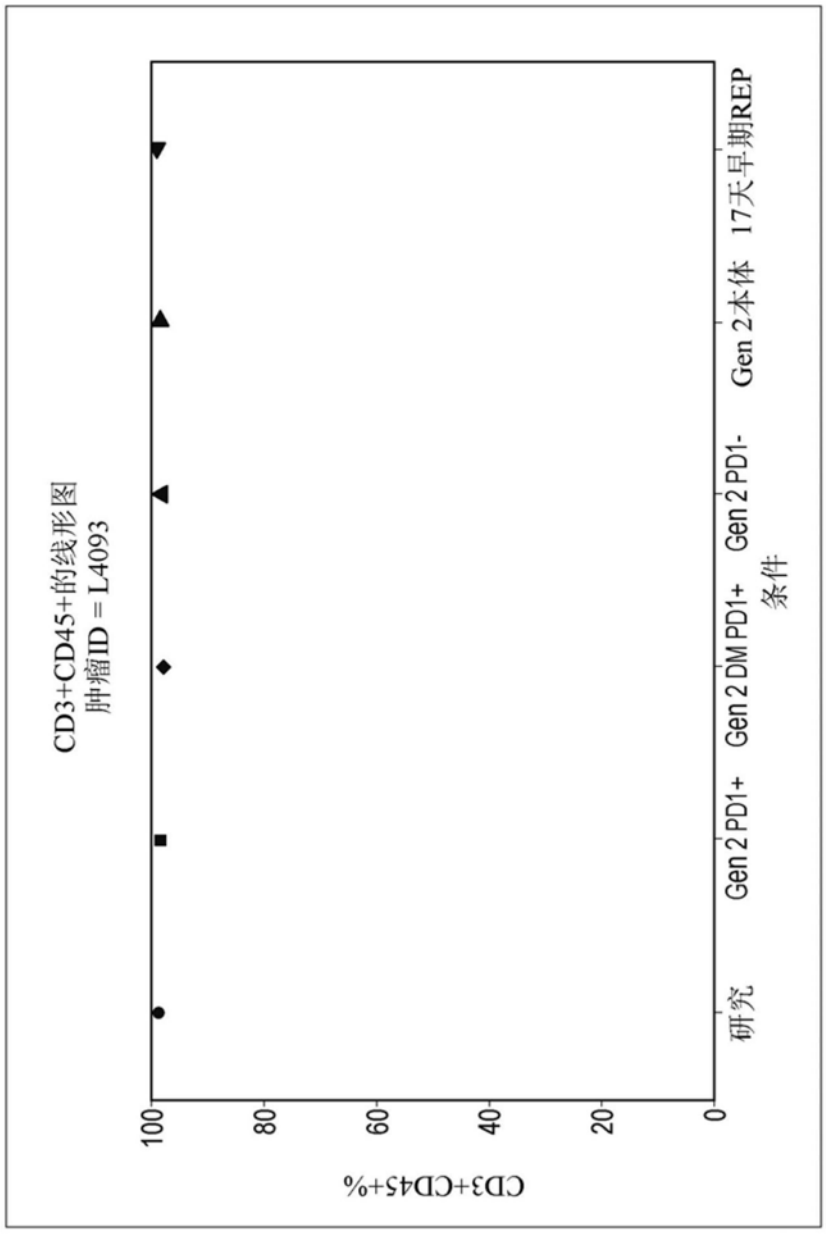

CD3+CD45+的线形图
肿瘤ID = L4093
CD3+CD45+%
100
80
60
40
20
0
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
条件

图102

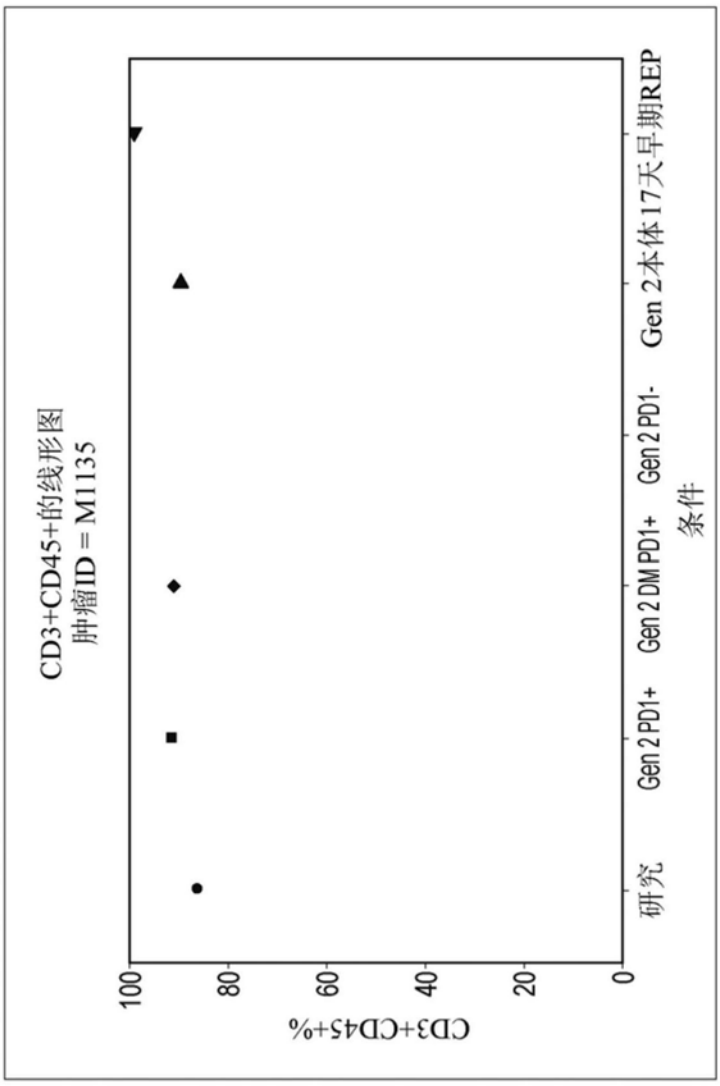

CD3+CD45+的线形图
肿瘤ID = M1135
CD3+CD45+%
100
80
60
40
20
0
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体17天早期REP
条件

图103

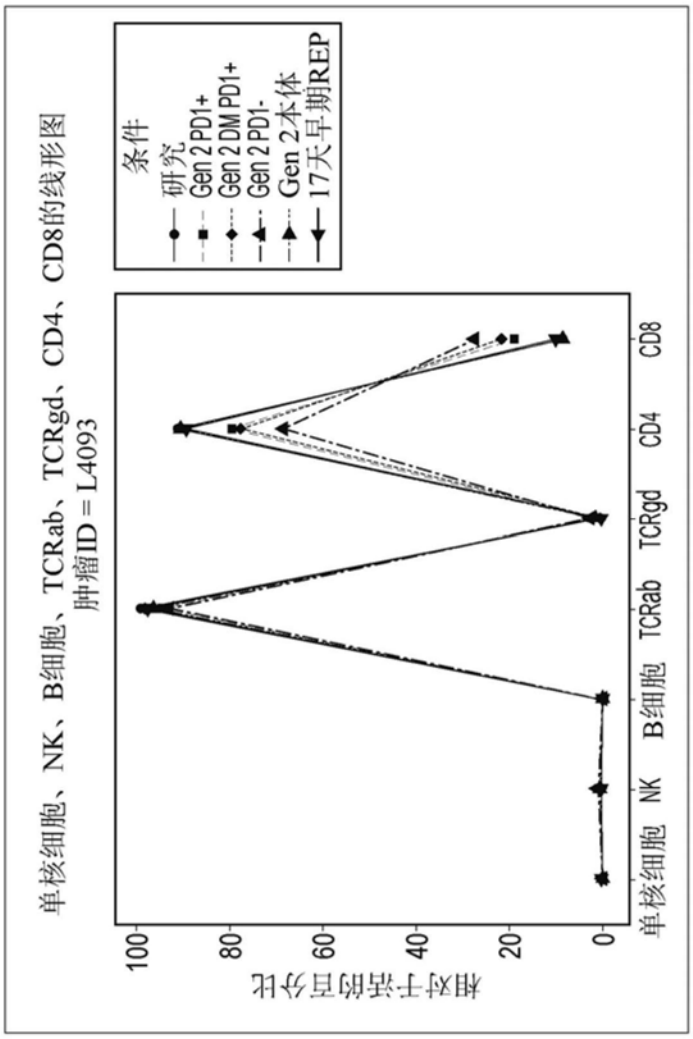

单核细胞、NK、B细胞、TCRab、TCRgd、CD4、CD8的线形图
肿瘤ID = L4093
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于活的百分比
100
80
60
40
20
0
单核细胞
NK
B细胞
TCRab
TCRgd
CD4
CD8

图104

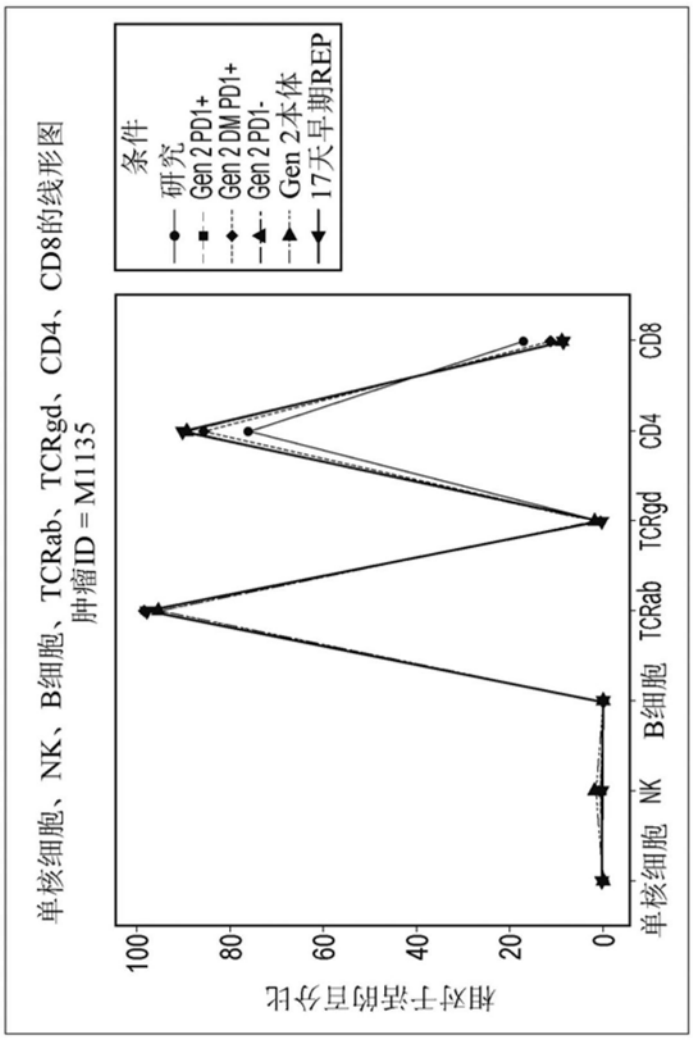

单核细胞、NK、B细胞、TCRab、TCRgd、CD4、CD8的线形图
肿瘤ID = M1135
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于活的百分比
100
80
60
40
20
0
单核细胞
NK
B细胞
TCRab
TCRgd
CD4
CD8

图105

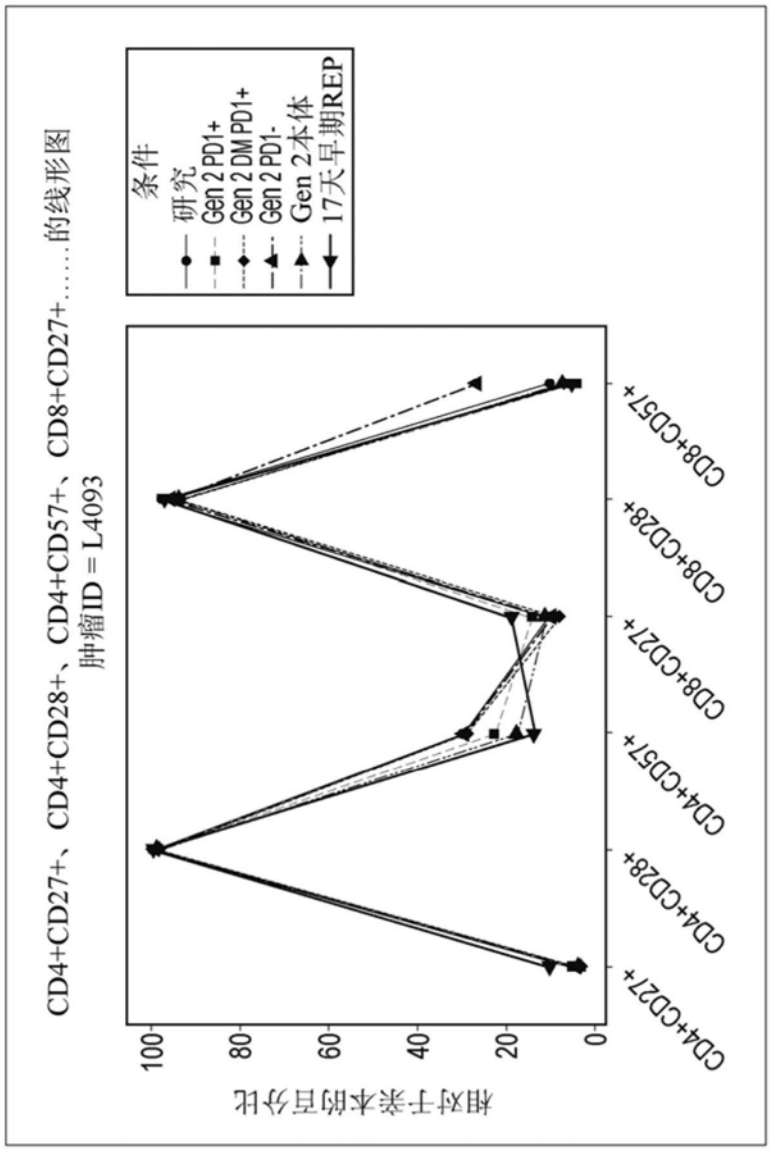

CD4+CD27+、CD4+CD28+、CD4+CD57+、CD8+CD27+.....的线形图
肿瘤ID = L4093
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于亲本的百分比
100
80
60
40
20
0
CD4+CD27+
CD4+CD28+
CD4+CD57+
CD8+CD27+
CD8+CD28+
CD8+CD57+

图106A

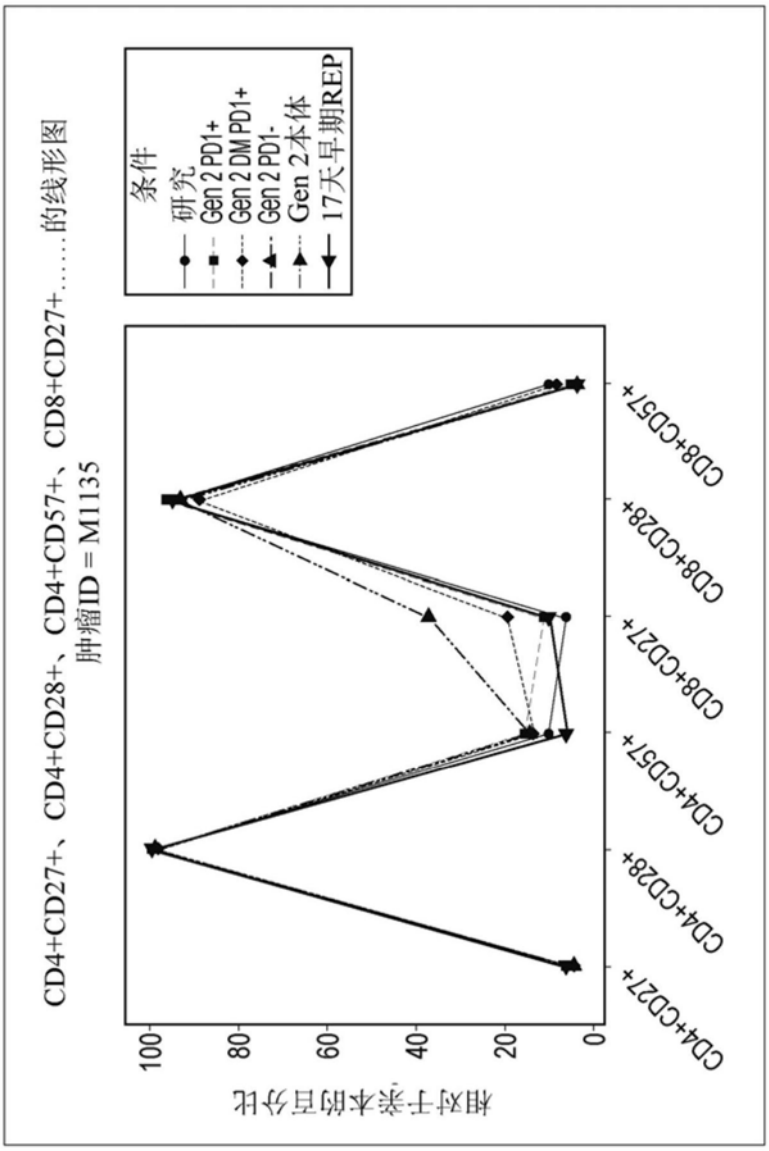

CD4+CD27+、CD4+CD28+、CD4+CD57+、CD8+CD27+.....的线形图
肿瘤ID = M1135
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于亲本的百分比
100
80
60
40
20
0
CD4+CD27+
CD4+CD28+
CD4+CD57+
CD8+CD27+
CD8+CD28+
CD8+CD57+

图106B

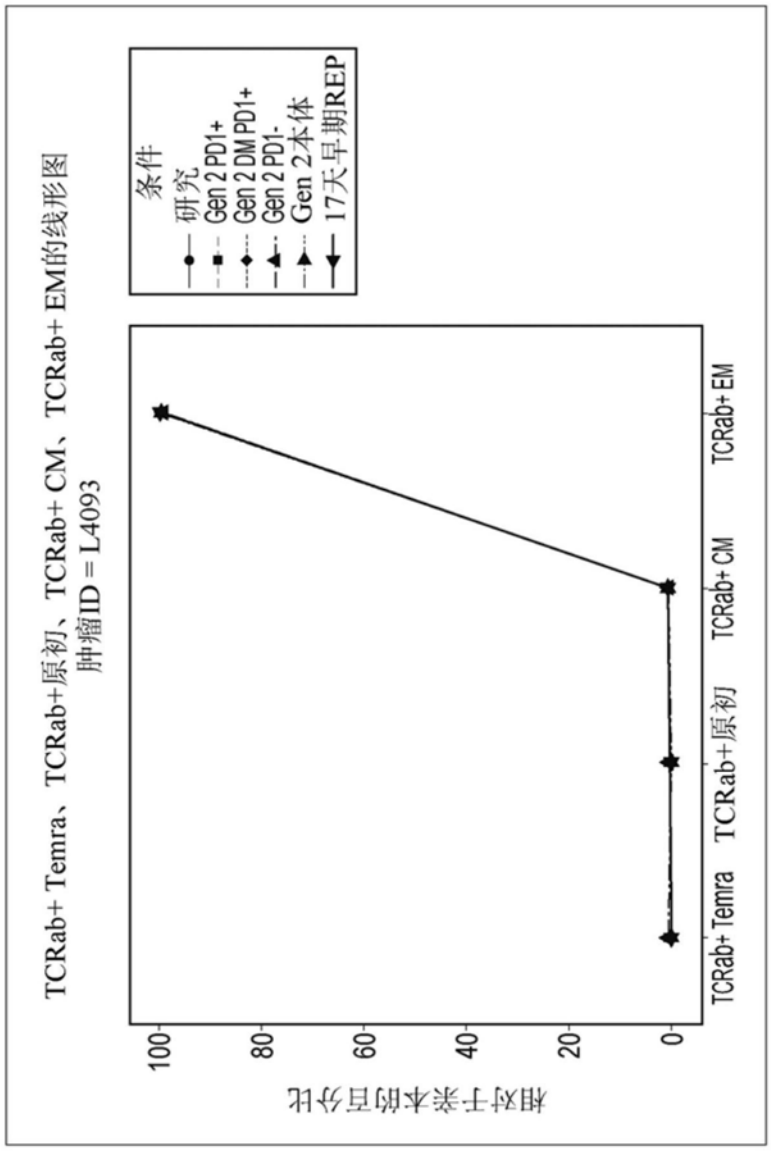

TCRab+ Temra、TCRab+原初、TCRab+ CM、TCRab+ EM的线形图
肿瘤ID = L4093
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于亲本的百分比
100
80
60
40
20
0
TCRab+ Temra
TCRab+原初
TCRab+ CM
TCRab+ EM

图107A

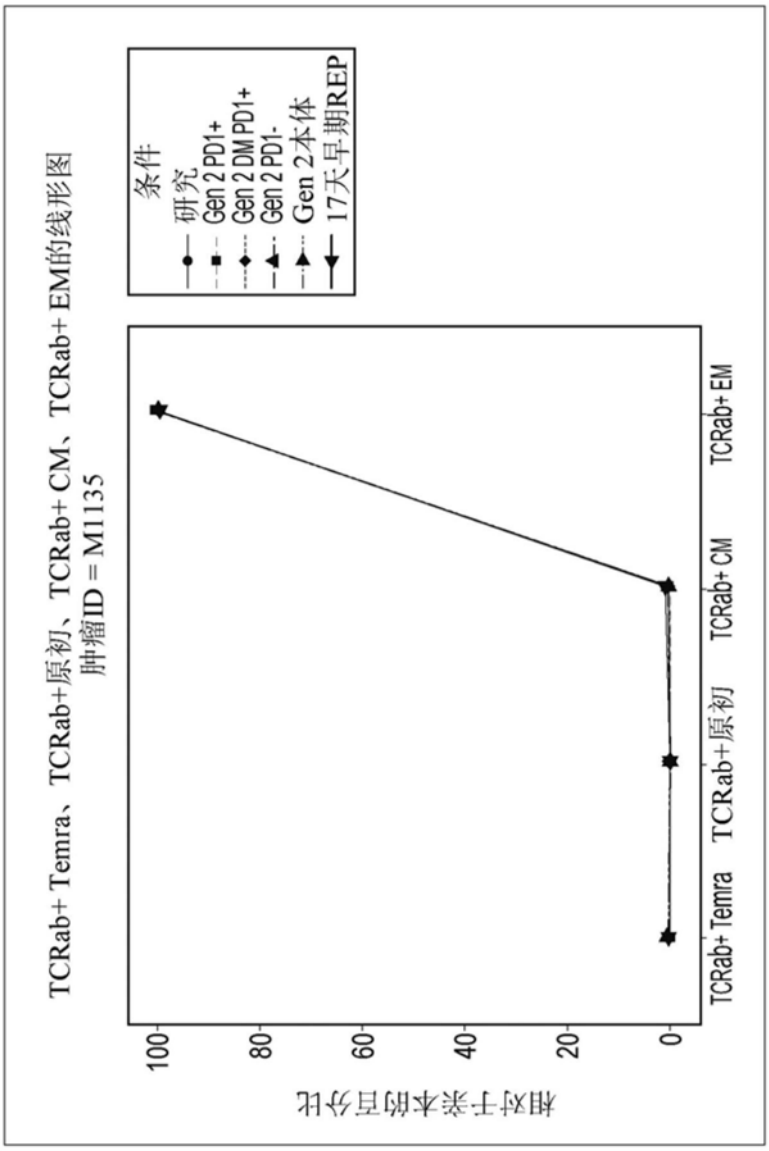

TCRab+ Temra、TCRab+原初、TCRab+ CM、TCRab+ EM的线形图
肿瘤ID = M1135
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于亲本的百分比
100
80
60
40
20
0
TCRab+ Temra
TCRab+原初
TCRab+ CM
TCRab+ EM

图107B

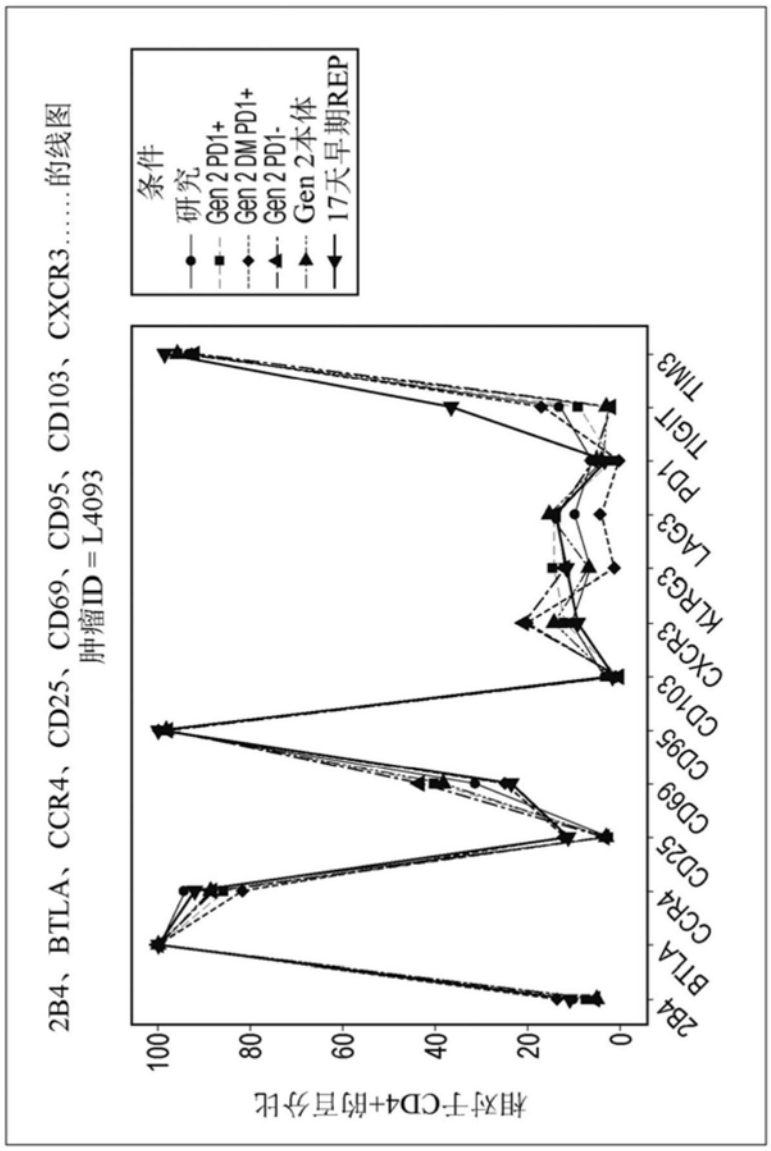

2B4、BTLA、CCR4、CD25、CD69、CD95、CD103、CXCR3……的线图
肿瘤ID = L4093
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于CD4+的百分比
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3

图108A

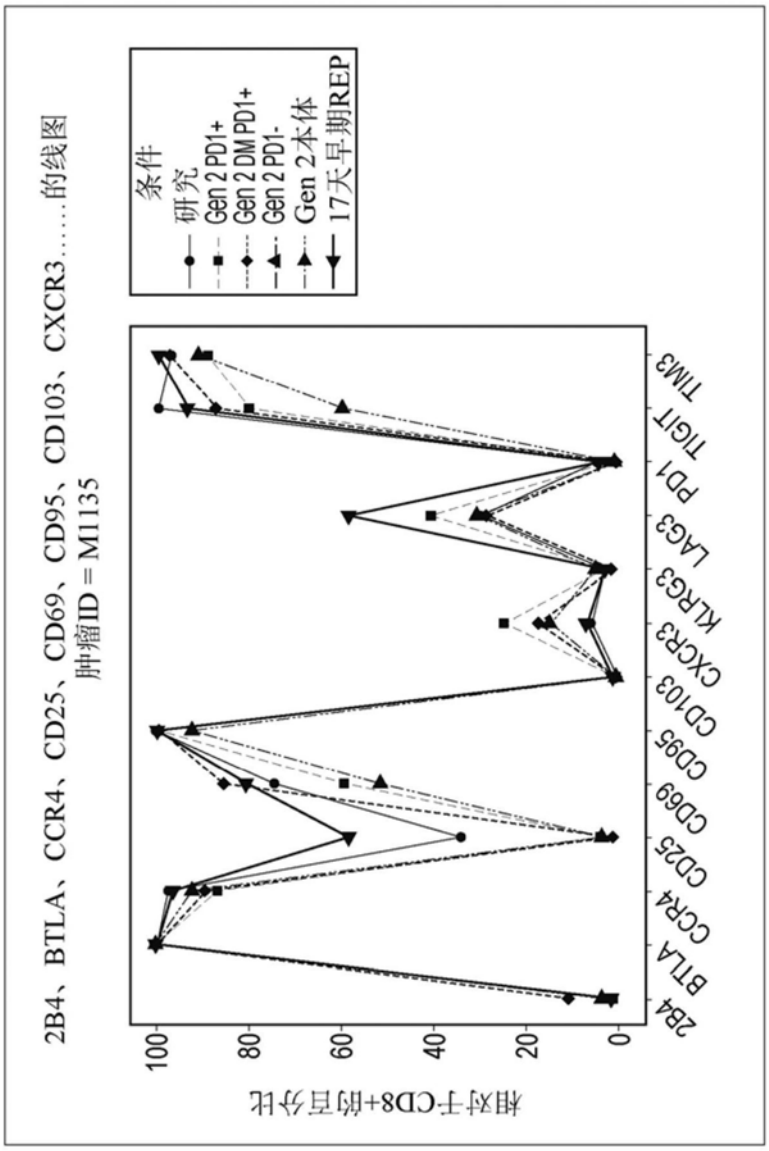

2B4、BTLA、CCR4、CD25、CD69、CD95、CD103、CXCR3.....的线图
肿瘤ID = M1135
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于CD8+的百分比
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3

图108B

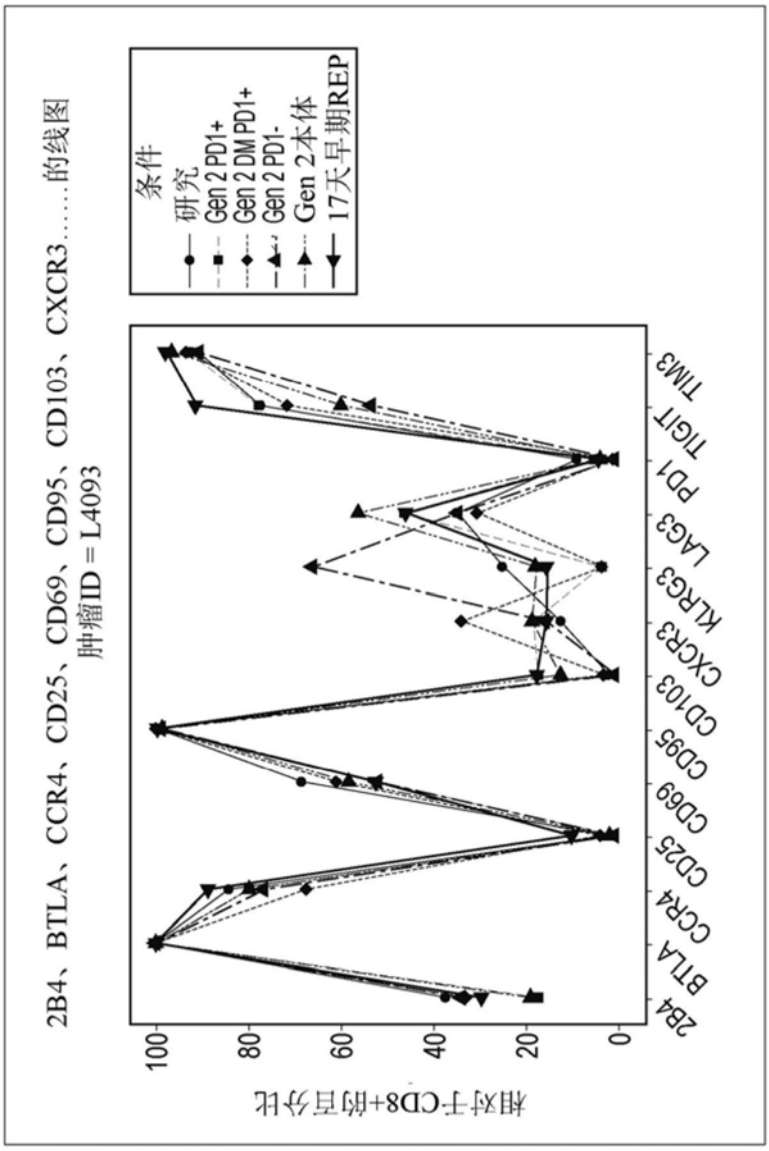

2B4、BTLA、CCR4、CD25、CD69、CD95、CD103、CXCR3.....的线图
肿瘤ID = L4093
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天早期REP
相对于CD8+的百分比
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3

图109A

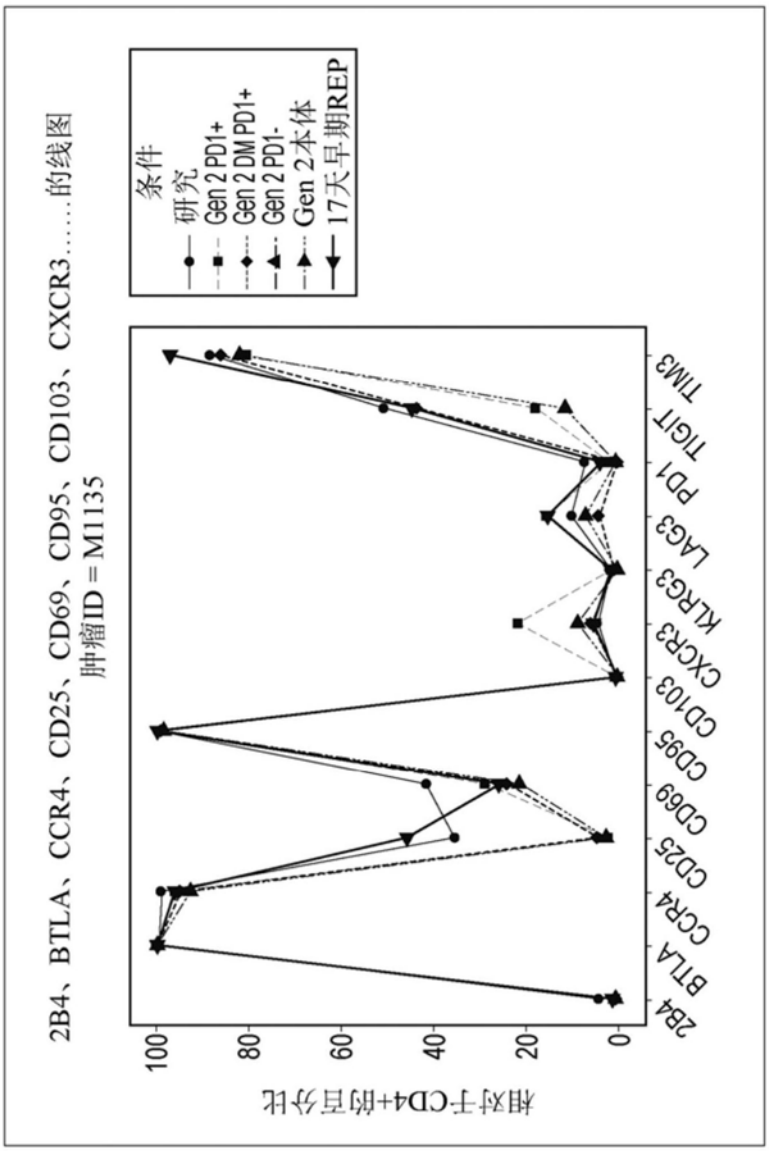

2B4、BTLA、CCR4、CD25、CD69、CD95、CD103、CXCR3……的线图
肿瘤ID = M1135
条件
研究
Gen 2 PD1+
Gen 2 DM PD1+
Gen 2 PD1-
Gen 2本体
17天-早期REP
相对于CD4+的百分比
100
80
60
40
20
0
2B4
BTLA
CCR4
CD25
CD69
CD95
CD103
CXCR3
KLRG3
LAG3
PD1
TIGIT
TIM3

图109B

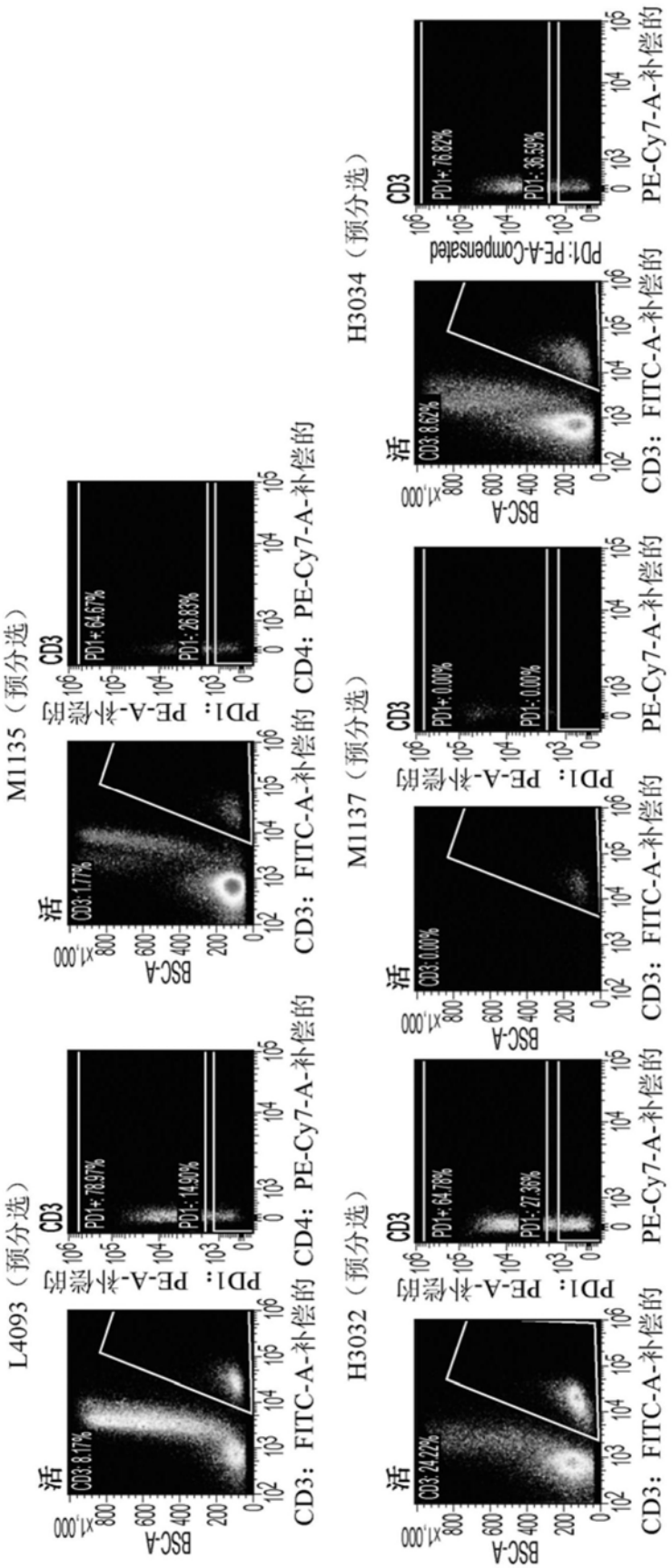

L4093（预分选）
M1135（预分选）
H3032（预分选）
M1137（预分选）
H3034（预分选）
活
BSC-A
CD3
PD1：PE-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
PD1：PE-A-Compensated
CD3：8.17%
PD1+：78.97%
PD1-：14.90%
CD3：1.77%
PD1+：64.67%
PD1-：26.83%
CD3：24.22%
PD1+：64.78%
PD1-：27.36%
CD3：0.00%
PD1+：0.00%
PD1-：0.00%
CD3：8.62%
PD1+：76.82%
PD1-：36.59%

图110

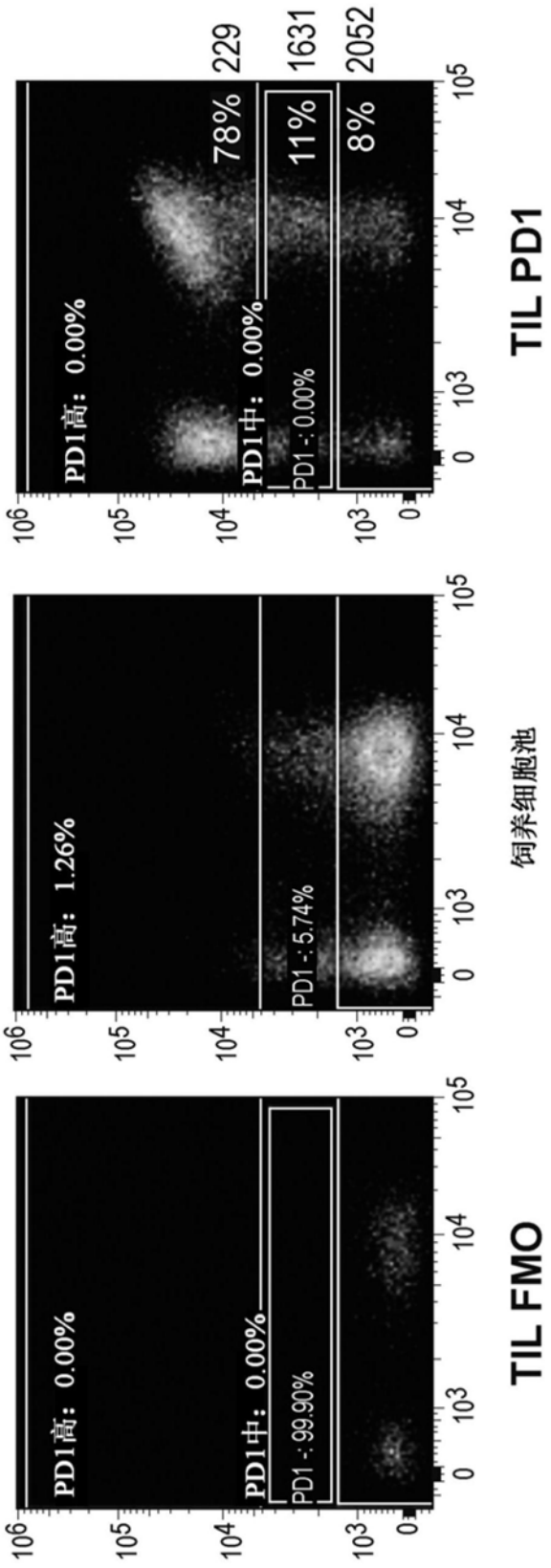

TIL FMO
饲养细胞池
TIL PD1
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：99.90%
PD1高：1.26%
PD1-：5.74%
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
78%
11%
8%
229
1631
2052

图111

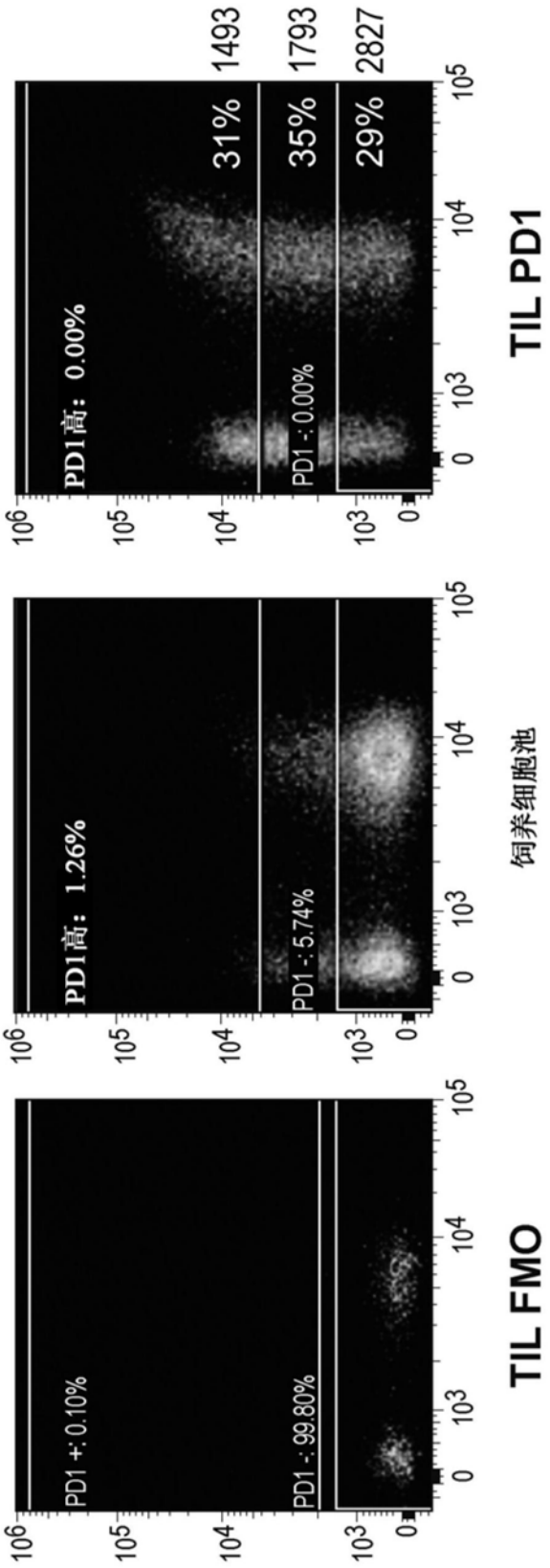

TIL FMO
PD1 +: 0.10%
PD1 -: 99.80%
饲养细胞池
PD1高: 1.26%
PD1 -: 5.74%
TIL PD1
PD1高: 0.00%
PD1 -: 0.00%
31%
35%
29%
1493
1793
2827

图112

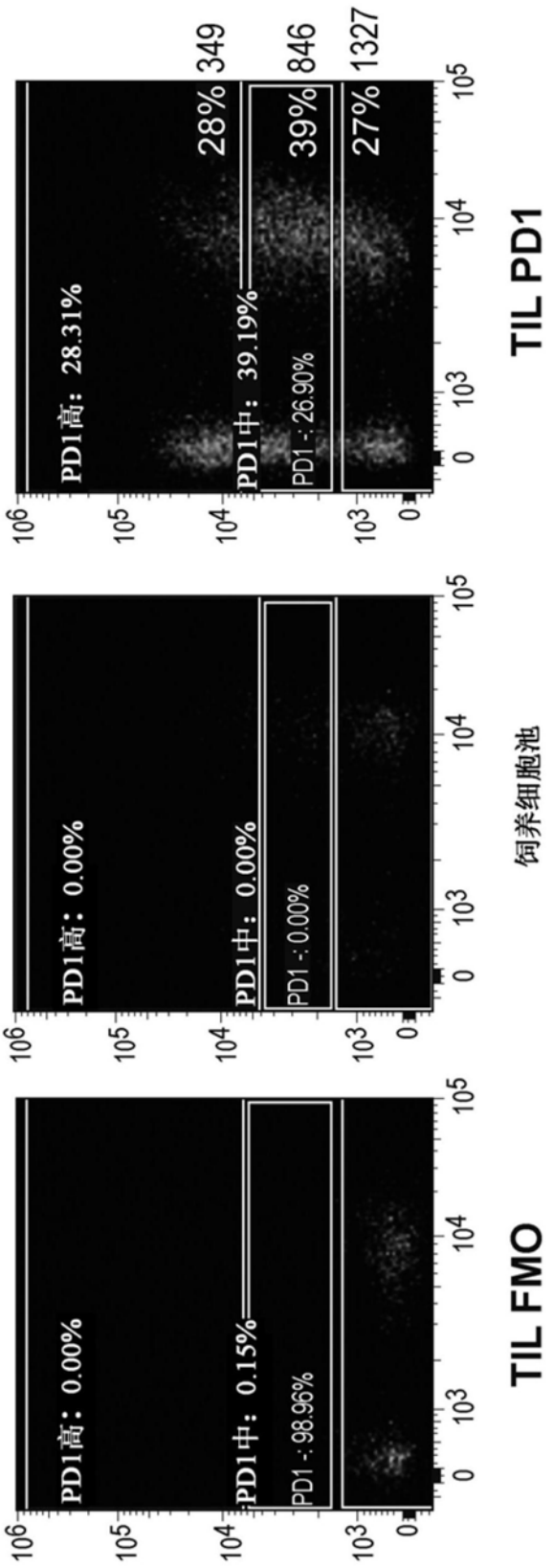

TIL PD1
饲养细胞池
TIL FMO
PD1高：28.31%
PD1中：39.19%
PD1-：26.90%
28%
39%
27%
349
846
1327
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
PD1高：0.00%
PD1中：0.15%
PD1-：98.96%
10^6
10^5
10^4
10^3
0
10^3
10^4
10^5

图113

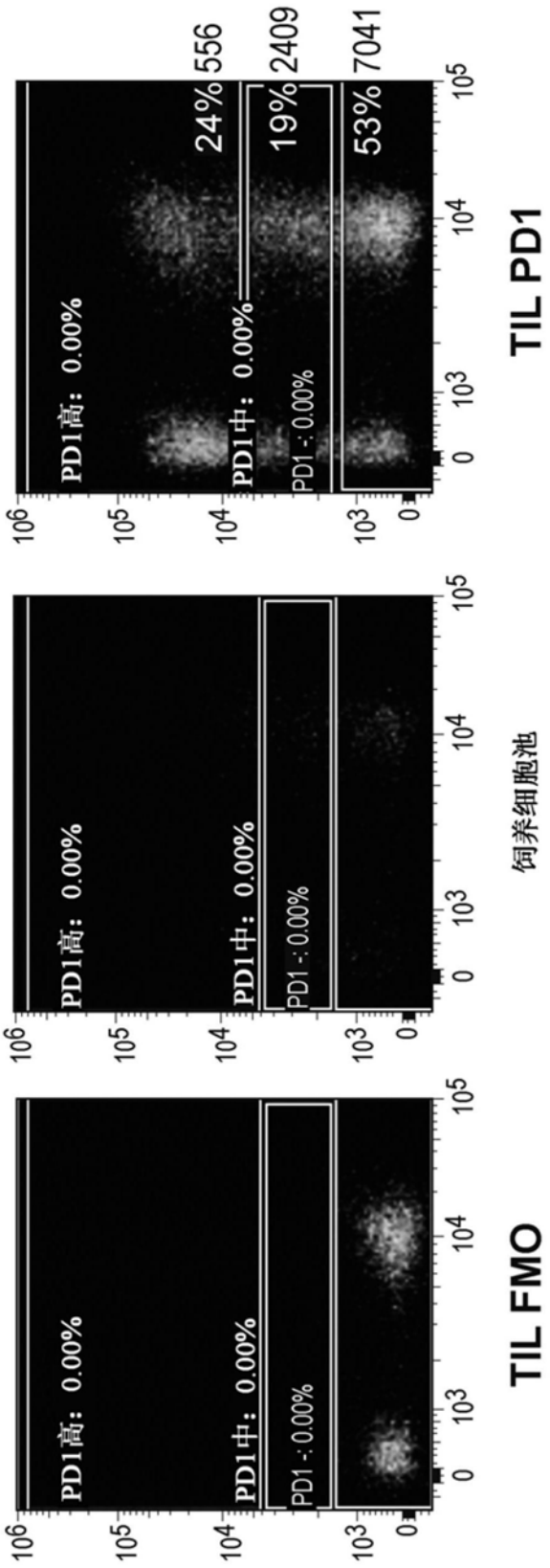

TIL PD1
TIL FMO
饲养细胞池
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1 -：0.00%
24%
19%
53%
556
2409
7041

图114

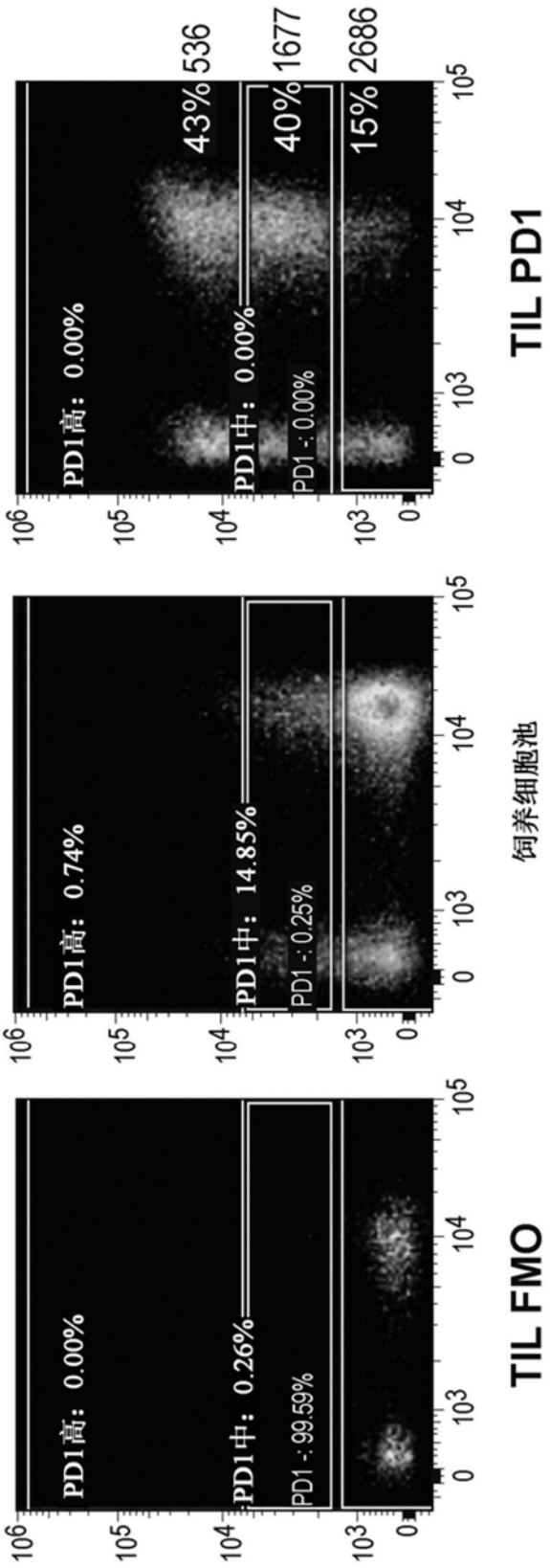

TIL FMO
饲养细胞池
TIL PD1
PD1高：0.00%
PD1中：0.26%
PD1 -：99.59%
PD1高：0.74%
PD1中：14.85%
PD1 -：0.25%
43%
536
40%
1677
15%
2686
PD1中：0.00%
PD1 -：0.00%

图115

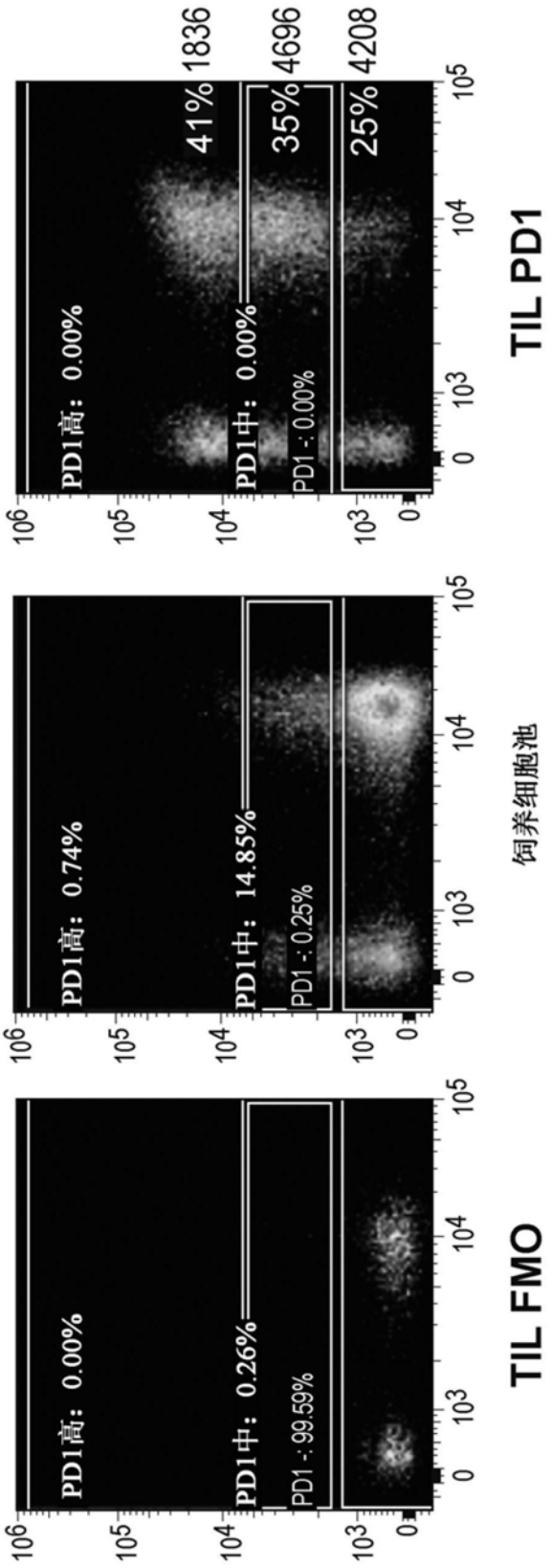

TIL PD1
饲养细胞池
TIL FMO
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
41%
35%
25%
1836
4696
4208
PD1高：0.74%
PD1中：14.85%
PD1-：0.25%
PD1高：0.00%
PD1中：0.26%
PD1-：99.59%
10^6
10^5
10^4
10^3
0

图116

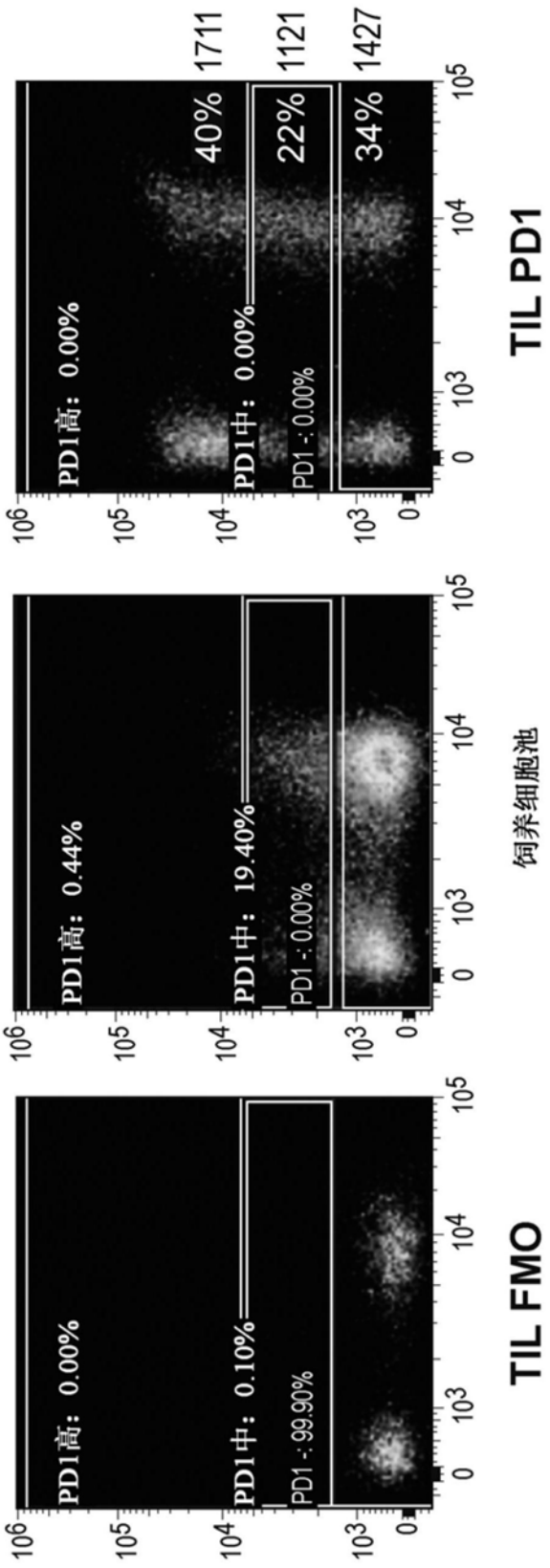

TIL FMO
饲养细胞池
TIL PD1
PD1高：0.00%
PD1中：0.10%
PD1 -：99.90%
PD1高：0.44%
PD1中：19.40%
PD1 -：0.00%
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1 -：0.00%
40%
22%
34%
1711
1121
1427

图117

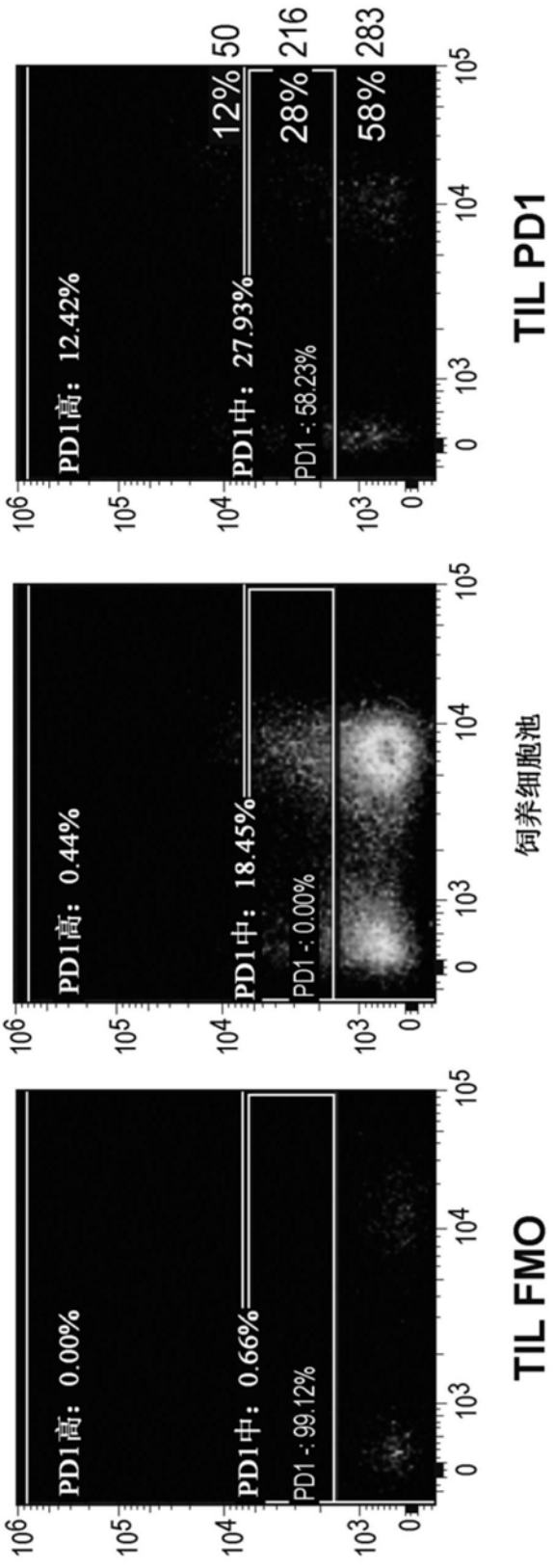

TIL PD1
TIL FMO
饲养细胞池
PD1高：12.42%
PD1中：27.93%
PD1-：58.23%
12%
28%
58%
50
216
283
PD1高：0.44%
PD1中：18.45%
PD1-：0.00%
PD1高：0.00%
PD1中：0.66%
PD1-：99.12%
10^6
10^5
10^4
10^3
0

图118

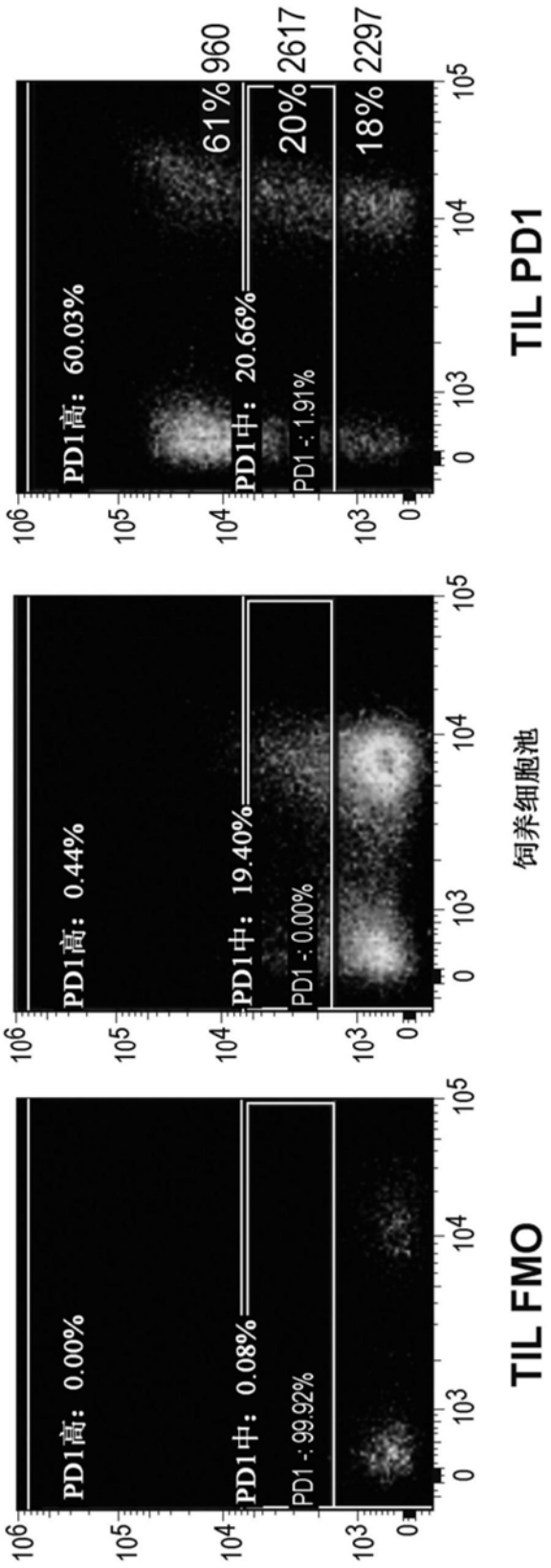

TIL FMO
饲养细胞池
TIL PD1
PD1高：0.00%
PD1中：0.08%
PD1 -：99.92%
PD1高：0.44%
PD1中：19.40%
PD1 -：0.00%
PD1高：60.03%
PD1中：20.66%
PD1 -：1.91%
61%
960
20%
2617
18%
2297

图119

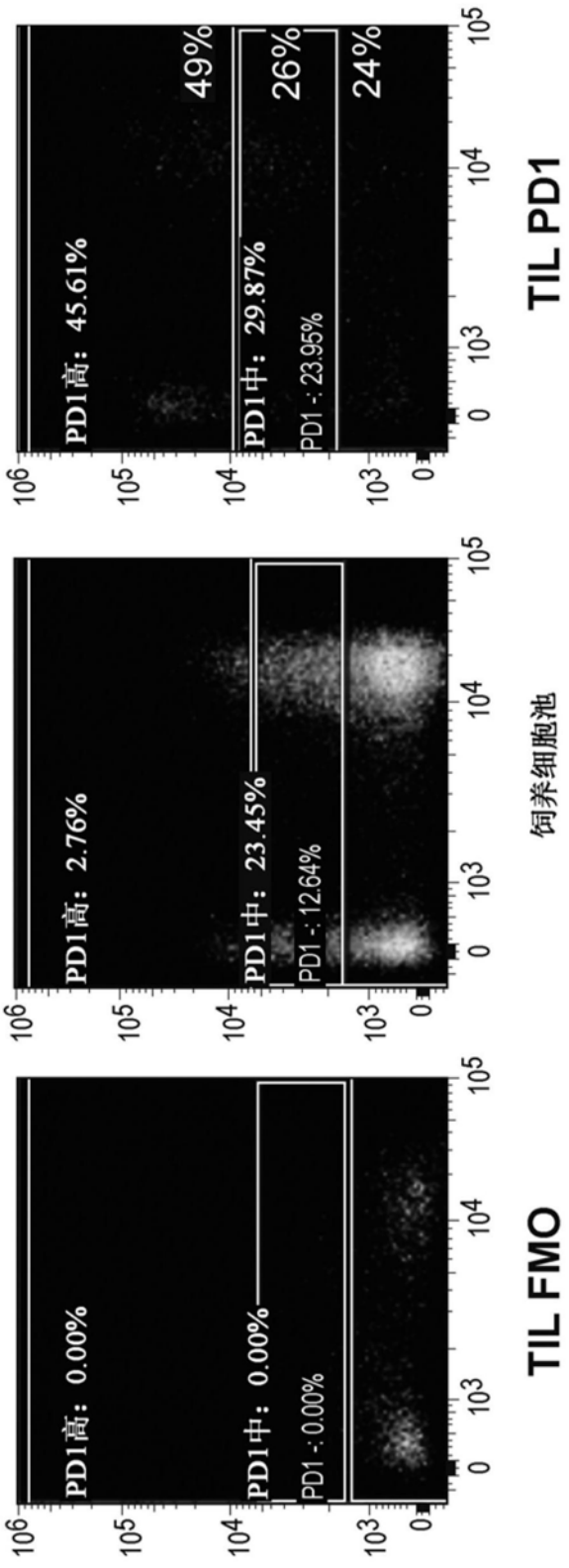

TIL PD1
PD1高：45.61%
PD1中：29.87%
PD1 -：23.95%
49%
26%
24%
饲养细胞池
PD1高：2.76%
PD1中：23.45%
PD1 -：12.64%
TIL FMO
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1 -：0.00%

图120

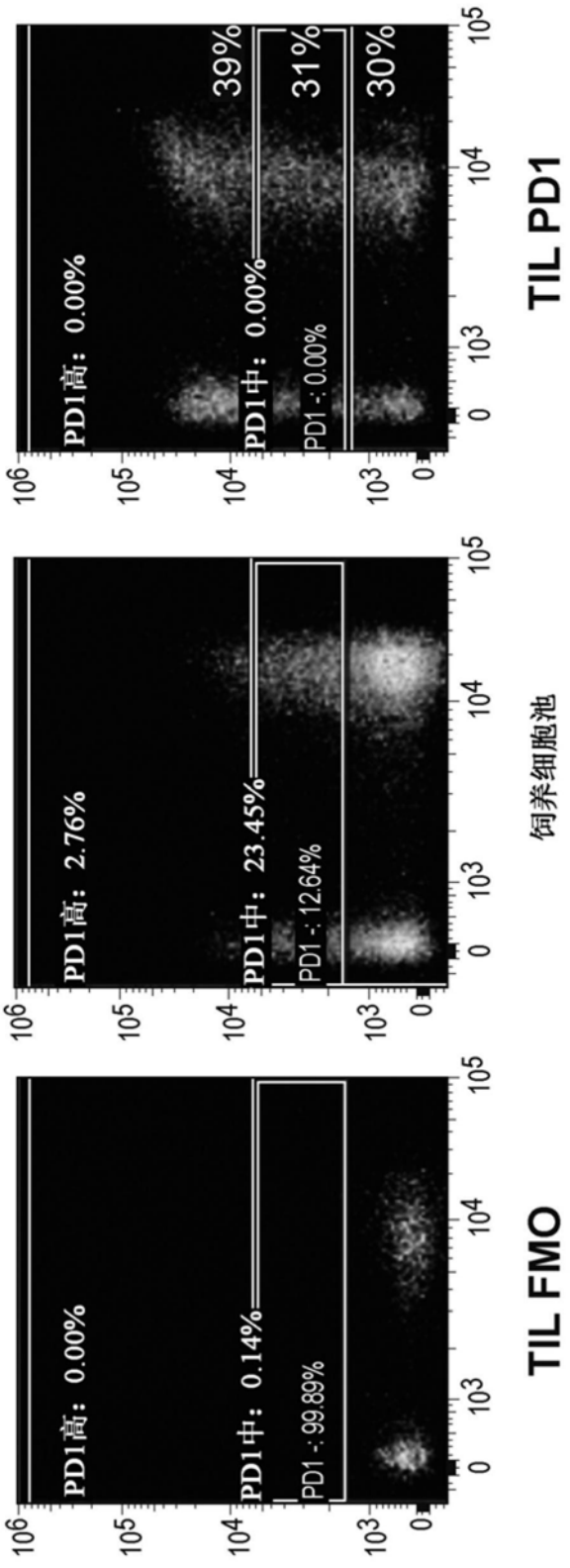

TIL PD1
饲养细胞池
TIL FMO
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1 -：0.00%
39%
31%
30%
PD1高：2.76%
PD1中：23.45%
PD1 -：12.64%
PD1高：0.00%
PD1中：0.14%
PD1 -：99.89%
10^6
10^5
10^4
10^3
0
10^5
10^4
10^3
0

图121

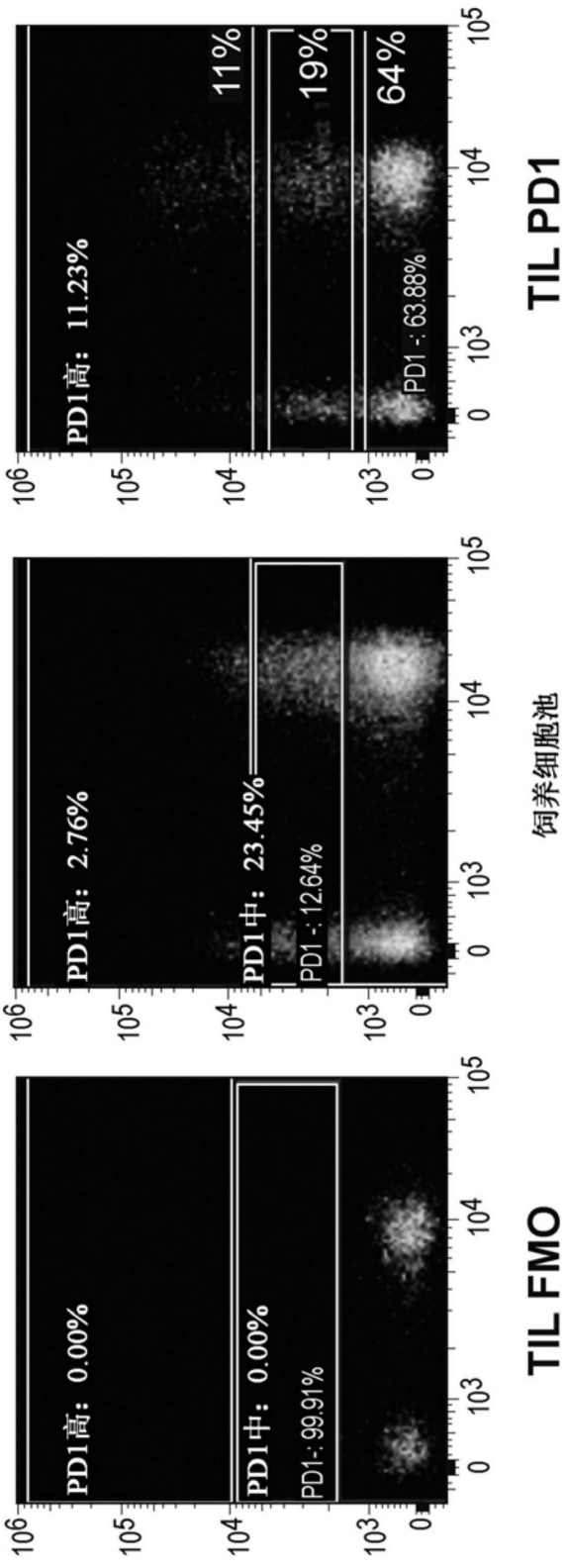

TIL FMO
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-: 99.91%
饲养细胞池
PD1高：2.76%
PD1中：23.45%
PD1 -: 12.64%
TIL PD1
PD1高：11.23%
11%
19%
64%
PD1 -: 63.88%

图122

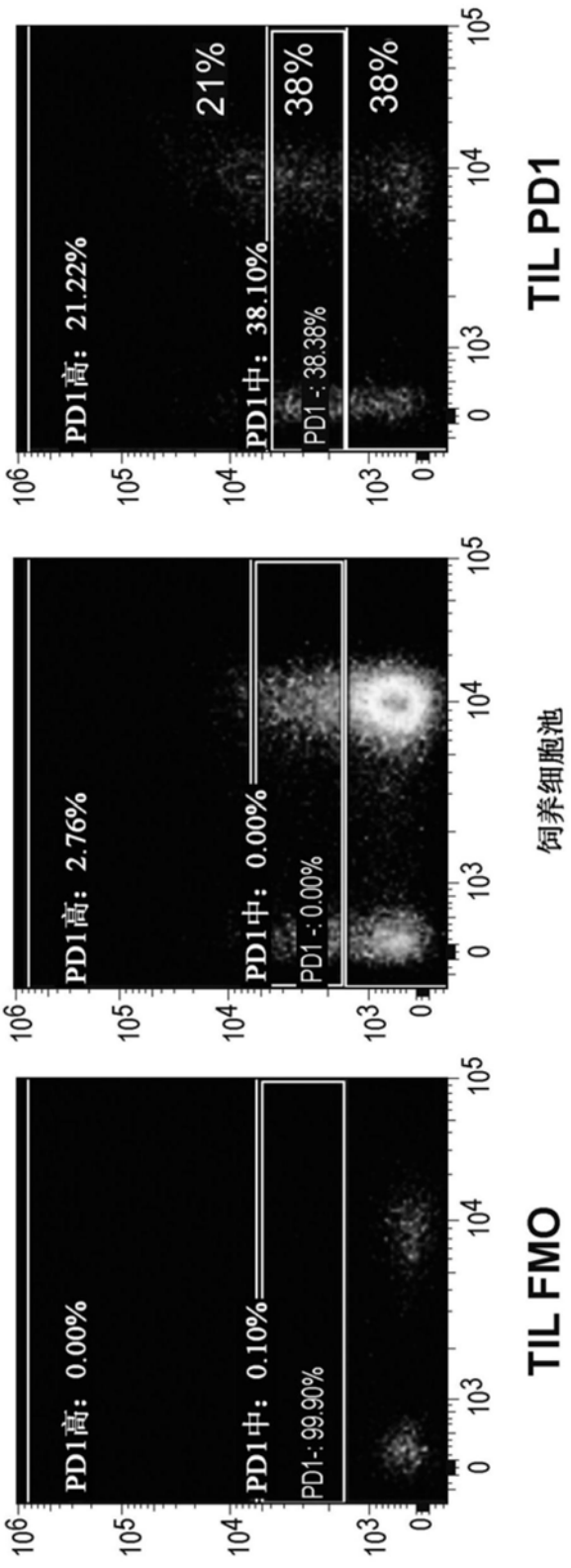

TIL PD1
PD1高：21.22%
PD1中：38.10%
PD1-：38.38%
21%
38%
38%
饲养细胞池
PD1高：2.76%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
TIL FMO
PD1高：0.00%
PD1中：0.10%
PD1-：99.90%

图123

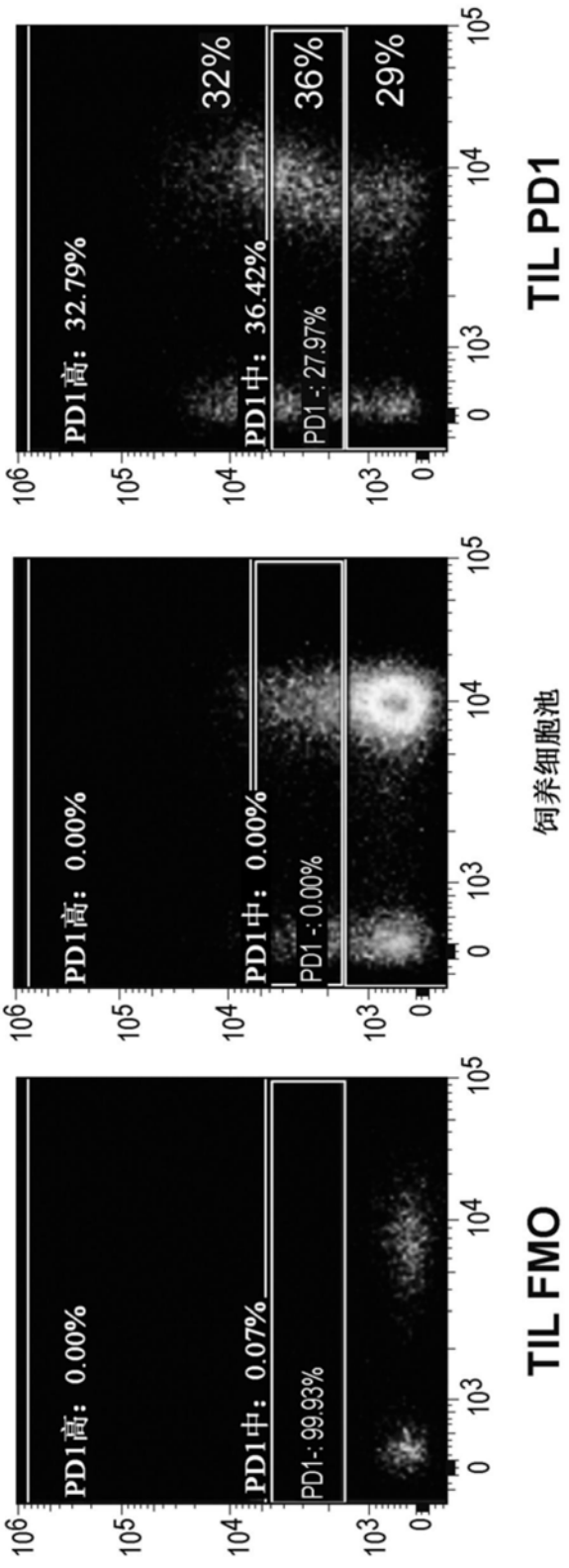

TIL PD1
饲养细胞池
TIL FMO
PD1高：32.79%
PD1中：36.42%
PD1-：27.97%
32%
36%
29%
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
PD1高：0.00%
PD1中：0.07%
PD1-：99.93%
10^6
10^5
10^4
10^3
0
10^5
10^4
10^3
0

图124

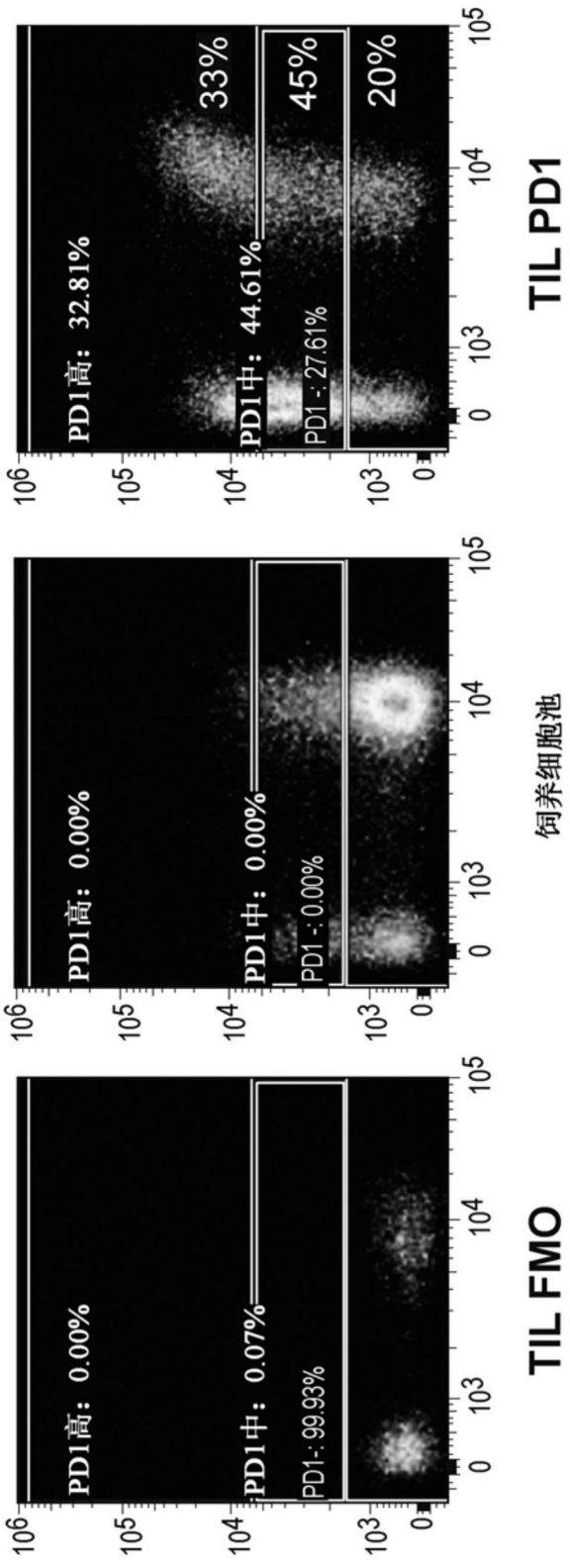

TIL PD1
PD1高：32.81%
PD1中：44.61%
PD1-：27.61%
33%
45%
20%
饲养细胞池
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
TIL FMO
PD1高：0.00%
PD1中：0.07%
PD1-：99.93%
10^6
10^5
10^4
10^3
0
10^3
10^4
10^5

图125

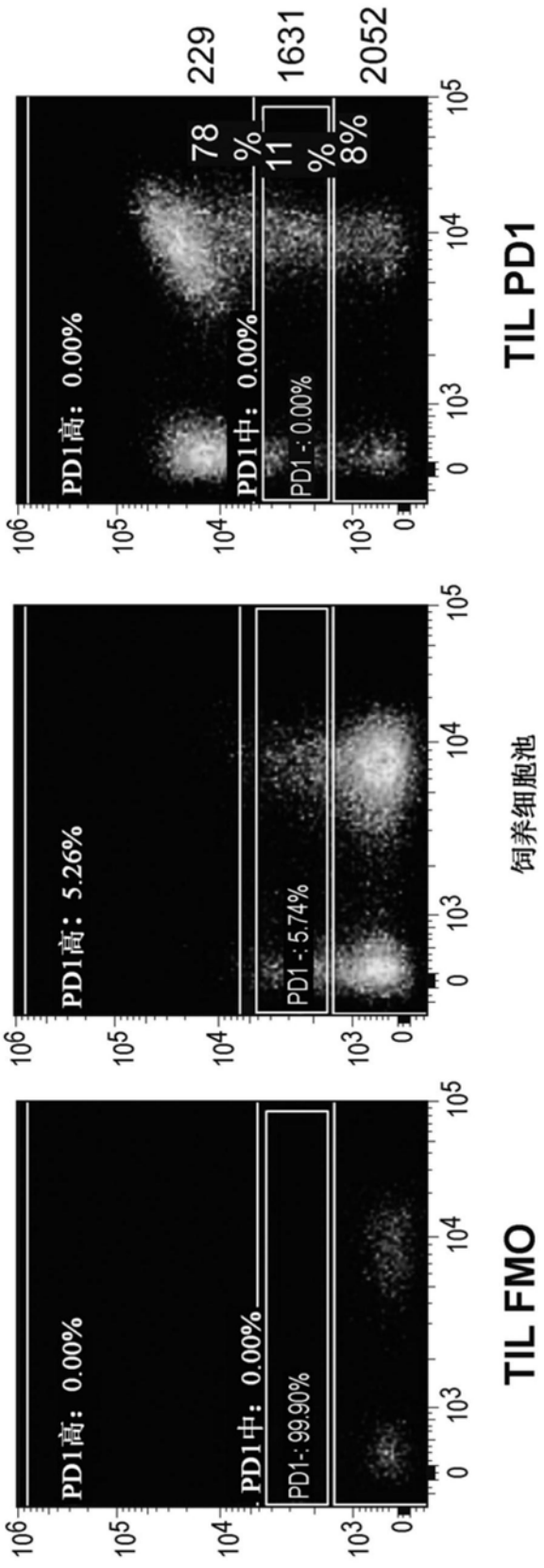

TIL FMO
饲养细胞池
TIL PD1
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：99.90%
PD1高：5.26%
PD1-：5.74%
PD1高：0.00%
PD1中：0.00%
PD1-：0.00%
78 %
11 %
8%
229
1631
2052

图126

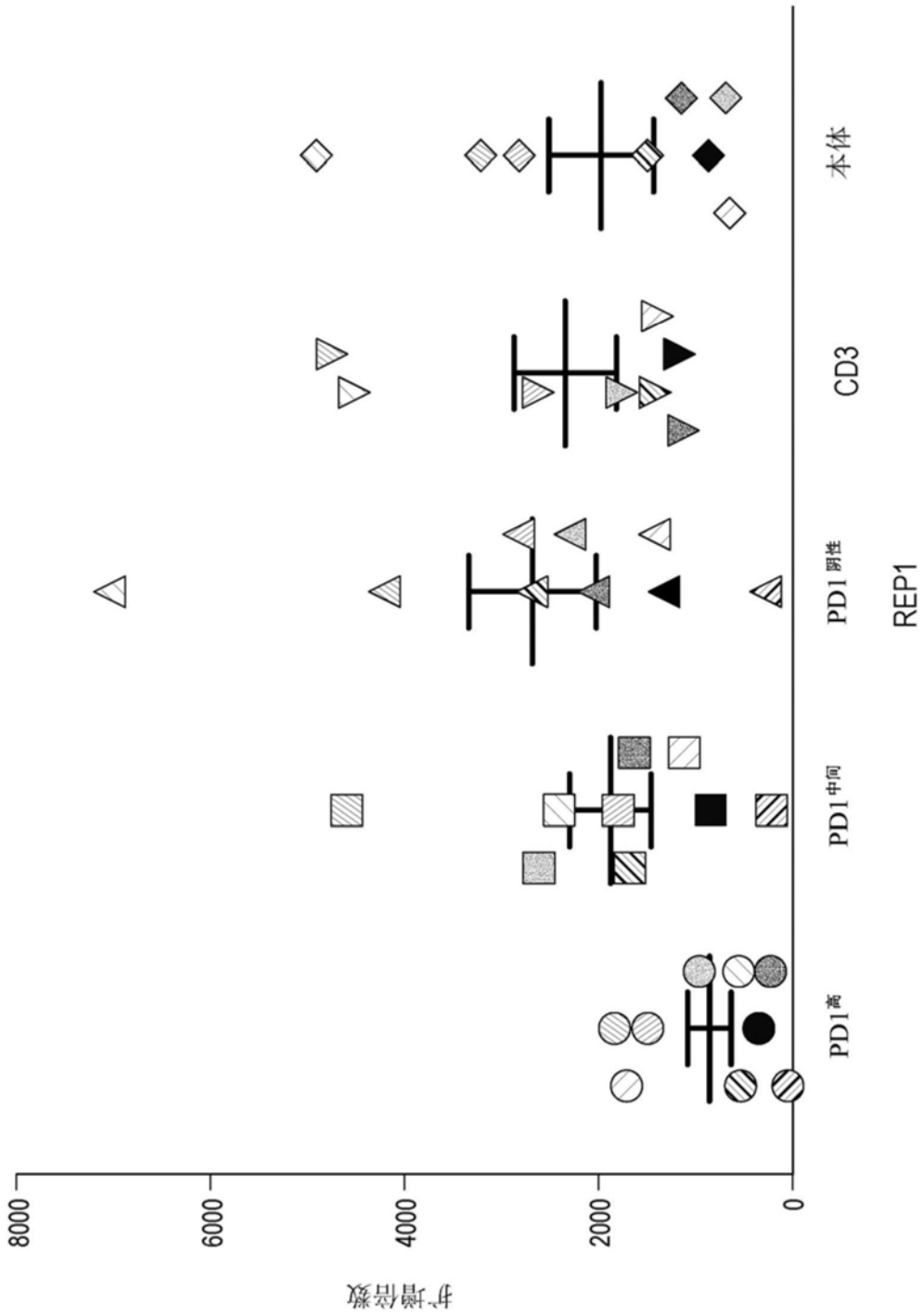
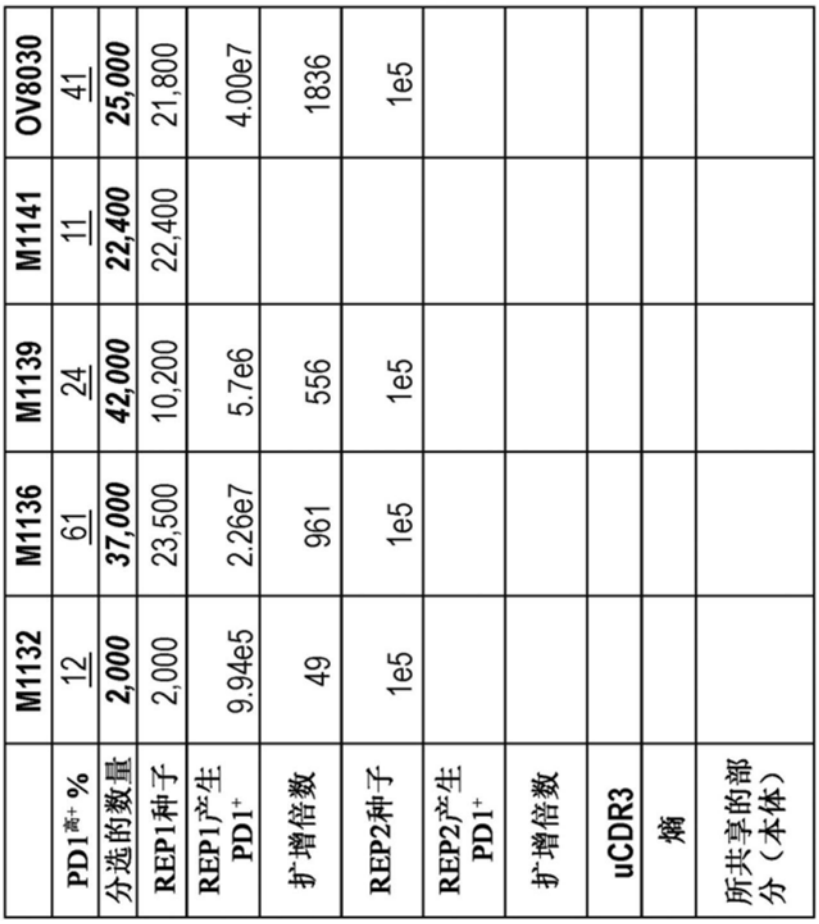


图127

	L4096	L4097	L4089	L4100	L4101	L4104	L4106	H3035	H3037	H3038
PD1$^{高+}$ %	20%	78%	31%	43%	32%	40%	39%	28%	49%	32%
分选的数量	***10,700***	***62,500***	***20,303***	***46,000***	***99,000***	***70,000***	***20,600***	***25,000***	***25,000***	***3,000***
REP1种子	8,000	47,000	8,184	33,000	99,000	70,000	18,200	11,000	11,300	3,000
REP1产生 PD1^{+}		1.08e7	1.22e7	1.77e7	99,000	1.2e8		3.85e6	丢弃	
扩增倍数		229	1,493	536		1711		350		
REP2种子		1e5	1e5	1e5		1e5		1e5		
REP2产生 PD1^{+}										
扩增倍数										
uCDR3										
熵										
所共享的部分（本体）										

图128



	M1132	M1136	M1139	M1141	OV8030
PD1$^{高+}$ %	12	61	24	11	41
分选的数量	***2,000***	***37,000***	***42,000***	***22,400***	***25,000***
REP1种子	2,000	23,500	10,200	22,400	21,800
REP1产生 PD1^{+}	9.94e5	2.26e7	5.7e6		4.00e7
扩增倍数	49	961	556		1836
REP2种子	1e5	1e5	1e5		1e5
REP2产生 PD1^{+}					
扩增倍数					
uCDR3					
熵					
所共享的部分（本体）					

图129

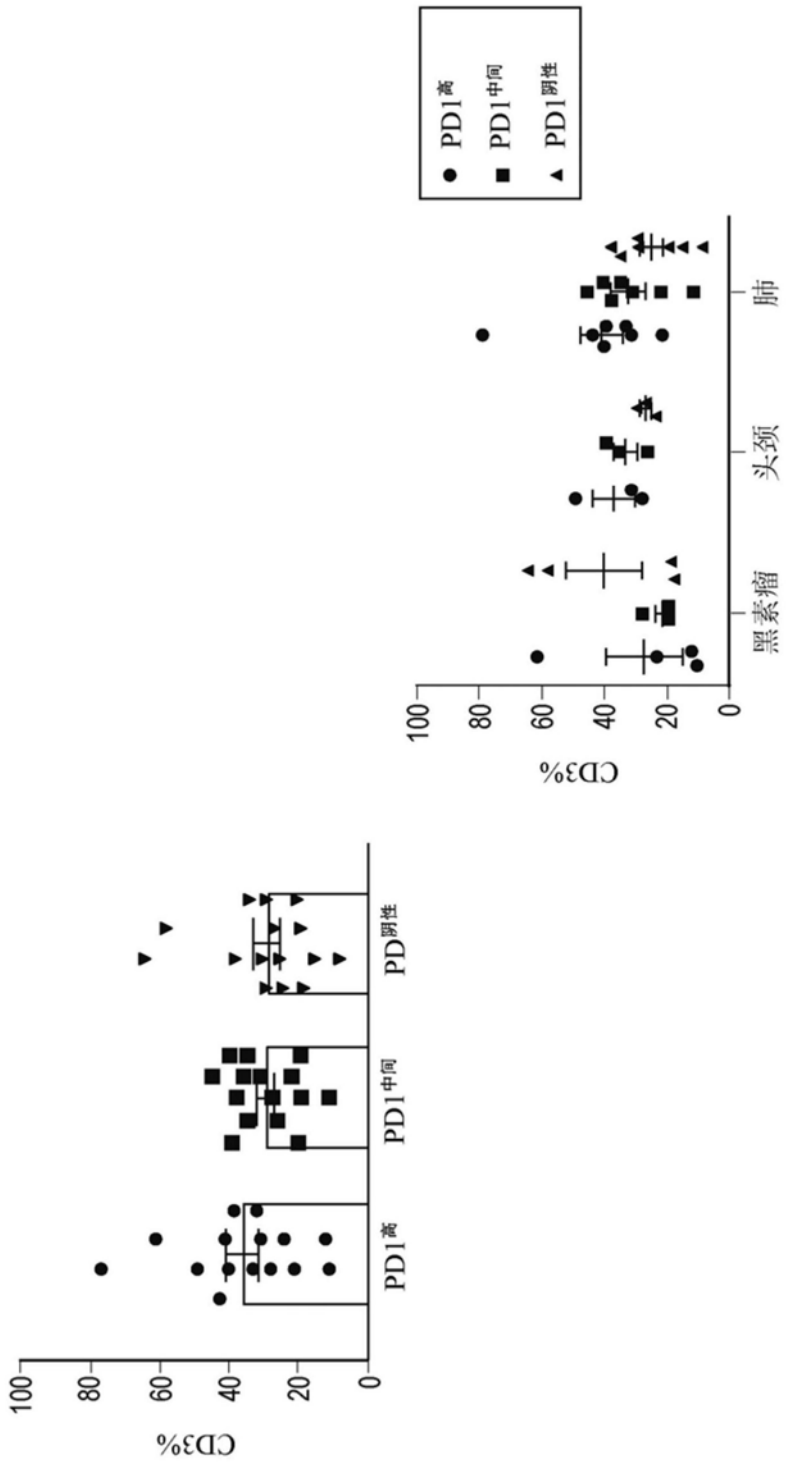


图130

第0天
•在温和MACS OctoDissociator上消化经碎裂的肿瘤持续1小时
•从全肿瘤消化物中留出细胞用于未经选择的TIL对照
•冷冻全肿瘤消化物的一部分以进行肿瘤反应性/杀伤测定
•对细胞进行染色以得到PD1、CD3和活/死状态
•使用FX500仪器（索尼，美国），分选PD1高、PD1中间和PD1阴性
•在G-Rex 10中启动分选的细胞和未经选择的TIL的培养物以进行REP1（用OKT 3+饲养细胞培养11天）
第11天
•体积减少板/烧瓶、计数和采集
•在G-Rex 10中启动REP1产物（PD1高、PD1中间和PD1阴性以及未经选择的TIL）的培养物以进行REP2（11天）
•冷冻剩余的细胞
第16天
•体积减少培养基
•用新鲜培养基（CM2或CM3）补充培养物
第22天
•体积减少培养基、细胞计数和采集最终产物
•对所采集的REP2产物运行以下测定
•细胞计数，活力
•表型（TIL1、TIL2、TIL3）
•CD107a
•IFNγ（再刺激测定）
•TCRvβ（通过流式细胞术）
•TCRvβ（冷冻1e6以通过iRepetoire进行RNA测序）
•肿瘤反应性（IFNγ分泌和细胞杀伤测定（X-Celligence系统））

图131

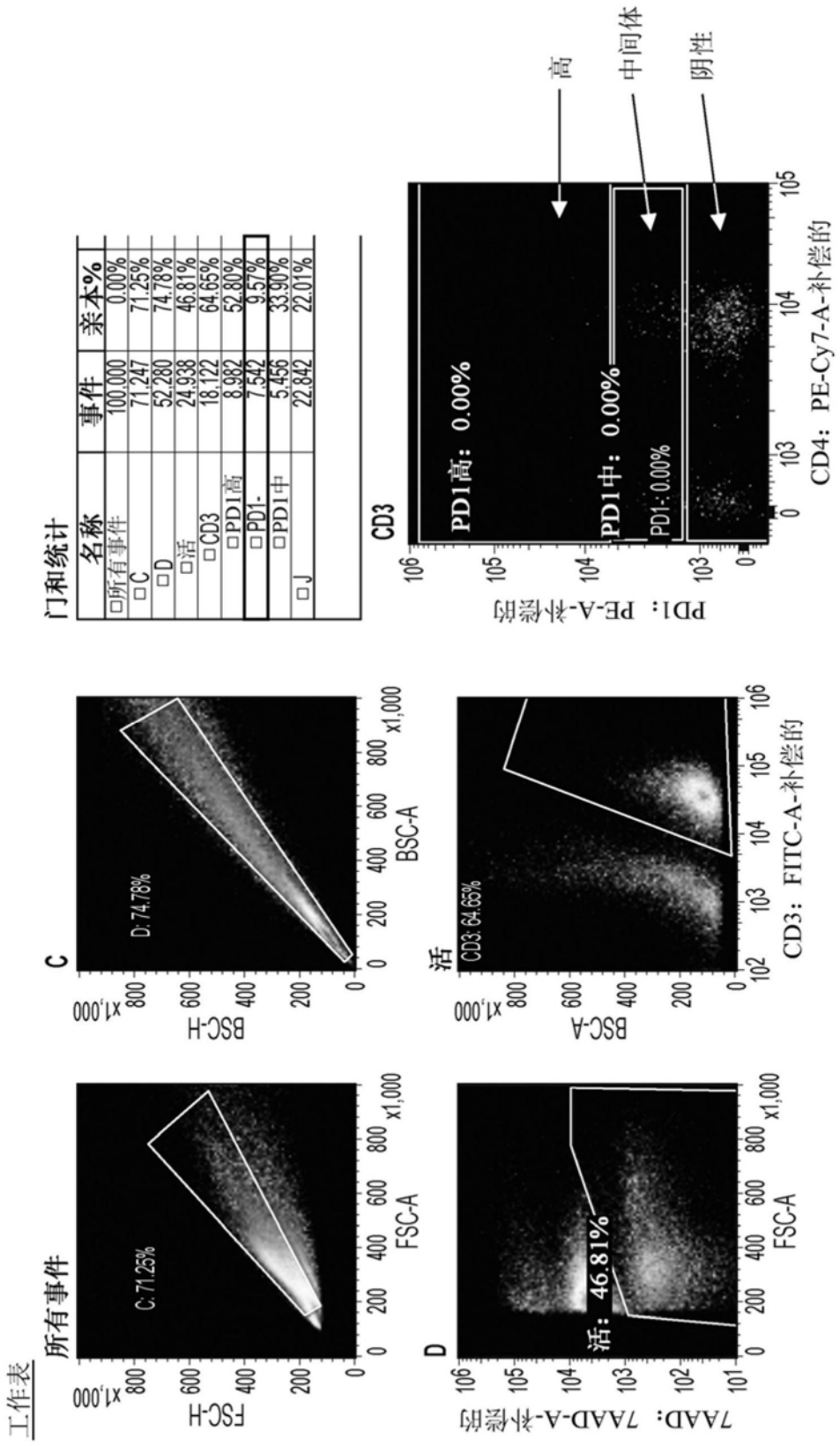

工作表
所有事件
C: 71.25%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 74.78%
BSC-H
BSC-A
D
活: 46.81%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 64.65%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
门和统计
名称 事件 亲本%
所有事件 100,000 0.00%
C 71,247 71.25%
D 52,280 74.78%
活 24,938 46.81%
CD3 18,122 64.65%
PD1高 8,982 52.80%
PD1- 7,542 9.57%
PD1中 5,456 33.90%
J 22,842 22.01%
CD3
PD1高: 0.00%
PD1中: 0.00%
PD1-: 0.00%
高
中间体
阴性
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图132

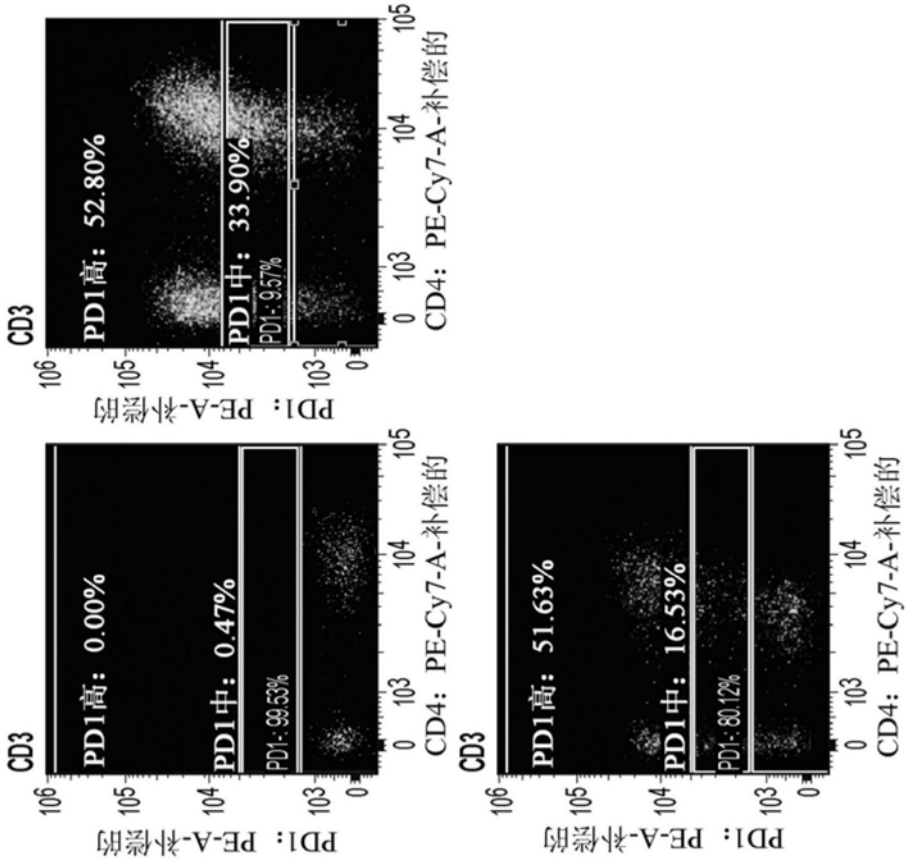
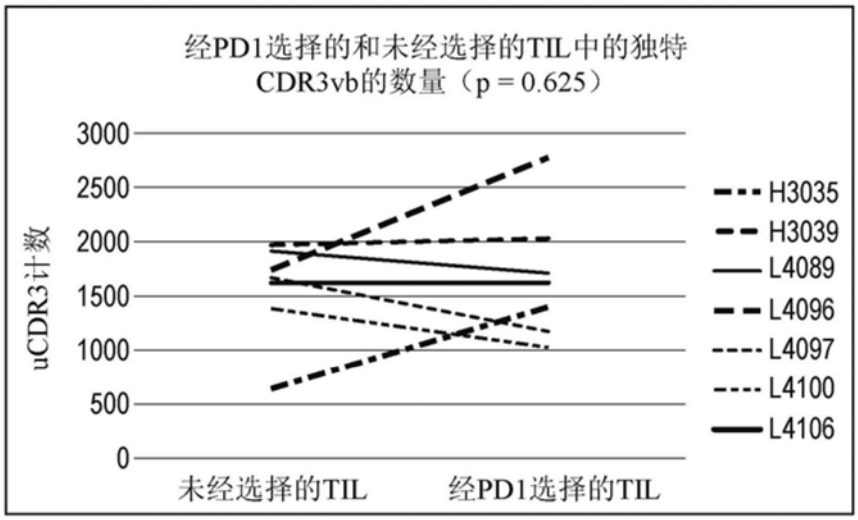

CD3
PD1高：52.80%
PD1中：33.90%
PD1-：9.57%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
CD3
PD1高：0.00%
PD1中：0.47%
PD1-：99.53%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
CD3
PD1高：51.63%
PD1中：16.53%
PD1-：80.12%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的

图133

A.


经PD1选择的和未经选择的TIL中的独特
CDR3vb的数量（p = 0.625）
uCDR3计数
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
未经选择的TIL
经PD1选择的TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106

B.

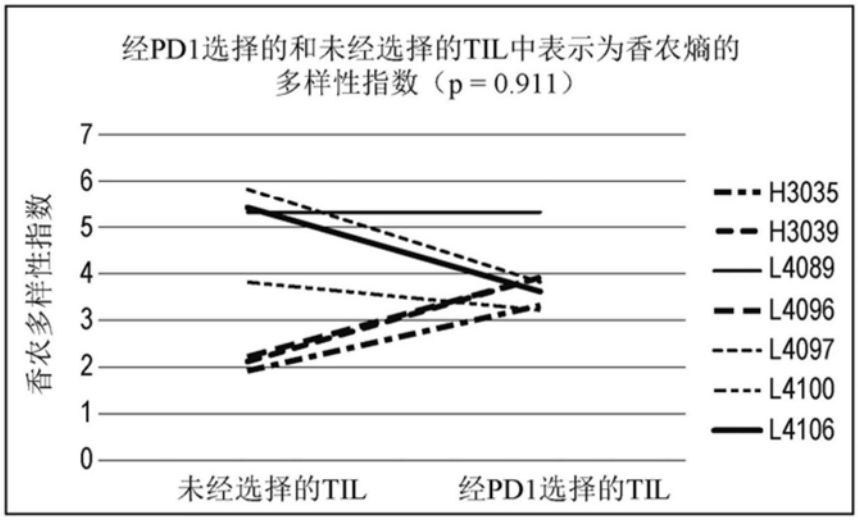

经PD1选择的和未经选择的TIL中表示为香农熵的
多样性指数（p = 0.911）
香农多样性指数
7
6
5
4
3
2
1
0
未经选择的TIL
经PD1选择的TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106

图134

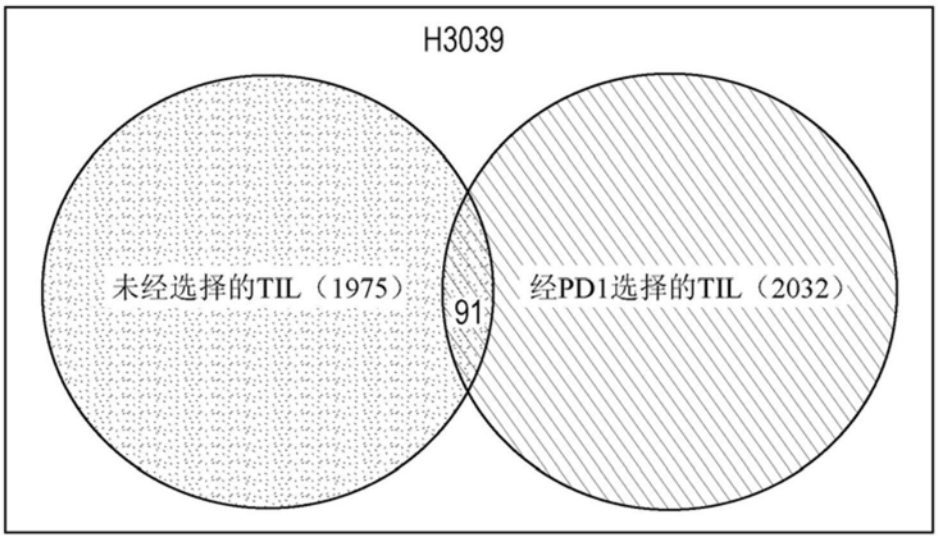


图135A

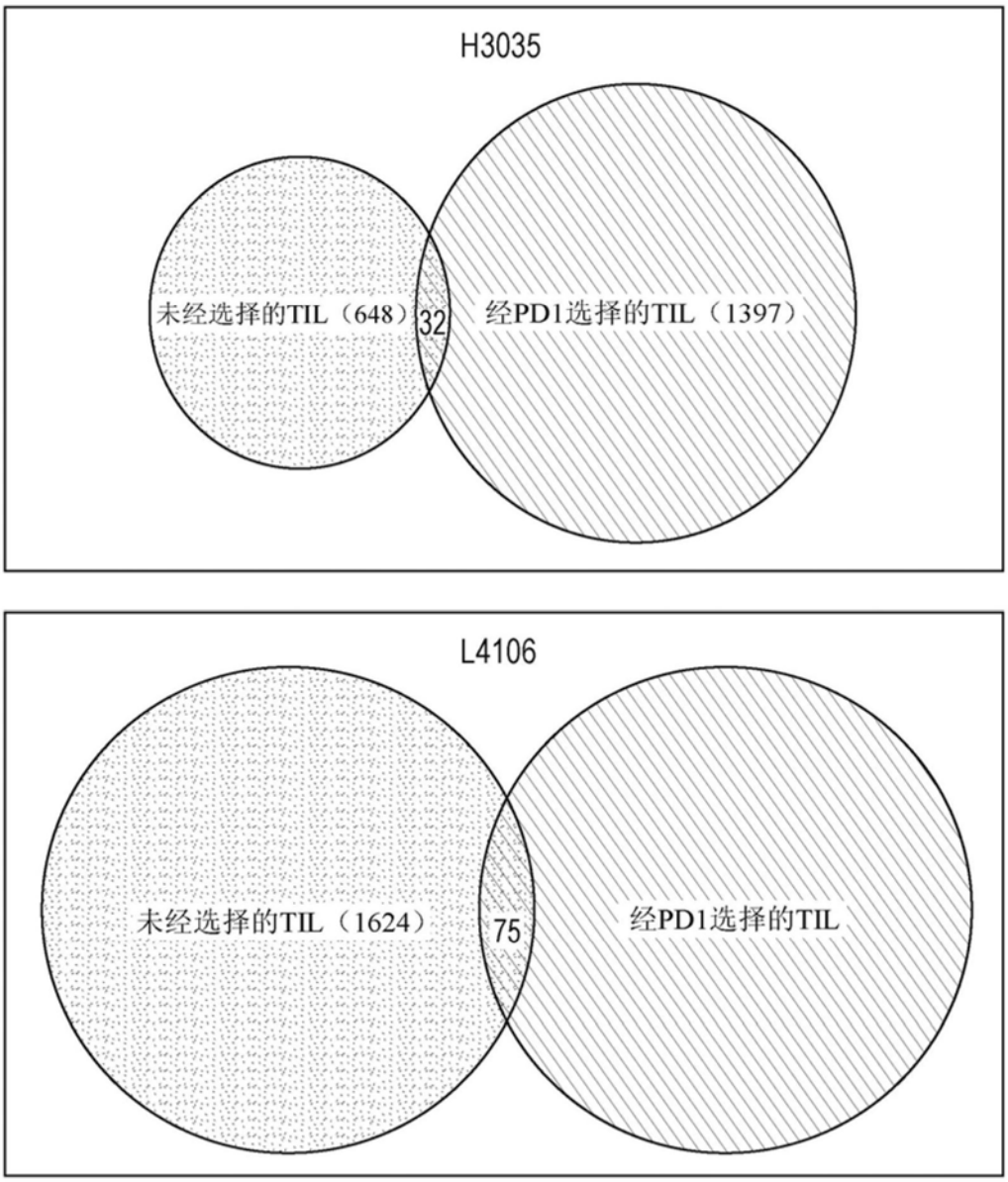

H3035
未经选择的TIL（648）
32
经PD1选择的TIL（1397）
L4106
未经选择的TIL（1624）
75
经PD1选择的TIL

图135B

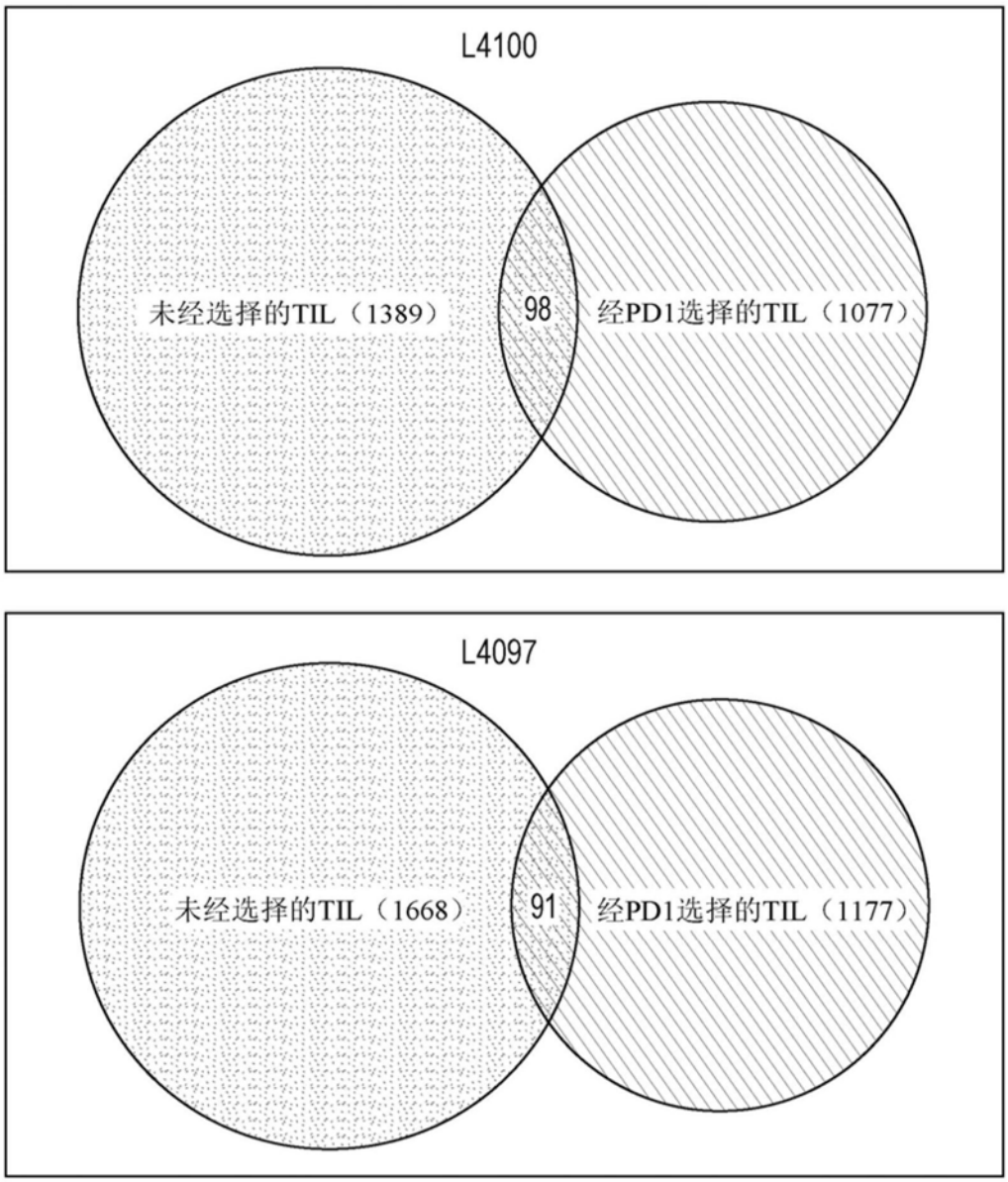

L4100
未经选择的TIL（1389）
98
经PD1选择的TIL（1077）
L4097
未经选择的TIL（1668）
91
经PD1选择的TIL（1177）

图135C

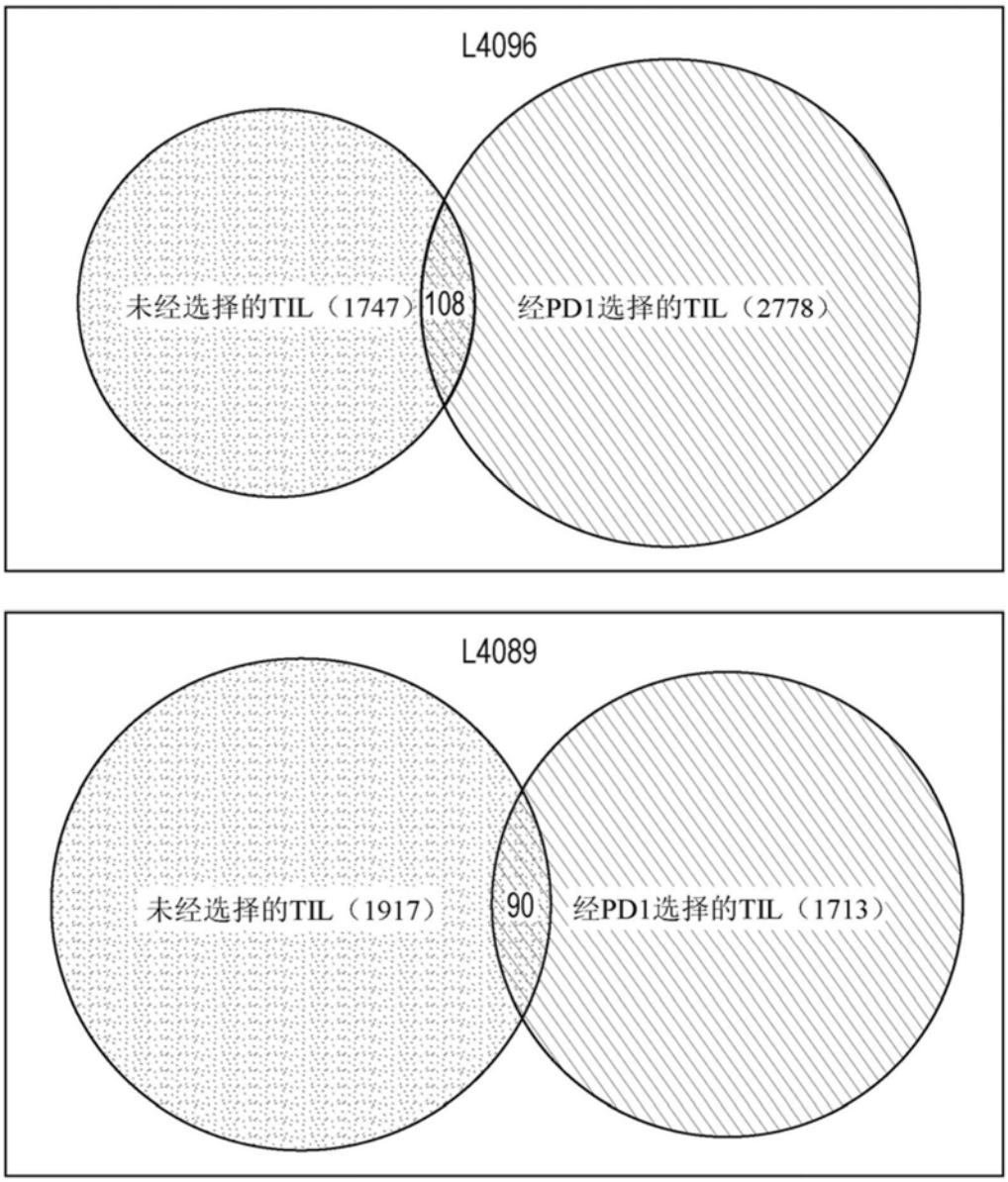

L4096
未经选择的TIL（1747）
108
经PD1选择的TIL（2778）
L4089
未经选择的TIL（1917）
90
经PD1选择的TIL（1713）

图135D

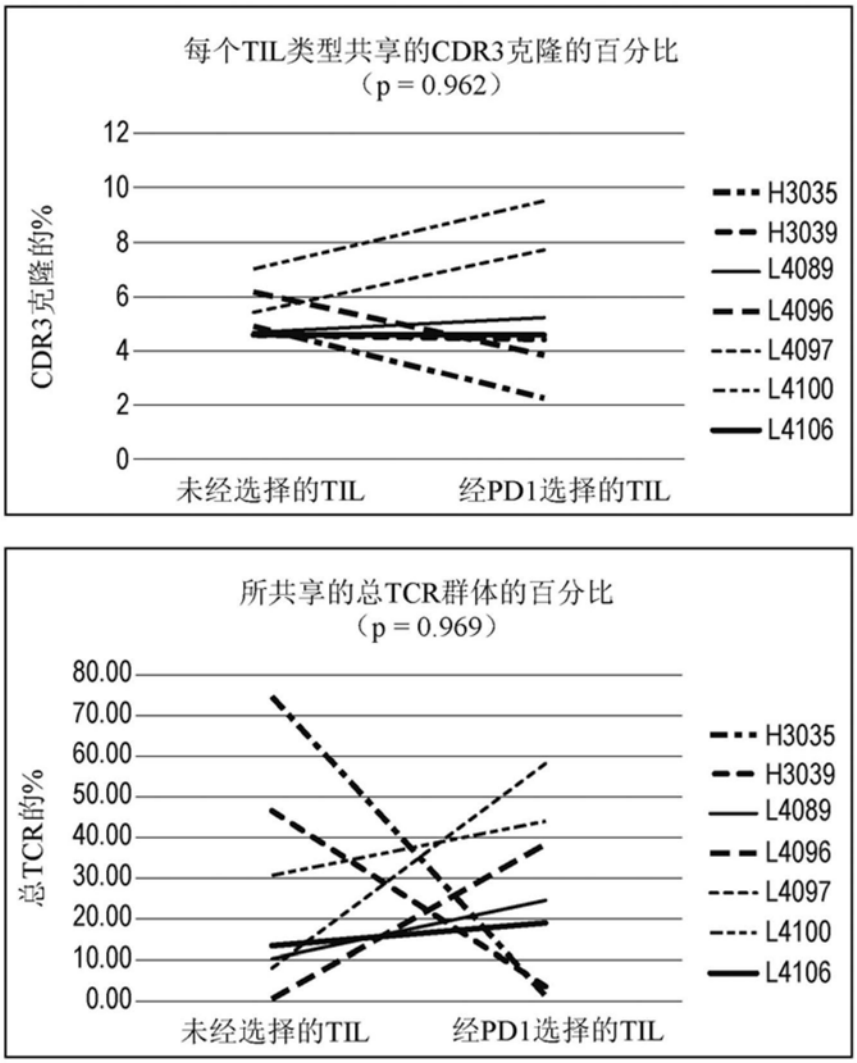

每个TIL类型共享的CDR3克隆的百分比
（p = 0.962）
CDR3克隆的%
12
10
8
6
4
2
0
未经选择的TIL
经PD1选择的TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106
所共享的总TCR群体的百分比
（p = 0.969）
总TCR的%
80.00
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
未经选择的TIL
经PD1选择的TIL
H3035
H3039
L4089
L4096
L4097
L4100
L4106

图135E

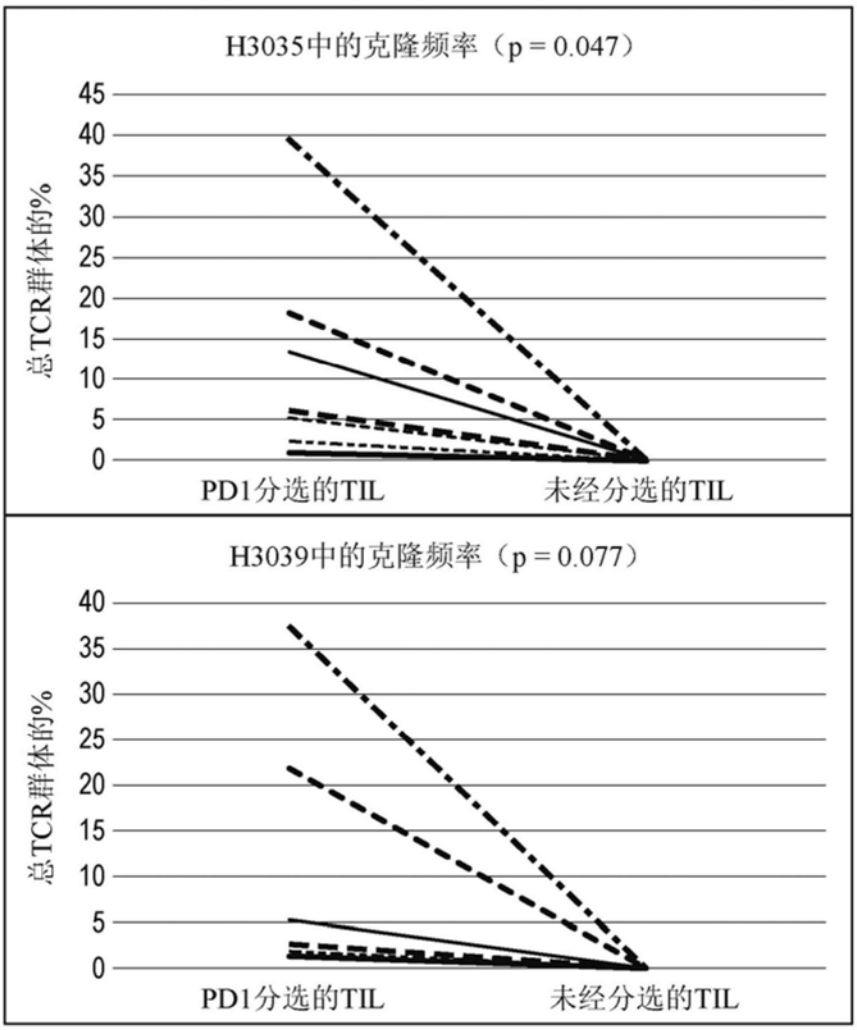

H3035中的克隆频率（p = 0.047）
总TCR群体的%
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL
H3039中的克隆频率（p = 0.077）
总TCR群体的%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL

图136A

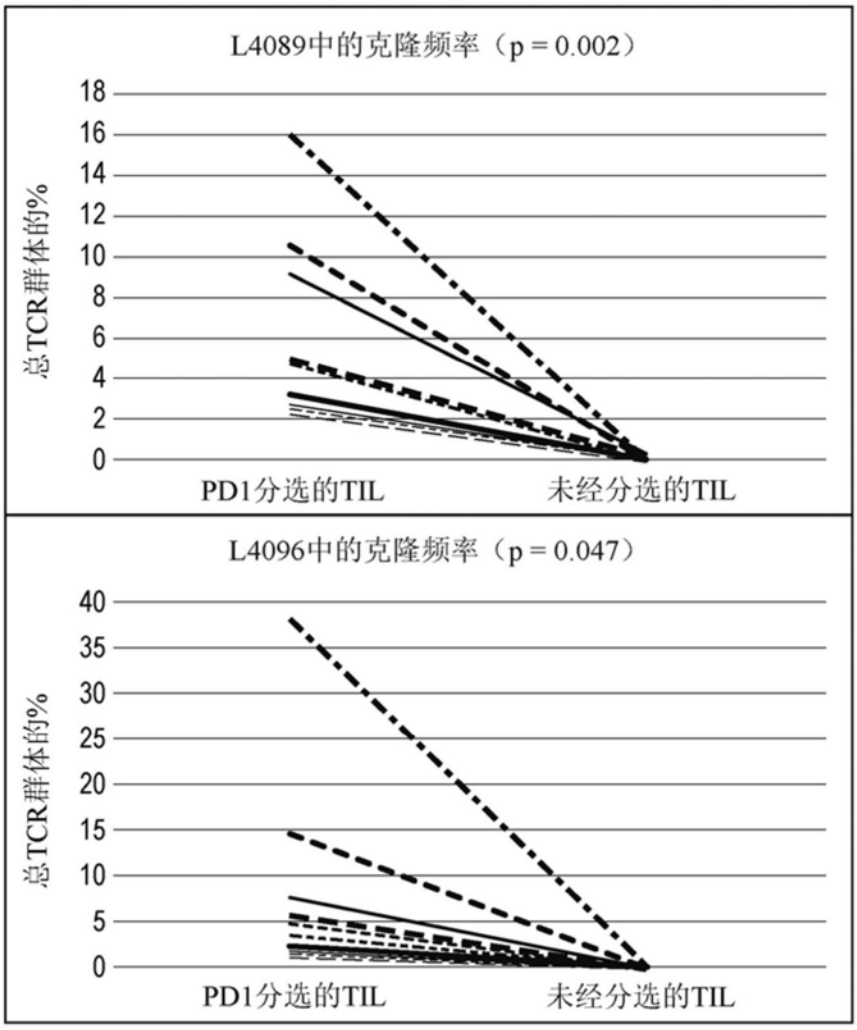

L4089中的克隆频率（p = 0.002）
总TCR群体的%
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL
L4096中的克隆频率（p = 0.047）
总TCR群体的%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL

图136B

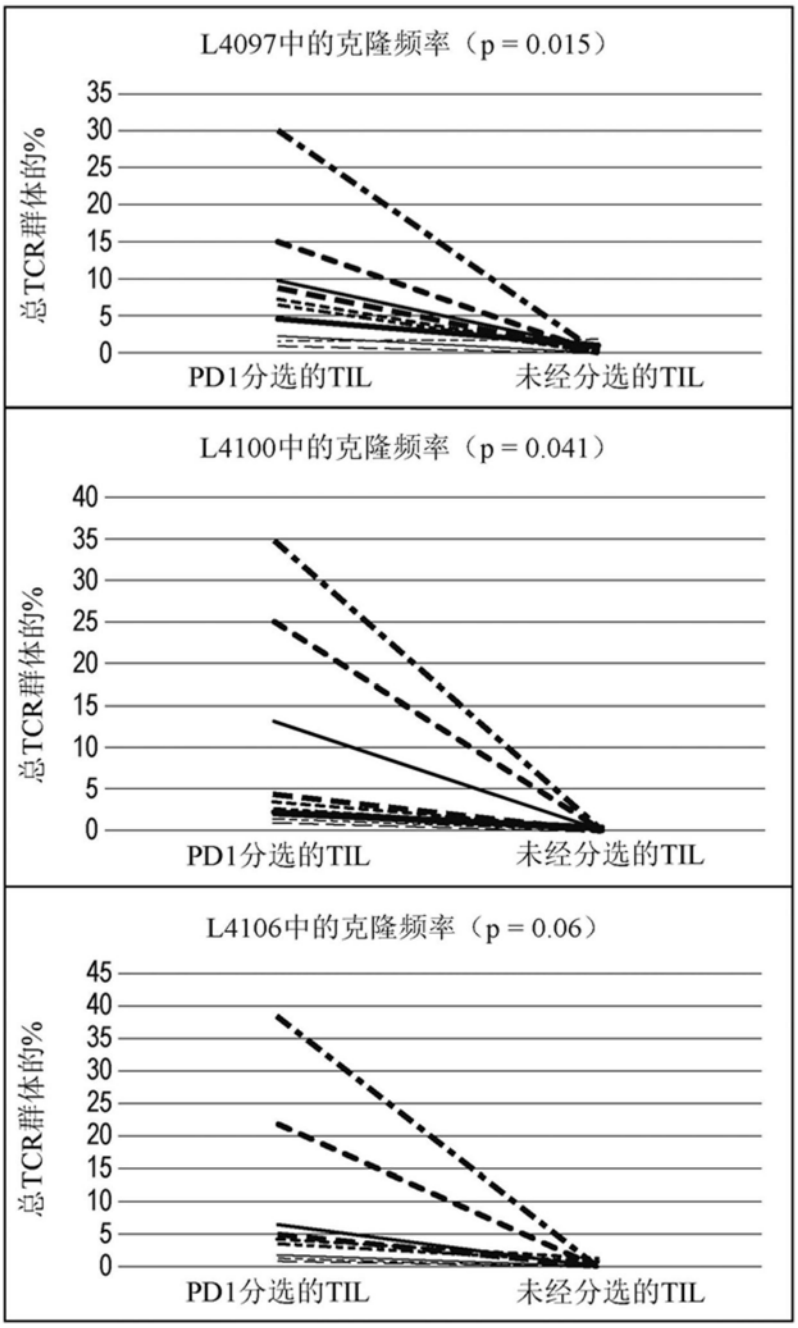

L4097中的克隆频率（p = 0.015）
总TCR群体的%
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL
L4100中的克隆频率（p = 0.041）
总TCR群体的%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL
L4106中的克隆频率（p = 0.06）
总TCR群体的%
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
PD1分选的TIL
未经分选的TIL

图136C

肿瘤	组织学	经PD1选择的TIL产生的
H3035	HNSCC	是
H3036	HNSCC	否，培养物污染
H3037	HNSCC	否，培养物污染
H3038	HNSCC	是
H3039	HNSCC	是
L4089	NSCLC	是
L4096	NSCLC	是
L4097	NSCLC	是
L4100	NSCLC	是
L4101	NSCLC	是
L4104	NSCLC	是
L4106	NSCLC	是
M1132	黑素瘤	是
M1136	黑素瘤	是
M1139	黑素瘤	是
M1141	黑素瘤	是
OV8030	卵巢	是
OV8042	卵巢	是
OV8042	卵巢	是
T6049	TNBC	是
T6056	TNBC	是
T6058	TNBC	是
T6060	TNBC	是
OC20019	前列腺	是
OC20030	前列腺	是
C10026	CRC	否，不良消化细胞产生
CC10027	CRC	否，不良消化细胞产生
CC10028	CRC	是
CC10029	CRC	是
CC10031	CRC	否，培养物污染
CC10034	CRC	是
CC10037	CRC	是
CC10039	CRC	是

图137

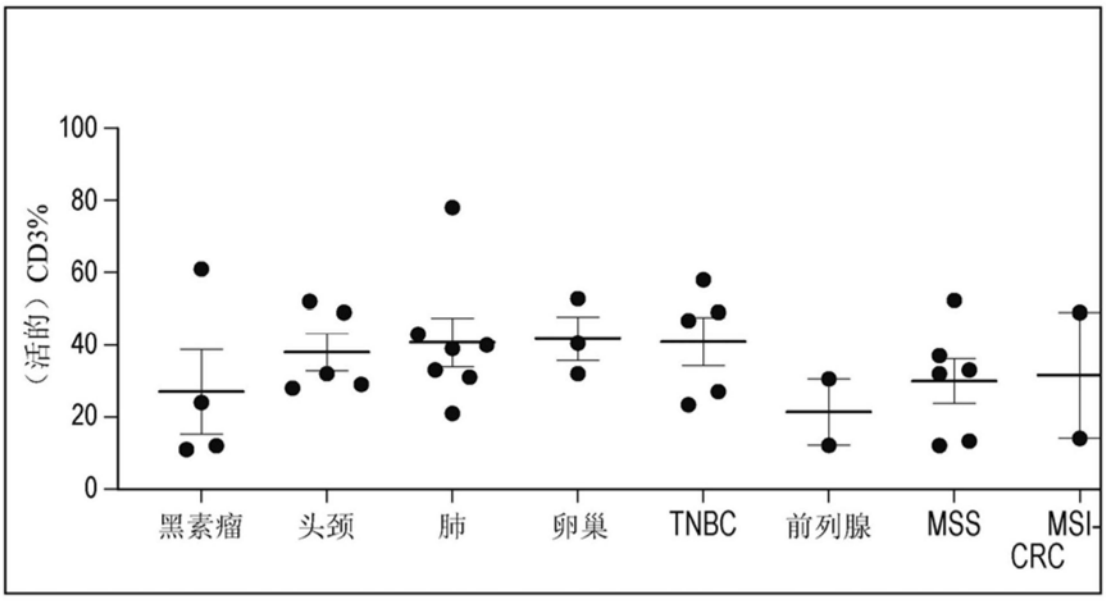
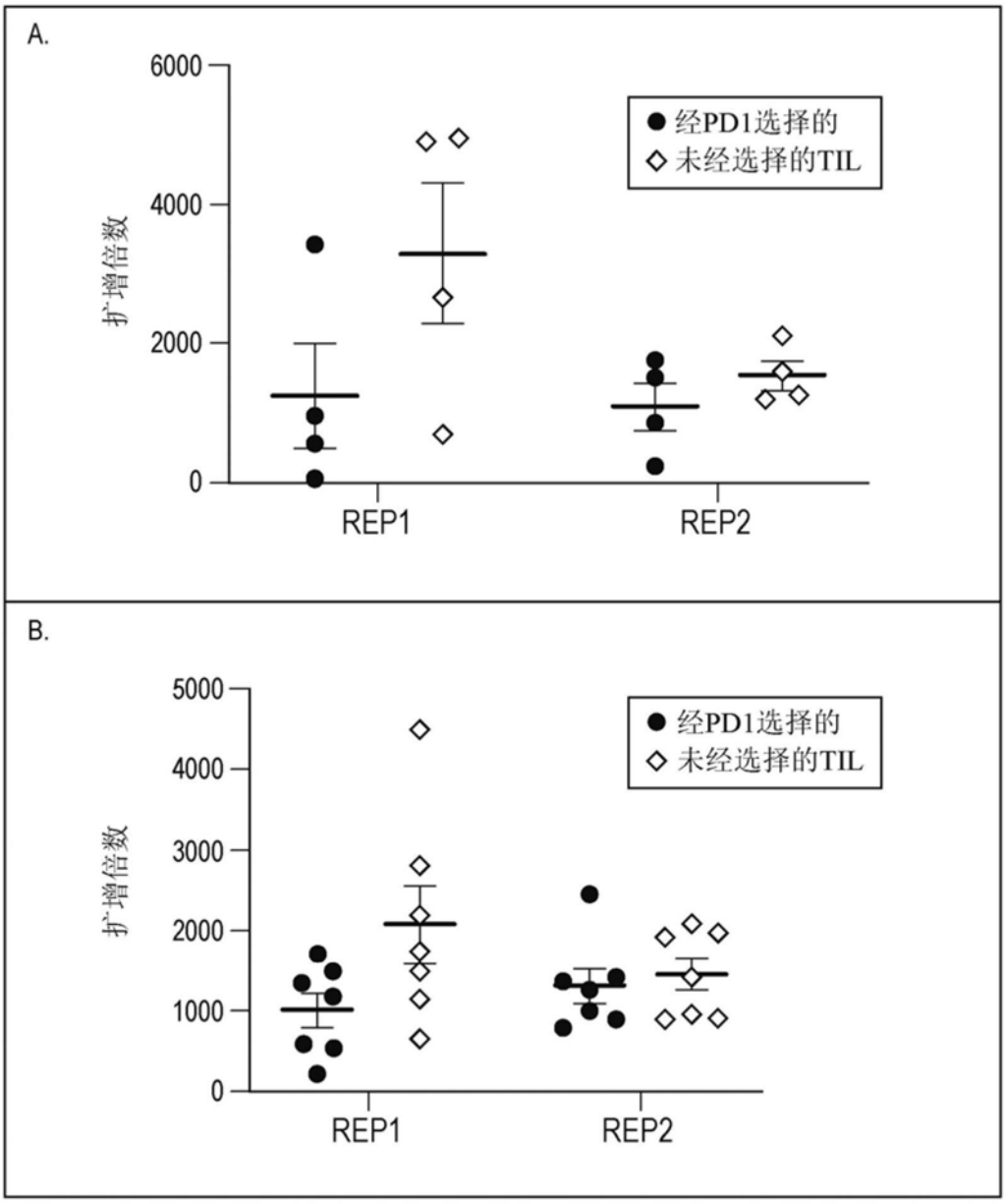


图138

肿瘤ID	样品ID	组织学	制备日期
H3035	经PD1选择的TIL	HNSCC	2019年3月15日
	未经选择的TIL		
H3039	经PD1选择的TIL	HNSCC	2019年4月9日
	未经选择的TIL		
L4089	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月22日
	未经选择的TIL		
L4096	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年4月4日
	未经选择的TIL		
L4097	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月22日
	未经选择的TIL		
L4100	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月26日
	未经选择的TIL		
L4101	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年4月4日
	未经选择的TIL		
L4104	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月26日
	未经选择的TIL		
L4106	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月29日
	未经选择的TIL		
M1132	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月26日
	未经选择的TIL		
M1136	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月26日
	未经选择的TIL		
M1139	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月22日
	未经选择的TIL		
M1141	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月29日
	未经选择的TIL		

图139


A.
6000
4000
2000
0
扩增倍数
经PD1选择的
未经选择的TIL
REP1
REP2
B.
5000
4000
3000
2000
1000
0
扩增倍数
经PD1选择的
未经选择的TIL
REP1
REP2

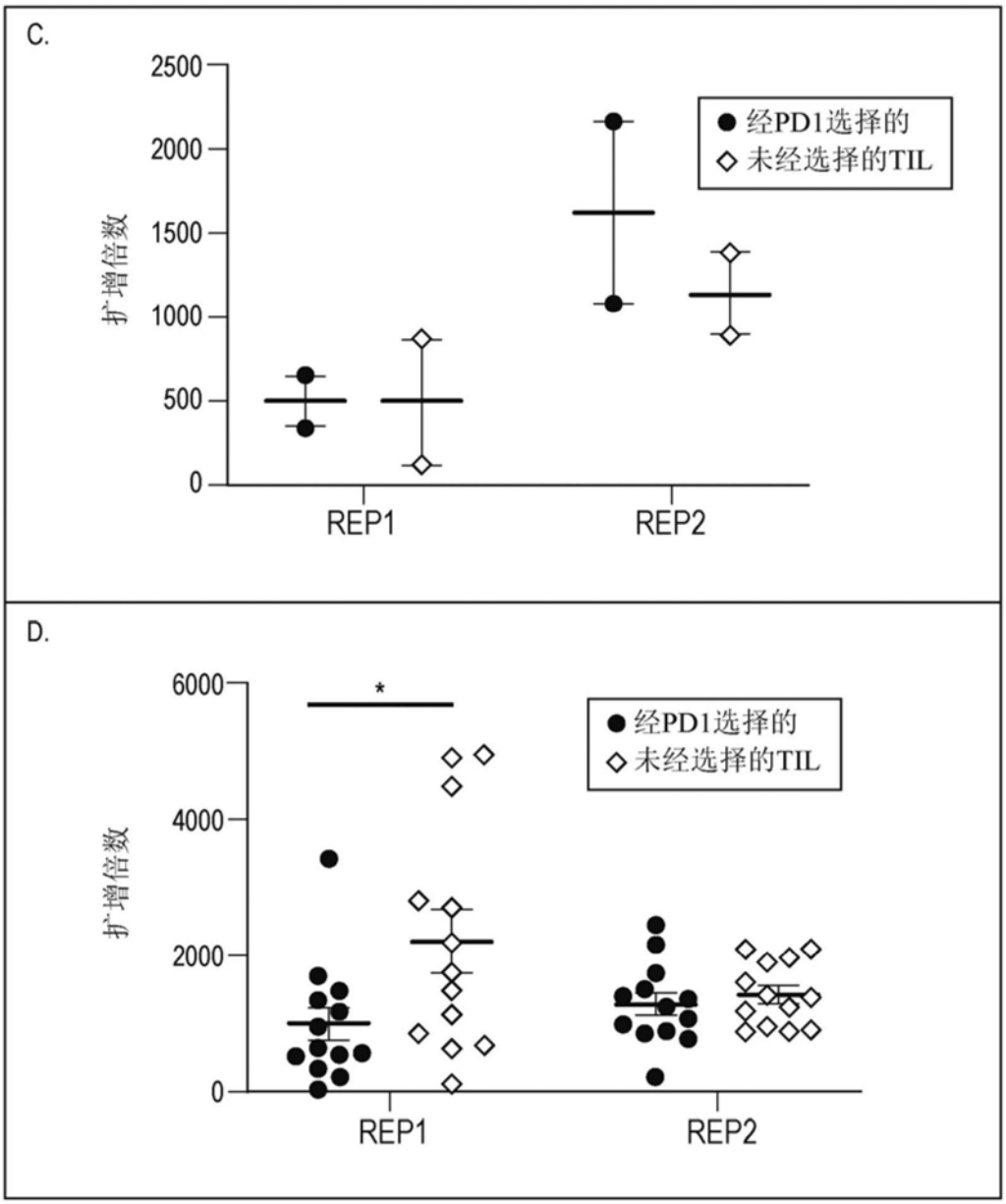

C.
2500
2000
1500
1000
500
0
扩增倍数
经PD1选择的
未经选择的TIL
REP1
REP2
D.
6000
4000
2000
0
扩增倍数
*
经PD1选择的
未经选择的TIL
REP1
REP2

图140

肿瘤ID	样品ID	组织学	REP1扩增倍数	REP2扩增倍数
H3035	经PD1选择的TIL	HNSCC	350	2166
	未经选择的TIL		869	1385
H3039	经PD1选择的TIL	HNSCC	654	1082
	未经选择的TIL		123	893
L4089	经PD1选择的TIL	NSCLC	1502	2106
	未经选择的TIL		2821	1416
L4096	经PD1选择的TIL	NSCLC	582	788
	未经选择的TIL		1749	919
L4097	经PD1选择的TIL	NSCLC	230	1982
	未经选择的TIL		1147	2455
L4100	经PD1选择的TIL	NSCLC	536	997
	未经选择的TIL		1498	900
L4101	经PD1选择的TIL	NSCLC	1346	896
	未经选择的TIL		2196	962
L4104	经PD1选择的TIL	NSCLC	1711	1257
	未经选择的TIL		649	1421
L4106	经PD1选择的TIL	NSCLC	1179	1367
	未经选择的TIL		4500	1912
M1132	经PD1选择的TIL	黑素瘤	50	234
	未经选择的TIL		2670	1263
M1136	经PD1选择的TIL	黑素瘤	961	867
	未经选择的TIL		693	1190
M1139	经PD1选择的TIL	黑素瘤	557	1751
	未经选择的TIL		4908	1613
M1141	经PD1选择的TIL	黑素瘤	3429	1515
	未经选择的TIL		4950	2107

图141

肿瘤ID	样品ID	组织学	REP1扩增倍数	REP2扩增倍数
H3035	经PD1选择的TIL	HNSCC	350	2166
	未经选择的TIL		869	1385
H3039	经PD1选择的TIL	HNSCC	654	1082
	未经选择的TIL		123	893
L4089	经PD1选择的TIL	NSCLC	1502	2106
	未经选择的TIL		2821	1416
L4096	经PD1选择的TIL	NSCLC	582	788
	未经选择的TIL		1749	919
L4097	经PD1选择的TIL	NSCLC	230	1982
	未经选择的TIL		1147	2455
L4100	经PD1选择的TIL	NSCLC	536	997
	未经选择的TIL		1498	900
L4101	经PD1选择的TIL	NSCLC	1346	896
	未经选择的TIL		2196	962
L4104	经PD1选择的TIL	NSCLC	1711	1257
	未经选择的TIL		649	1421
L4106	经PD1选择的TIL	NSCLC	1179	1367
	未经选择的TIL		4500	1912
M1132	经PD1选择的TIL	黑素瘤	50	234
	未经选择的TIL		2670	1263
M1136	经PD1选择的TIL	黑素瘤	961	867
	未经选择的TIL		693	1190
M1139	经PD1选择的TIL	黑素瘤	557	1751
	未经选择的TIL		4908	1613
M1141	经PD1选择的TIL	黑素瘤	3429	1515
	未经选择的TIL		4950	2107

图142

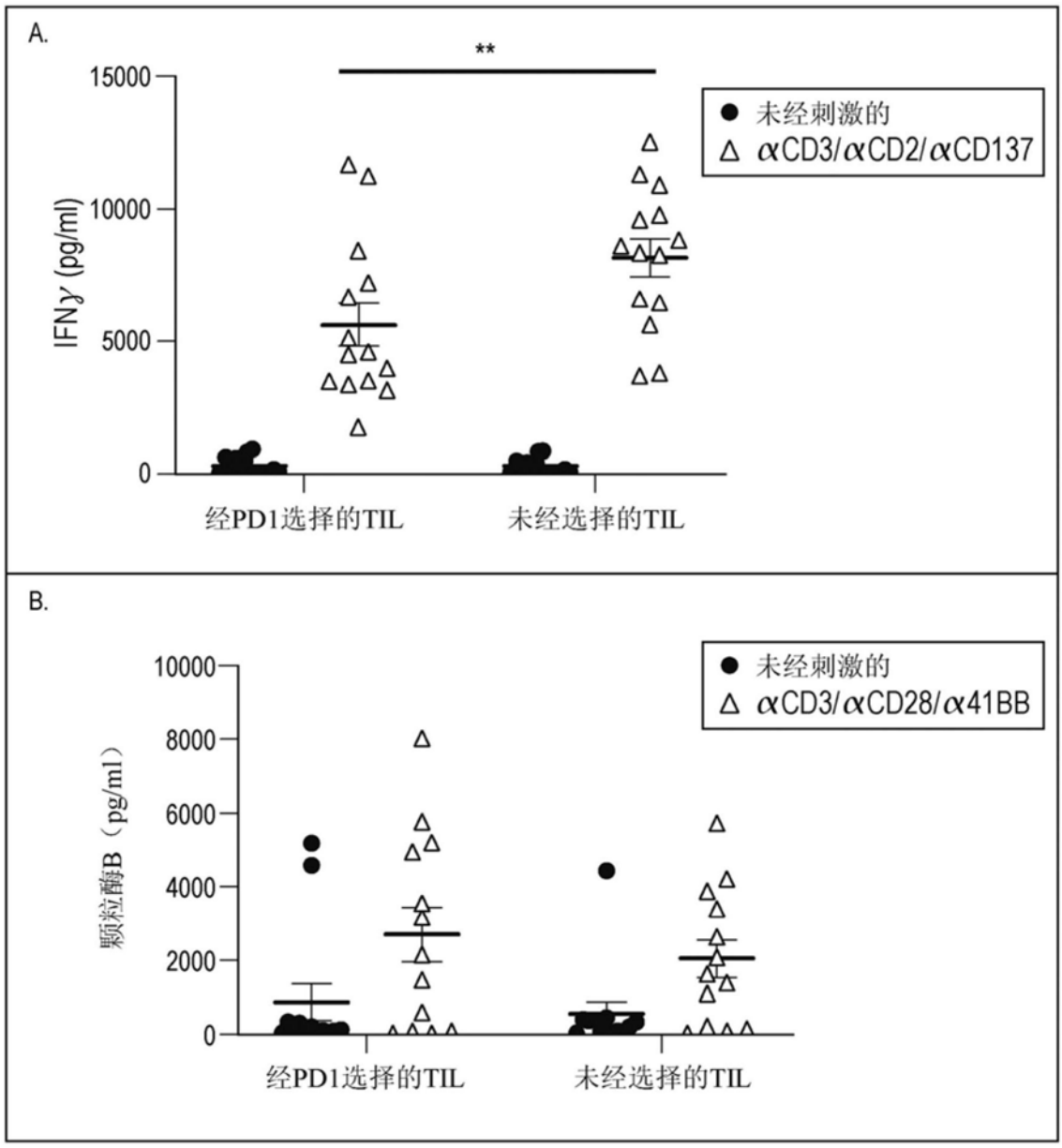

A.
**
15000
10000
5000
0
IFNγ (pg/ml)
未经刺激的
αCD3/αCD2/αCD137
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL
B.
10000
8000
6000
4000
2000
0
颗粒酶B（pg/ml）
未经刺激的
αCD3/αCD28/α41BB
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL

图143

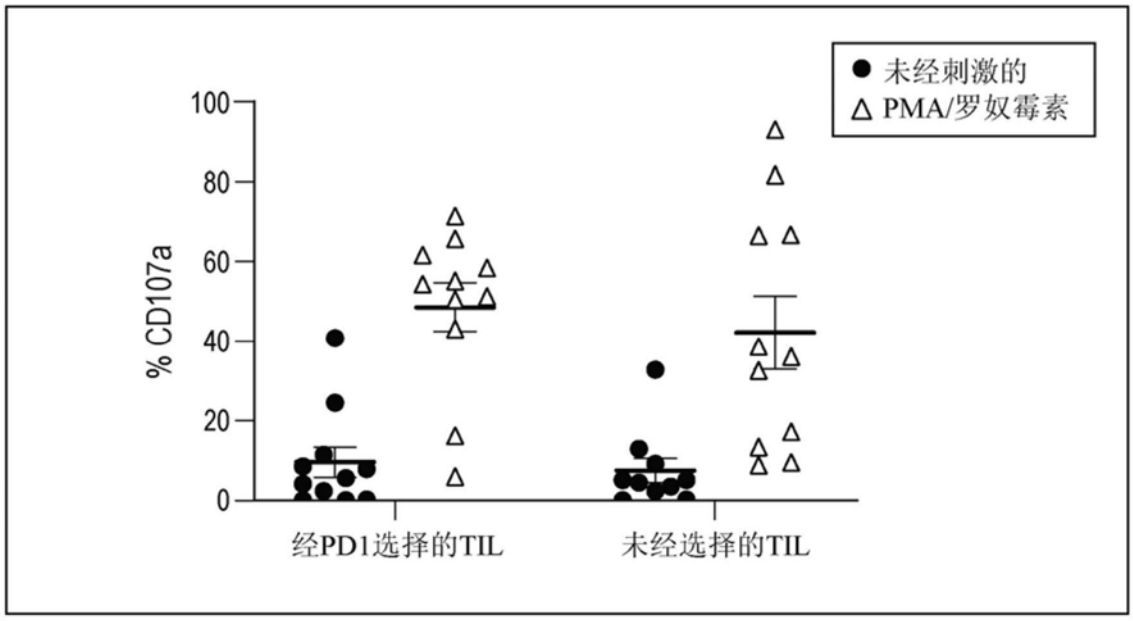


图144

肿瘤ID	样品ID	组织学	制备日期	REP1 扩增倍数	REP2 扩增倍数
H3035	经PD1选择的TIL	HNSCC	2019年3月15日	350	2166
	未经选择的TIL			869	1385
H3039	经PD1选择的TIL	HNSCC	2019年4月9日	654	1082
	未经选择的TIL			123	893
L4089	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月22日	1502	2106
	未经选择的TIL			2821	1416
L4096	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年4月4日	582	788
	未经选择的TIL			1749	919
L4097	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月22日	230	1982
	未经选择的TIL			1147	2455
L4100	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月26日	536	997
	未经选择的TIL			1498	900
L4101	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年4月4日	1346	896
	未经选择的TIL			2196	962100
L4104	经PD1选择的TIL	NSCLC			
	未经选择的TIL				
L4106	经PD1选择的TIL	NSCLC	2019年3月29日	1179	1367
	未经选择的TIL			4500	1912
M1132	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月26日	50	234
	未经选择的TIL			2670	1263
M1136	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月26日	961	867
	未经选择的TIL			693	1190
M1139	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月22日	557	1751
	未经选择的TIL			4908	1613
M1141	经PD1选择的TIL	黑素瘤	2019年3月29日	3429	1515
	未经选择的TIL			4950	2107

图145

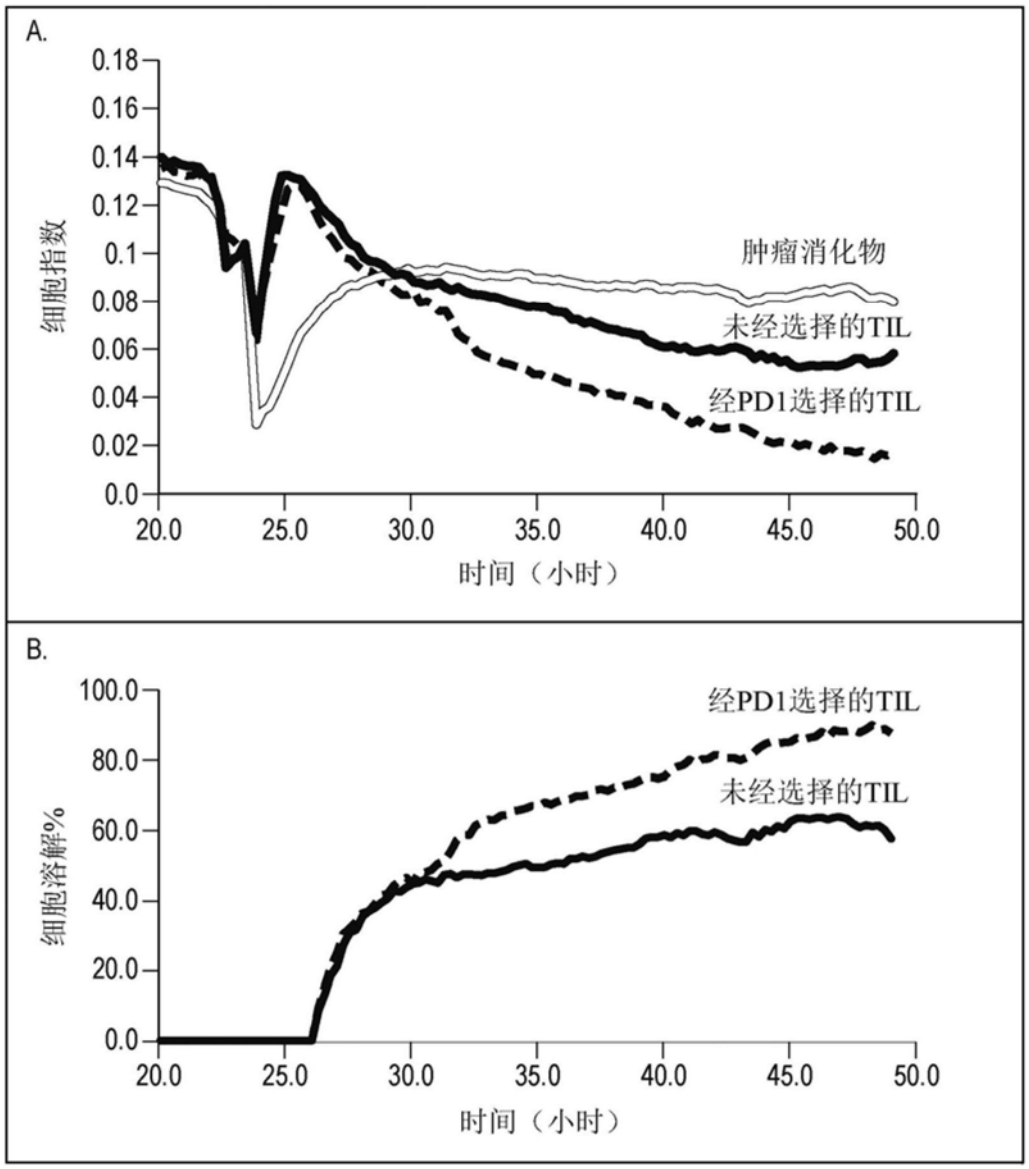

A.
细胞指数
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
时间（小时）
肿瘤消化物
未经选择的TIL
经PD1选择的TIL
B.
细胞溶解%
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
时间（小时）
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL

图146

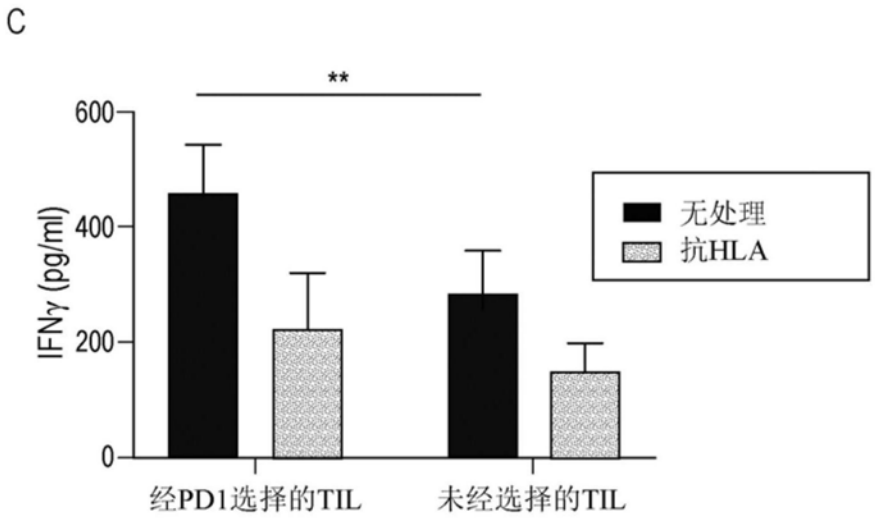


图146C

肿瘤ID	样品ID	组织学	REP1扩增倍数	REP2扩增倍数
H3035	经PD1选择的TIL	HNSCC	350	2166
	未经选择的TIL		869	1385
H3039	经PD1选择的TIL	HNSCC	654	1082
	未经选择的TIL		123	893
L4089	经PD1选择的TIL	NSCLC	1502	2106
	未经选择的TIL		2821	1416
L4096	经PD1选择的TIL	NSCLC	582	788
	未经选择的TIL		1749	919
L4097	经PD1选择的TIL	NSCLC	230	1982
	未经选择的TIL		1147	2455
L4100	经PD1选择的TIL	NSCLC	536	997
	未经选择的TIL		1498	900
L4101	经PD1选择的TIL	NSCLC	1346	896
	未经选择的TIL		2196	962
L4104	经PD1选择的TIL	NSCLC	1711	1257
	未经选择的TIL		649	1421
L4106	经PD1选择的TIL	NSCLC	1179	1367
	未经选择的TIL		4500	1912
M1132	经PD1选择的TIL	黑素瘤	50	234
	未经选择的TIL		2670	1263
M1136	经PD1选择的TIL	黑素瘤	961	867
	未经选择的TIL		693	1190
M1139	经PD1选择的TIL	黑素瘤	557	1751
	未经选择的TIL		4908	1613
M1141	经PD1选择的TIL	黑素瘤	3429	1515
	未经选择的TIL		4950	2107

图147

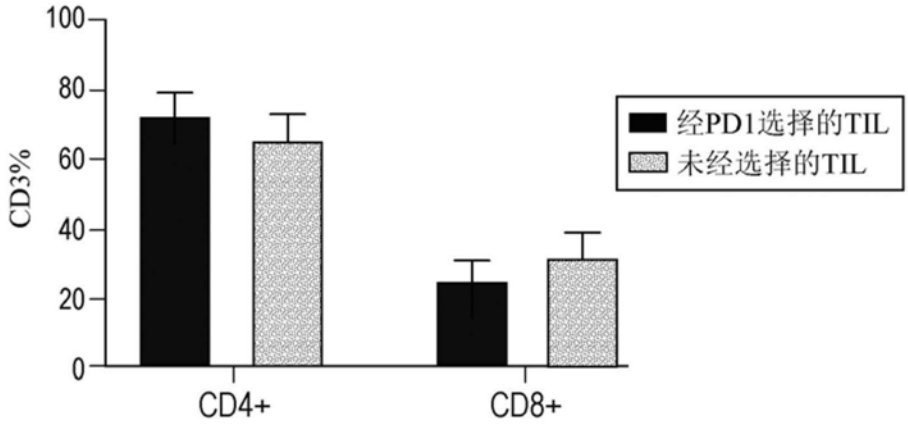


图148

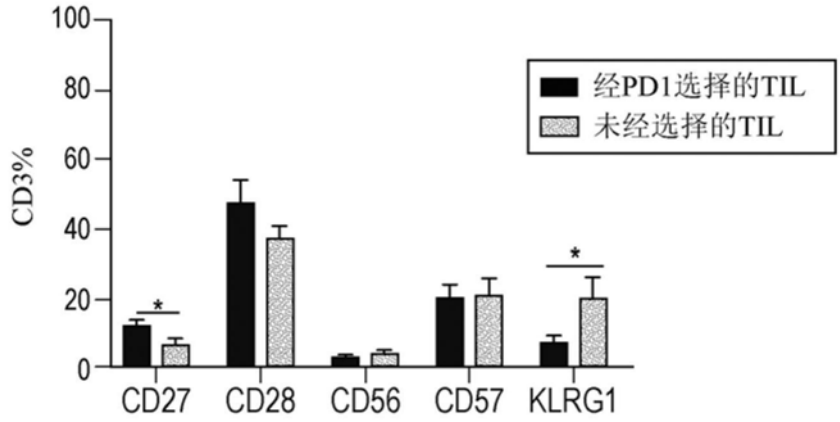


图149

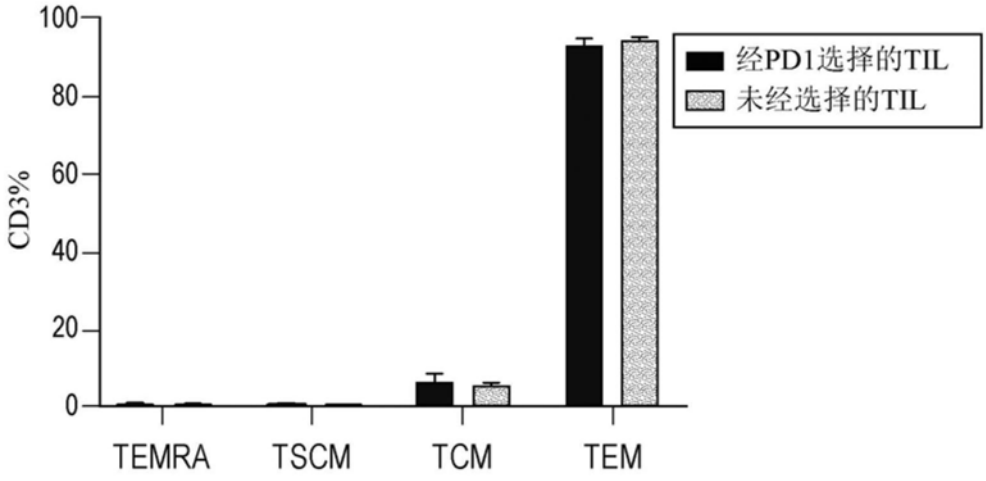


图150

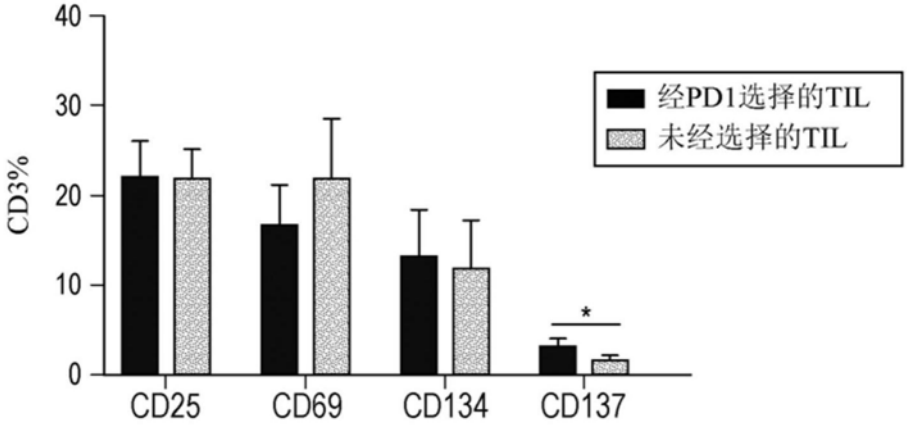


图151

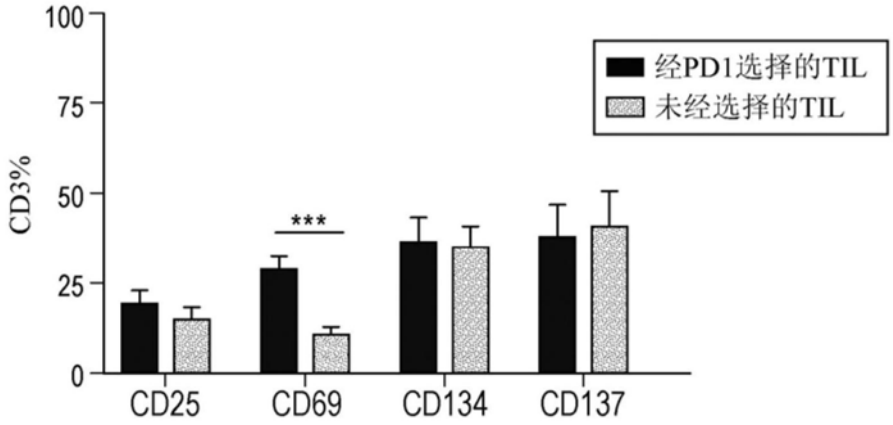


图152

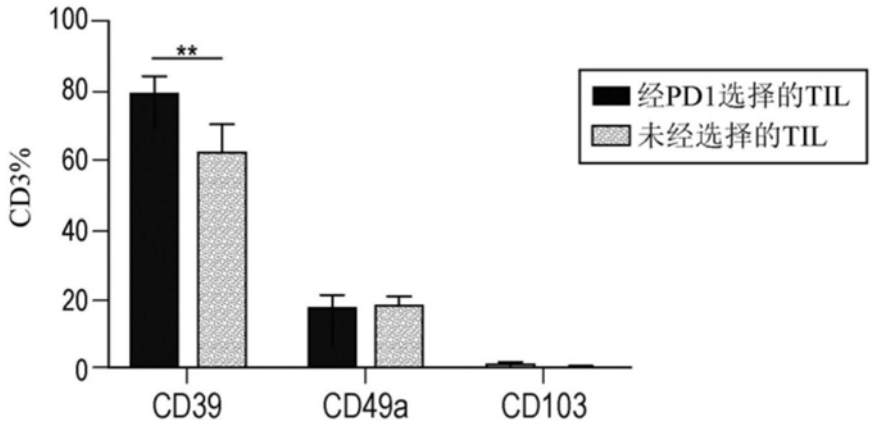


图153

条件	全规模工艺
REP-1 TIL 饲养细胞 CM1 IL-2 OKT3（30 ng/mL） G-Rex	第0天：REP-1 PD1分选计数 100e6 1 L 6000 IU/mL 30 ng/mL 100MCS
REP-2 TIL 饲养细胞 CM2 IL-2 OKT3（30 ng/mL） G-Rex	第11天：REP-2 5e6-200e6 TVC 5e9 5 L 3000 IU/mL 30 ng/mL 500MCS
规模扩大	第16天：体积减少并且在CM4 + 3000 IU/mL的IL-2中分开到最多5个G-Rex500MCS
REP-2采集	第22天：REP-2采集

图154

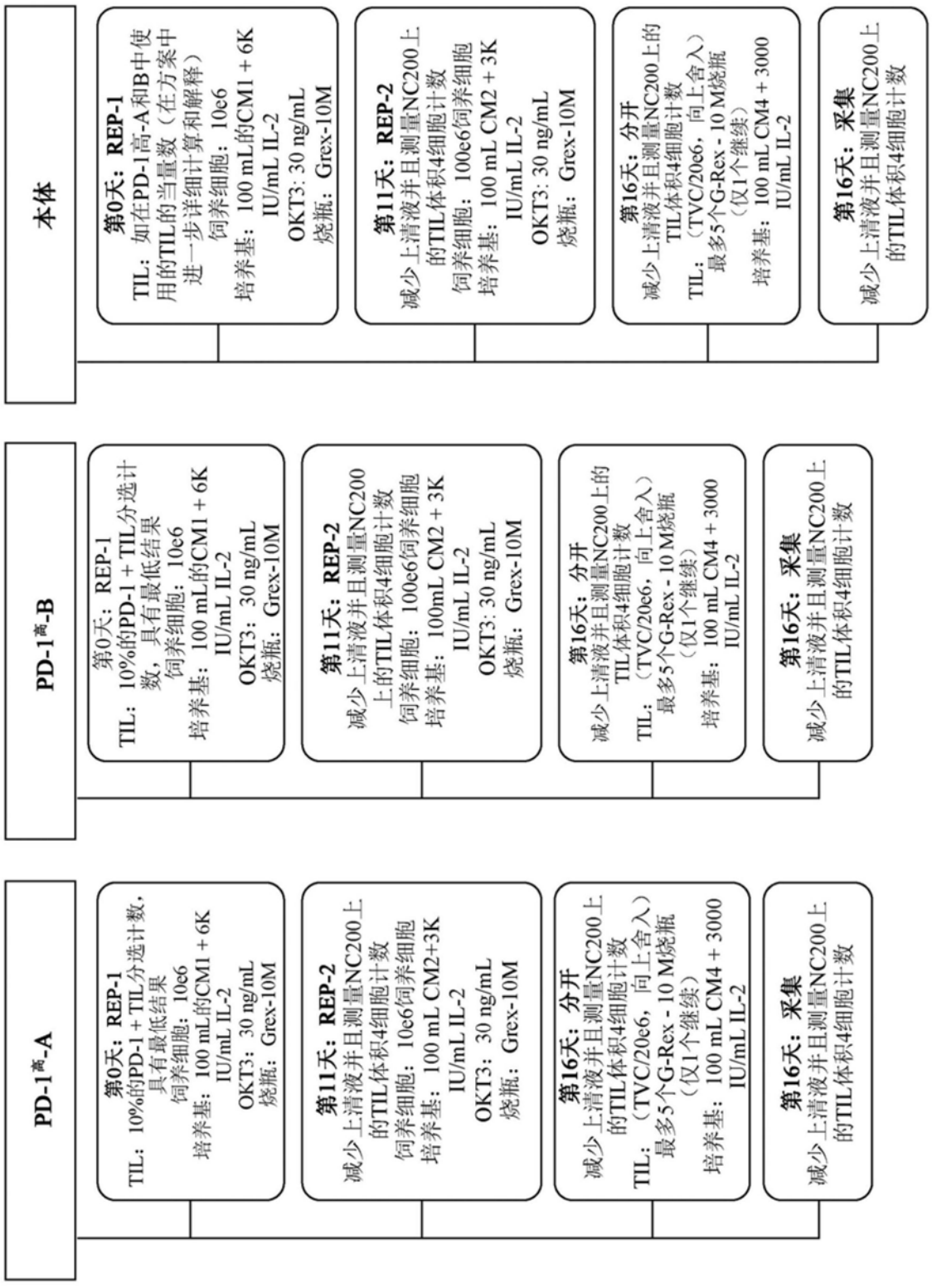

本体
第0天：REP-1
TIL：如在PD-1高-A和B中使用的TIL的当量数（在方案中进一步详细计算和解释）
饲养细胞：10e6
培养基：100 mL的CM1 + 6K IU/mL IL-2
OKT3: 30 ng/mL
烧瓶：Grex-10M
第11天：REP-2
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
饲养细胞：100e6饲养细胞
培养基：100 mL CM2 + 3K IU/mL IL-2
OKT3: 30 ng/mL
烧瓶：Grex-10M
第16天：分开
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
TIL：（TVC/20e6，向上舍入）最多5个G-Rex - 10 M烧瓶（仅1个继续）
培养基：100 mL CM4 + 3000 IU/mL IL-2
第16天：采集
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
PD-1高-B
第0天：REP-1
TIL：10%的PD-1 + TIL分选计数，具有最低结果
饲养细胞：10e6
培养基：100 mL的CM1 + 6K IU/mL IL-2
OKT3：30 ng/mL
烧瓶：Grex-10M
第11天：REP-2
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
饲养细胞：100e6饲养细胞
培养基：100mL CM2 + 3K IU/mL IL-2
OKT3: 30 ng/mL
烧瓶：Grex-10M
第16天：分开
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
TIL：（TVC/20e6，向上舍入）最多5个G-Rex - 10 M烧瓶（仅1个继续）
培养基：100 mL CM4 + 3000 IU/mL IL-2
第16天：采集
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
PD-1高-A
第0天：REP-1
TIL：10%的PD-1 + TIL分选计数，具有最低结果
饲养细胞：10e6
培养基：100 mL的CM1 + 6K IU/mL IL-2
OKT3：30 ng/mL
烧瓶：Grex-10M
第11天：REP-2
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
饲养细胞：10e6饲养细胞
培养基：100 mL CM2+3K IU/mL IL-2
OKT3：30 ng/mL
烧瓶：Grex-10M
第16天：分开
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数
TIL：（TVC/20e6，向上舍入）最多5个G-Rex - 10 M烧瓶（仅1个继续）
培养基：100 mL CM4 + 3000 IU/mL IL-2
第16天：采集
减少上清液并且测量NC200上的TIL体积4细胞计数

图155

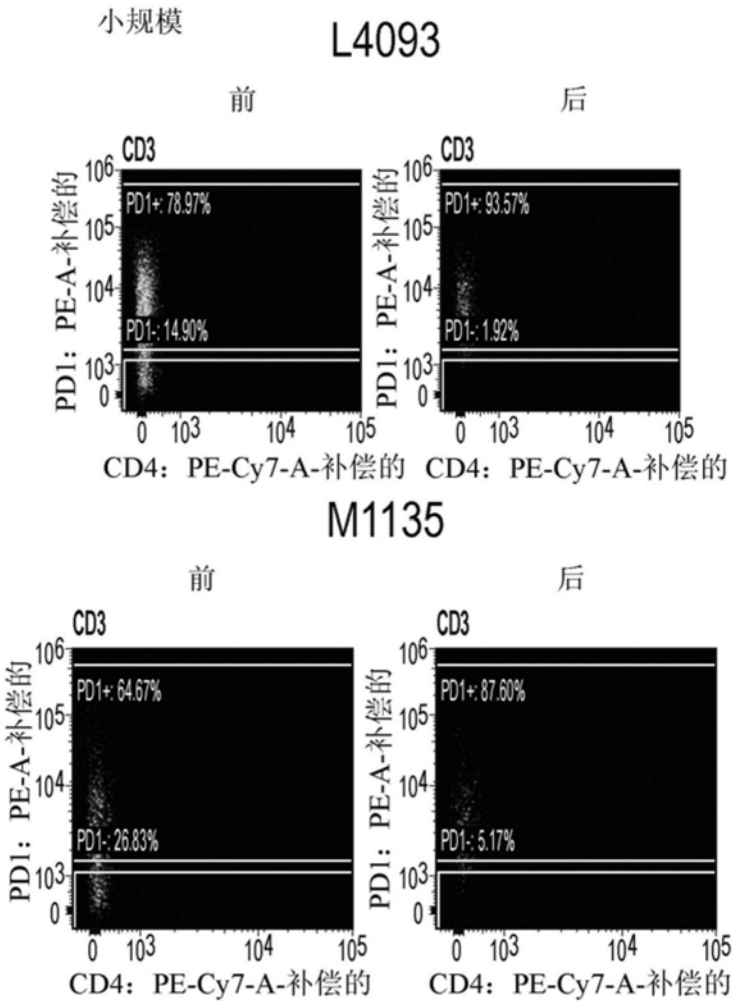

小规模
L4093
前
后
CD3
PD1+: 78.97%
PD1-: 14.90%
PD1+: 93.57%
PD1-: 1.92%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
M1135
前
后
PD1+: 64.67%
PD1-: 26.83%
PD1+: 87.60%
PD1-: 5.17%

图156A

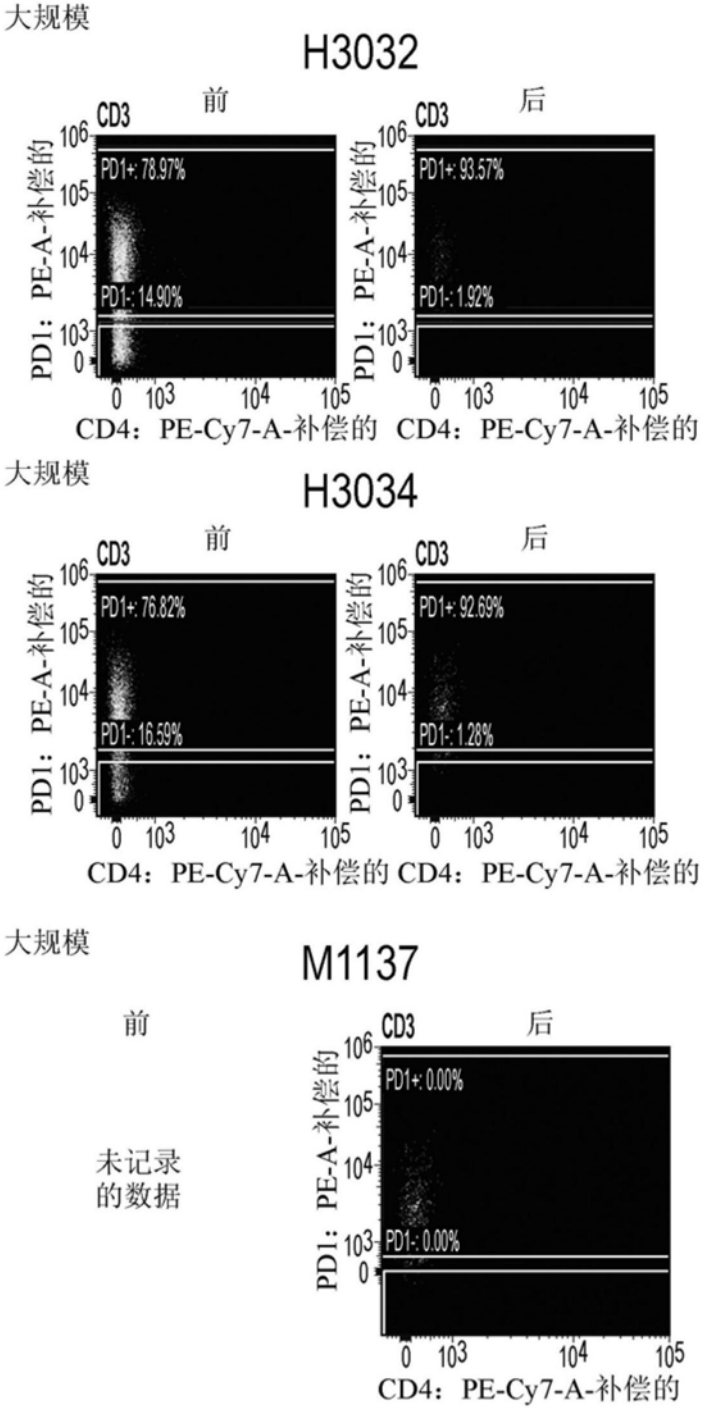
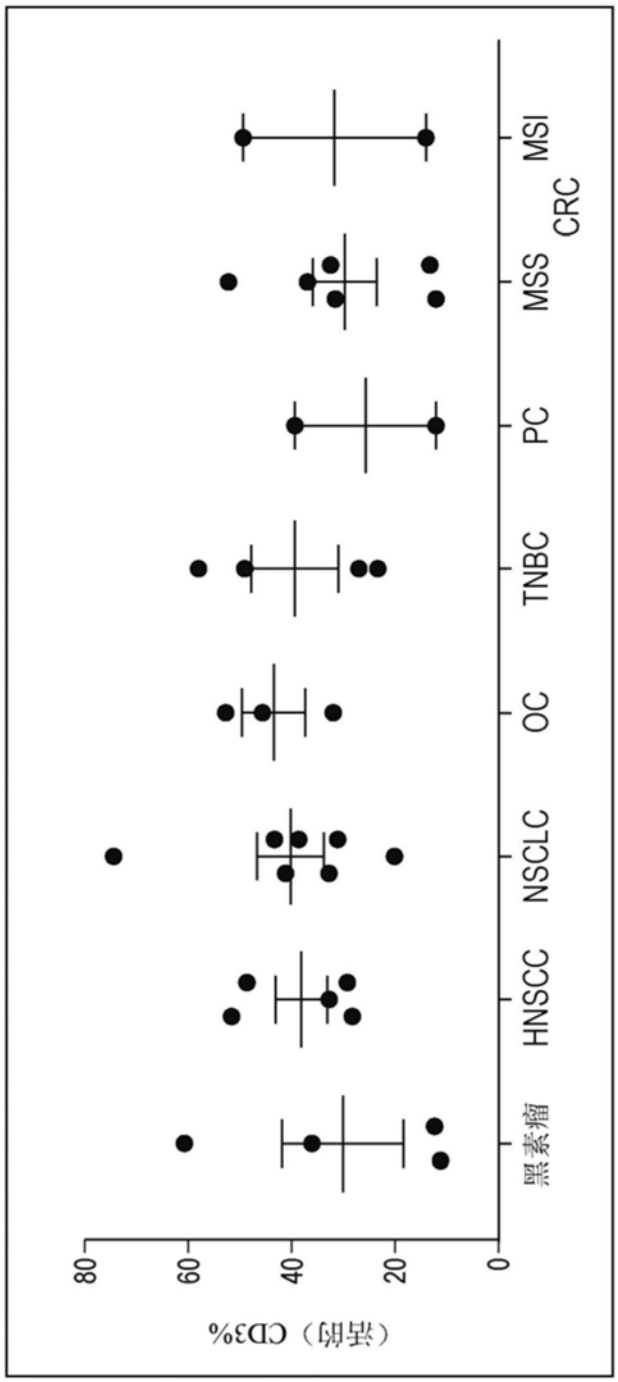

大规模
H3032
前
后
CD3
PD1+: 78.97%
PD1-: 14.90%
PD1+: 93.57%
PD1-: 1.92%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
大规模
H3034
前
后
CD3
PD1+: 76.82%
PD1-: 16.59%
PD1+: 92.69%
PD1-: 1.28%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
大规模
M1137
前
未记录
的数据
后
CD3
PD1+: 0.00%
PD1-: 0.00%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的

图156B



图例：PD-1在多种组织学中的表达。对于每种组织学内的单独样品，绘制$CD3^+$ TIL群体中$PD\text{-}1^+$ TIL的百分比。水平线表示每个子集的平均百分比，并且竖直线表示标准误差。

图157

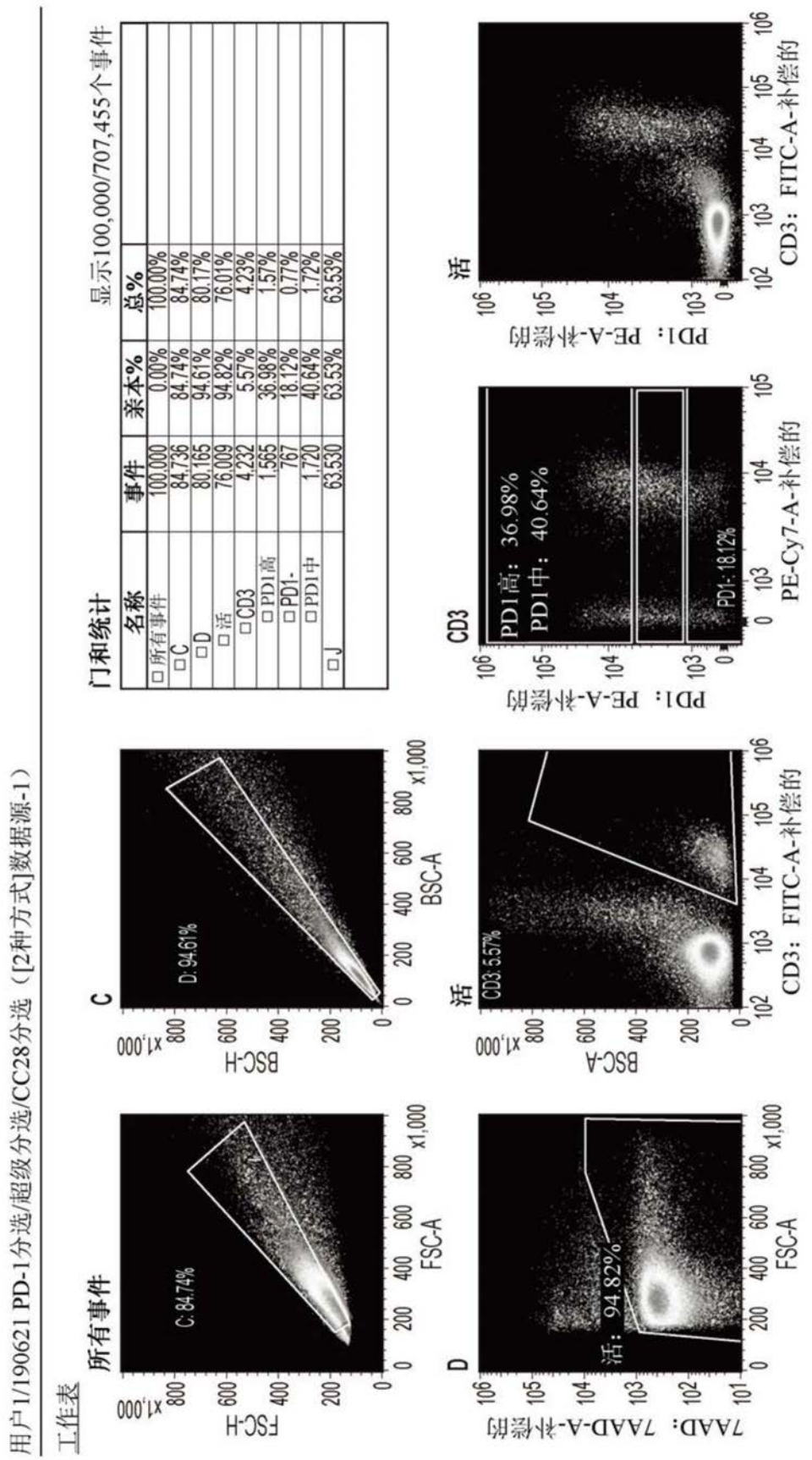

用户1/190621 PD-1分选/超级分选/CC28分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 84.74%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 94.61%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/707,455个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 84,736 84.74% 84.74%
D 80,165 94.61% 80.17%
活 76,009 94.82% 76.01%
CD3 4,232 5.57% 4.23%
PD1高 1,565 36.98% 1.57%
PD1- 767 18.12% 0.77%
PD1中 1,720 40.64% 1.72%
J 63,530 63.53% 63.53%
D
活: 94.82%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 5.57%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 36.98%
PD1中: 40.64%
PD1-: 18.12%
PD1: PE-A-补偿的
PE-Cy7-A-补偿的

图158A

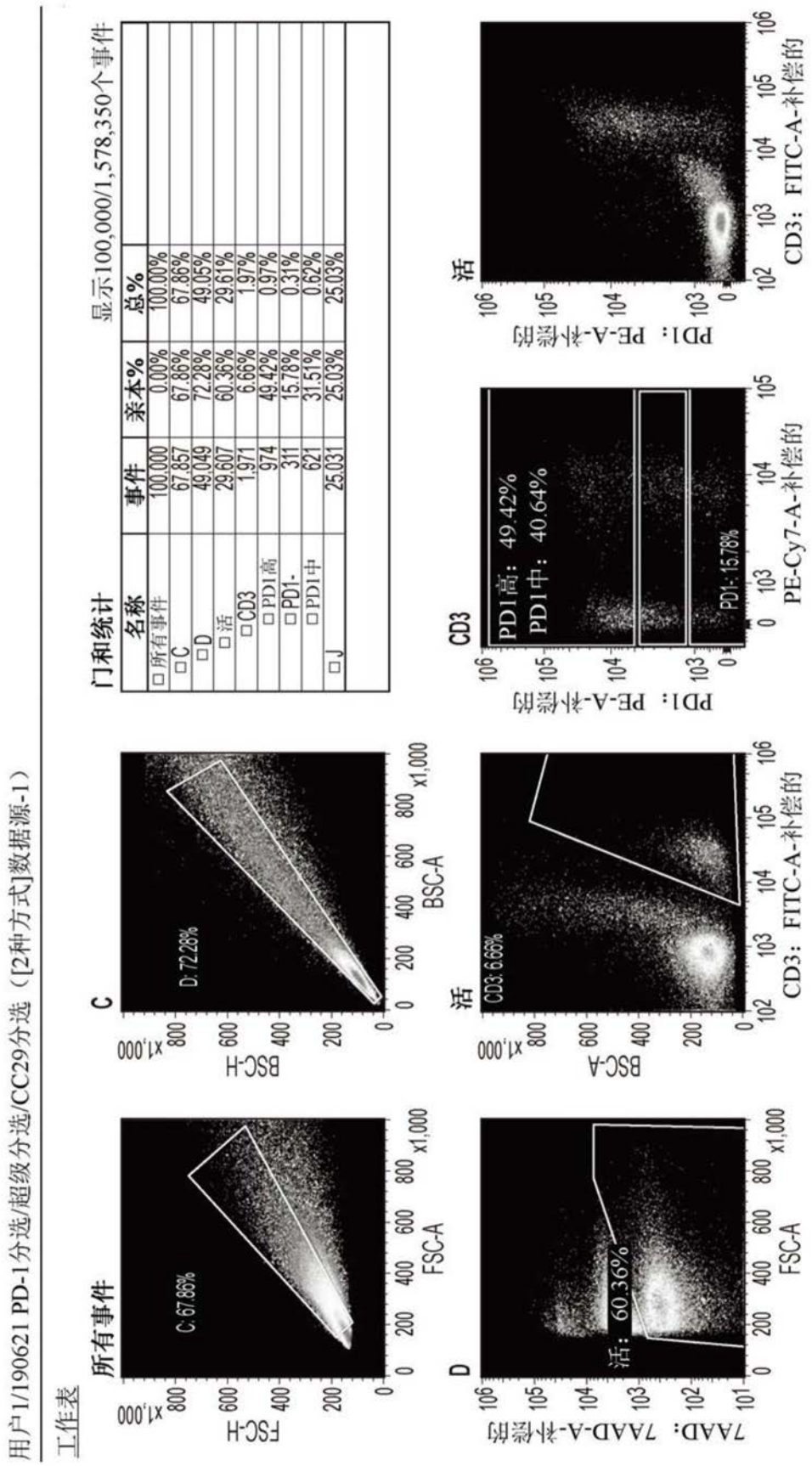

用户1/190621 PD-1分选/超级分选/CC29分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/1,578,350个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 67,857 67.86% 67.86%
D 49,049 72.28% 49.05%
活 29,607 60.36% 29.61%
CD3 1,971 6.66% 1.97%
PD1高 974 49.42% 0.97%
PD1- 311 15.78% 0.31%
PD1中 621 31.51% 0.62%
J 25,031 25.03% 25.03%
所有事件
C: 67.86%
FSC-H
FSC-A
C
D: 72.28%
BSC-H
BSC-A
D
活: 60.36%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 6.66%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 49.42%
PD1中: 40.64%
PD1-: 15.78%
PD1: PE-A-补偿的
PE-Cy7-A-补偿的

图158B

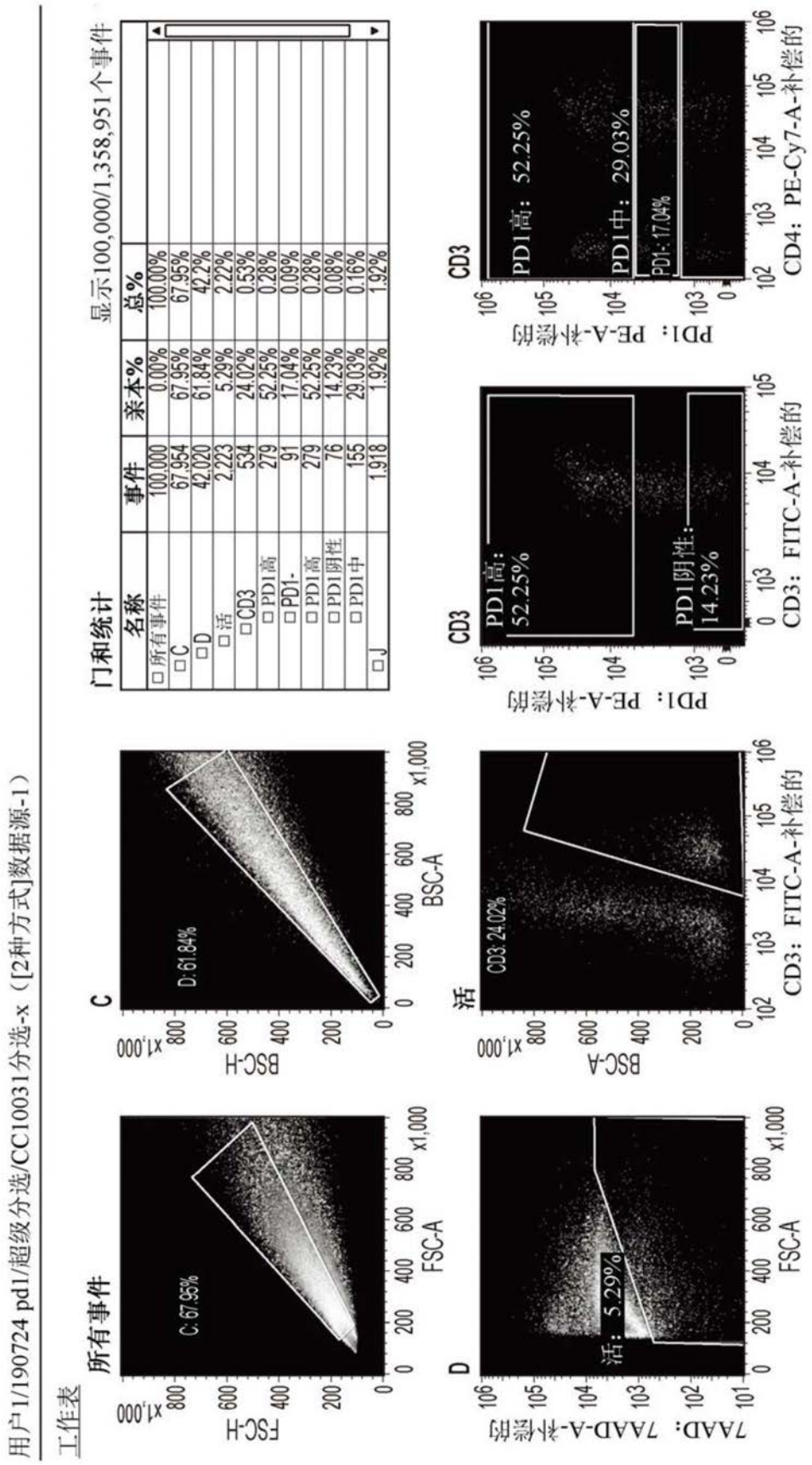

用户1/190724 pd1/超级分选/CC10031分选-x（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/1,358,951个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 67,954 67.95% 67.95%
D 42,020 61.84% 42.2%
活 2,223 5.29% 2.22%
CD3 534 24.02% 0.53%
PD1高 279 52.25% 0.28%
PD1- 91 17.04% 0.09%
PD1高 279 52.25% 0.28%
PD1阴性 76 14.23% 0.08%
PD1中 155 29.03% 0.16%
J 1,918 1.92% 1.92%
所有事件
C: 67.95%
FSC-H
FSC-A
C
D: 61.84%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 24.02%
D
活: 5.29%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 52.25%
PD1中: 29.03%
PD1: 17.04%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
PD1高:
52.25%
PD1阴性:
14.23%
CD3: FITC-A-补偿的

图158C

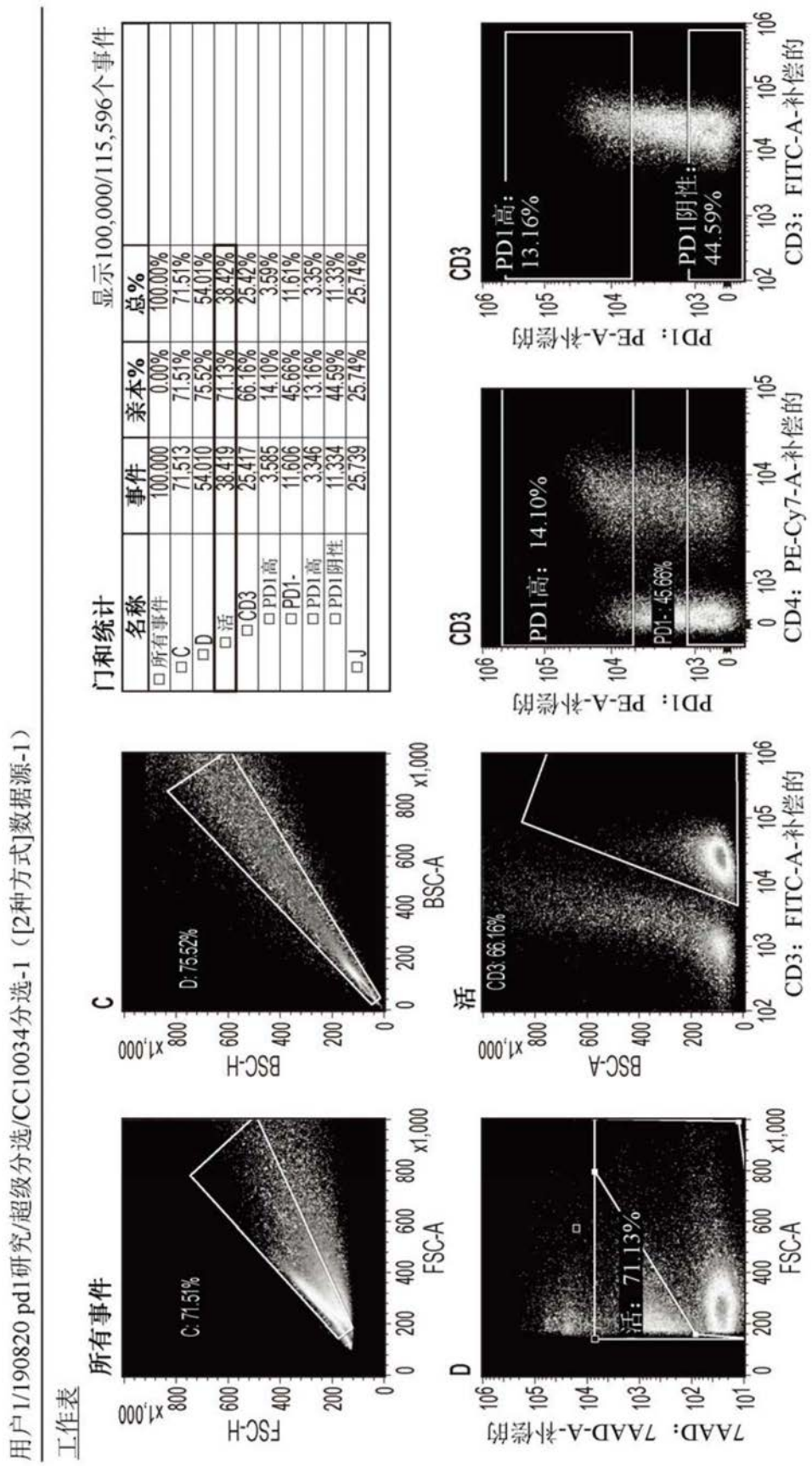

用户1/190820 pd1研究/超级分选/CC10034分选-1（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/115,596个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100.000 0.00% 100.00%
C 71.513 71.51% 71.51%
D 54.010 75.52% 54.01%
活 38.419 71.13% 38.42%
CD3 25.417 66.16% 25.42%
PD1高 3.585 14.10% 3.59%
PD1- 11.606 45.66% 11.61%
PD1高 3.346 13.16% 3.35%
PD1阴性 11.334 44.59% 11.33%
J 25.739 25.74% 25.74%
所有事件
C: 71.51%
FSC-H
FSC-A
C
D: 75.52%
BSC-H
BSC-A
活
CD3 66.16%
CD3: FITC-A-补偿的
D
活: 71.13%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 14.10%
PD1-: 45.66%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
PD1高: 13.16%
PD1阴性: 44.59%

图158D

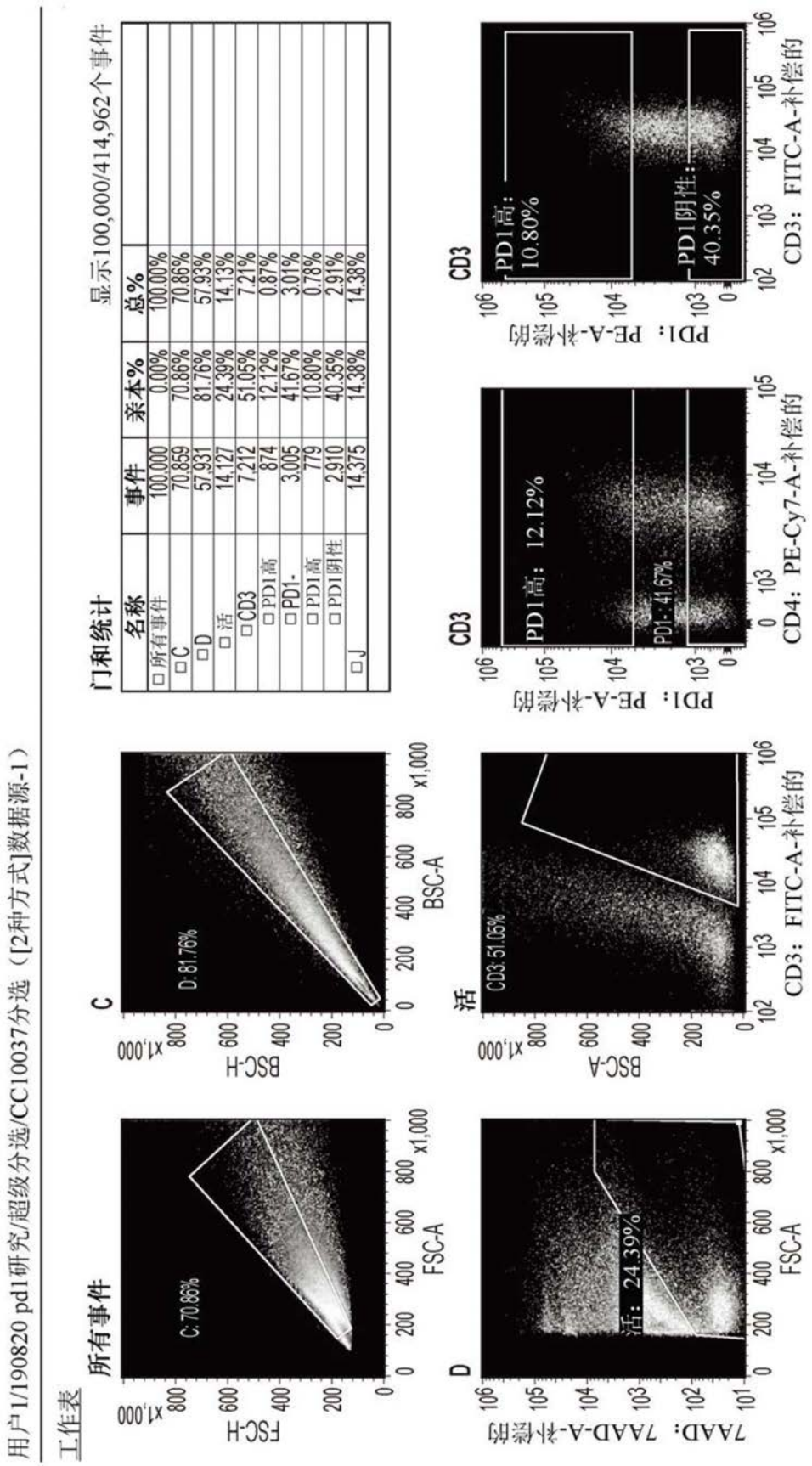

用户1/190820 pd1研究/超级分选/CC10037分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/414,962个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 70,859 70.86% 70.86%
D 57,931 81.76% 57.93%
活 14,127 24.39% 14.13%
CD3 7,212 51.05% 7.21%
PD1高 874 12.12% 0.87%
PD1- 3,005 41.67% 3.01%
PD1高 779 10.80% 0.78%
PD1阴性 2,910 40.35% 2.91%
J 14,375 14.38% 14.38%
所有事件
C: 70.86%
FSC-H
FSC-A
C
D: 81.76%
BSC-H
BSC-A
D
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活: 24.39%
活
CD3: 51.05%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1: PE-A-补偿的
PD1高: 12.12%
PD1-: 41.67%
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
PD1高: 10.80%
PD1阴性: 40.35%

图158E

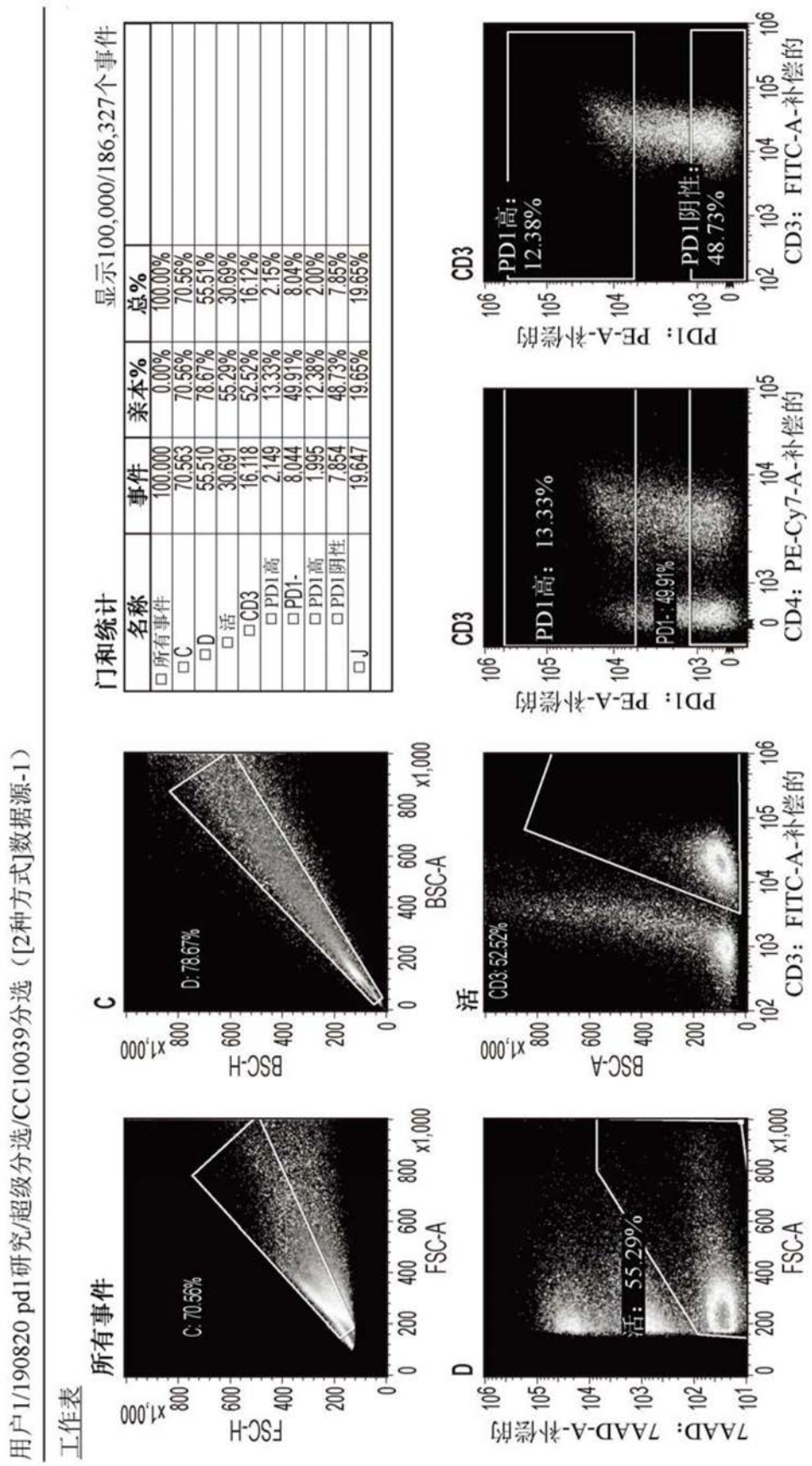

用户1/190820 pd1研究/超级分选/CC10039分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/186,327个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100.000 0.00% 100.00%
C 70.563 70.56% 70.56%
D 55.510 78.67% 55.51%
活 30.691 55.29% 30.69%
CD3 16.118 52.52% 16.12%
PD1高 2.149 13.33% 2.15%
PD1- 8.044 49.91% 8.04%
PD1高 1.995 12.38% 2.00%
PD1阴性 7.854 48.73% 7.85%
J 19.647 19.65% 19.65%
所有事件
C: 70.56%
FSC-H
FSC-A
C
D: 78.67%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 52.52%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
D
活: 55.29%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
FSC-A
CD3
PD1高: 13.33%
PD1-: 49.91%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD3
PD1高: 12.38%
PD1阴性: 48.73%
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158F

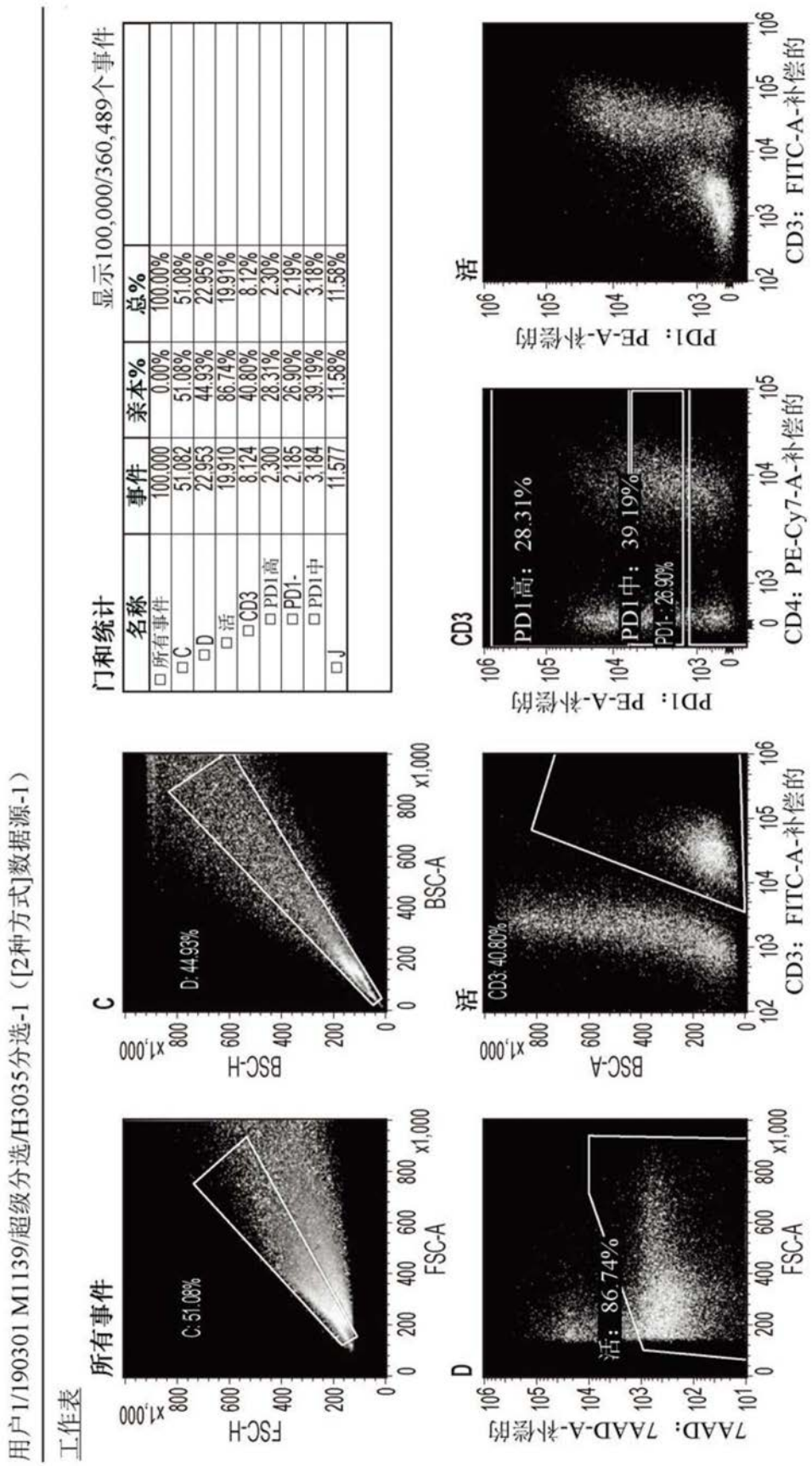

用户1/190301 M1139/超级分选/H3035分选-1（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 51.08%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 44.93%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/360,489个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 51,082 51.08% 51.08%
D 22,953 44.93% 22.95%
活 19,910 86.74% 19.91%
CD3 8,124 40.80% 8.12%
PD1高 2,300 28.31% 2.30%
PD1- 2,185 26.90% 2.19%
PD1中 3,184 39.19% 3.18%
J 11,577 11.58% 11.58%
D
活: 86.74%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 40.80%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 28.31%
PD1中: 39.19%
PD1-: 26.90%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图158G

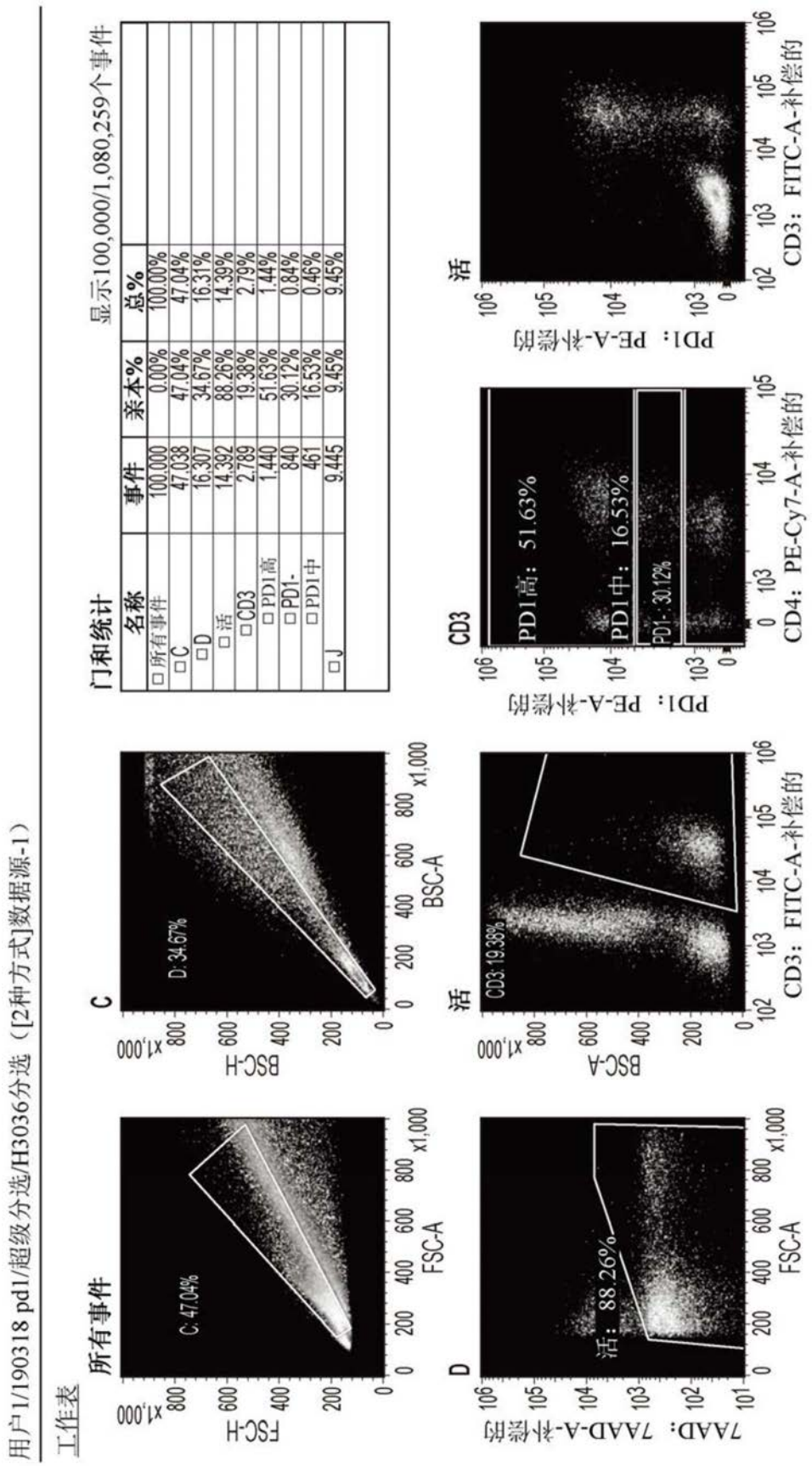

用户1/190318 pd1/超级分选/H3036分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/1,080,259个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 47,038 47.04% 47.04%
D 16,307 34.67% 16.31%
活 14,392 88.26% 14.39%
CD3 2,789 19.38% 2.79%
PD1高 1,440 51.63% 1.44%
PD1- 840 30.12% 0.84%
PD1中 461 16.53% 0.46%
J 9,445 9.45% 9.45%
所有事件
C: 47.04%
FSC-H
FSC-A
C
D: 34.67%
BSC-H
BSC-A
D
活: 88.26%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 19.38%
CD3
PD1高: 51.63%
PD1中: 16.53%
PD1-: 30.12%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158H

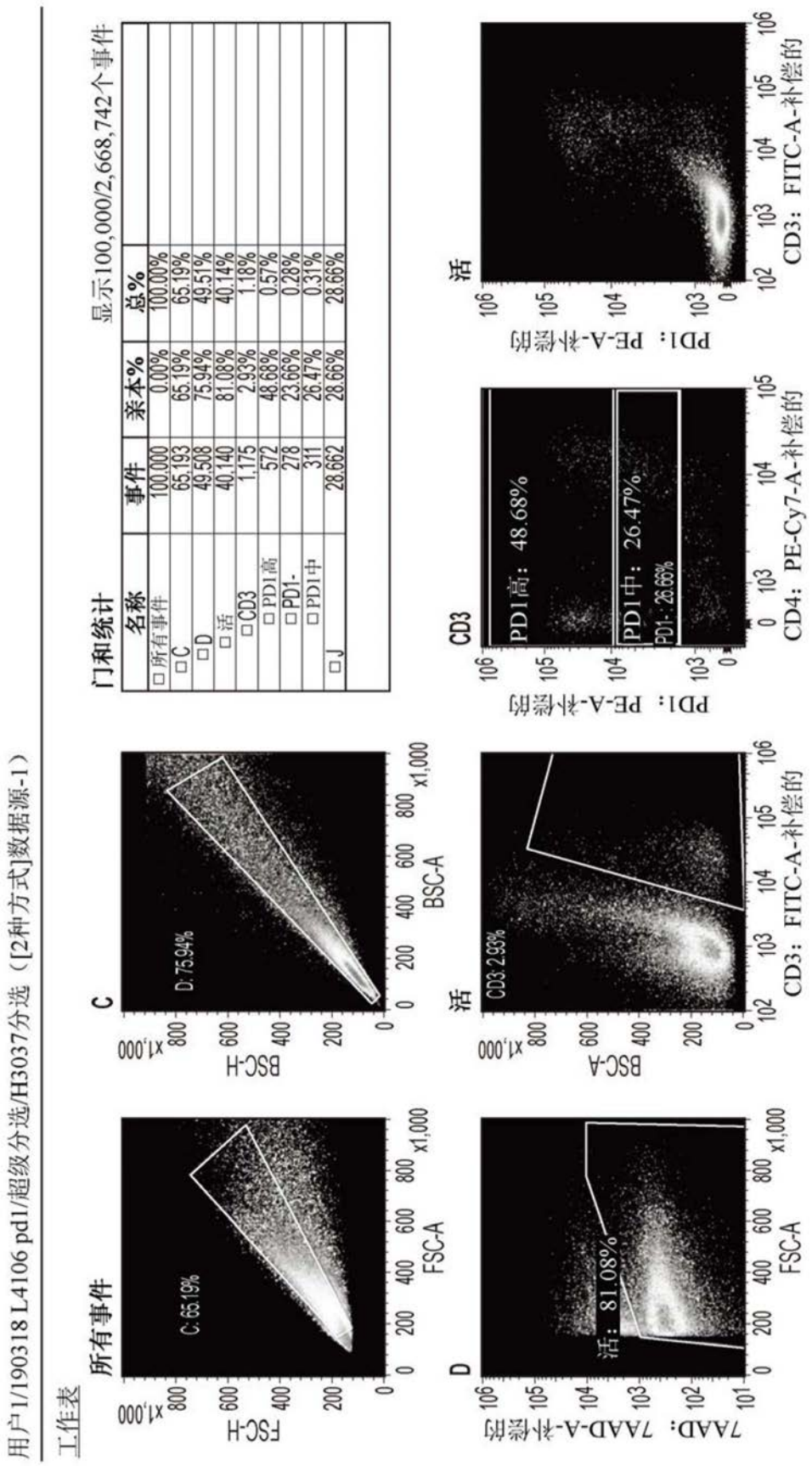

用户1/190318 L4106 pd1/超级分选/H3037分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 65.19%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 75.94%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/2,668,742个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 65,193 65.19% 65.19%
D 49,508 75.94% 49.51%
活 40,140 81.08% 40.14%
CD3 1,175 2.93% 1.18%
PD1高 572 48.68% 0.57%
PD1- 278 23.66% 0.28%
PD1中 311 26.47% 0.31%
J 28,662 28.66% 28.66%
D
活：81.08%
7AAD：7AAD-A-补偿的
FSC-A
活
CD3:2.93%
CD3：FITC-A-补偿的
BSC-A
CD3
PD1高：48.68%
PD1中：26.47%
PD1-：26.66%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
活
PD1：PE-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的

图158I

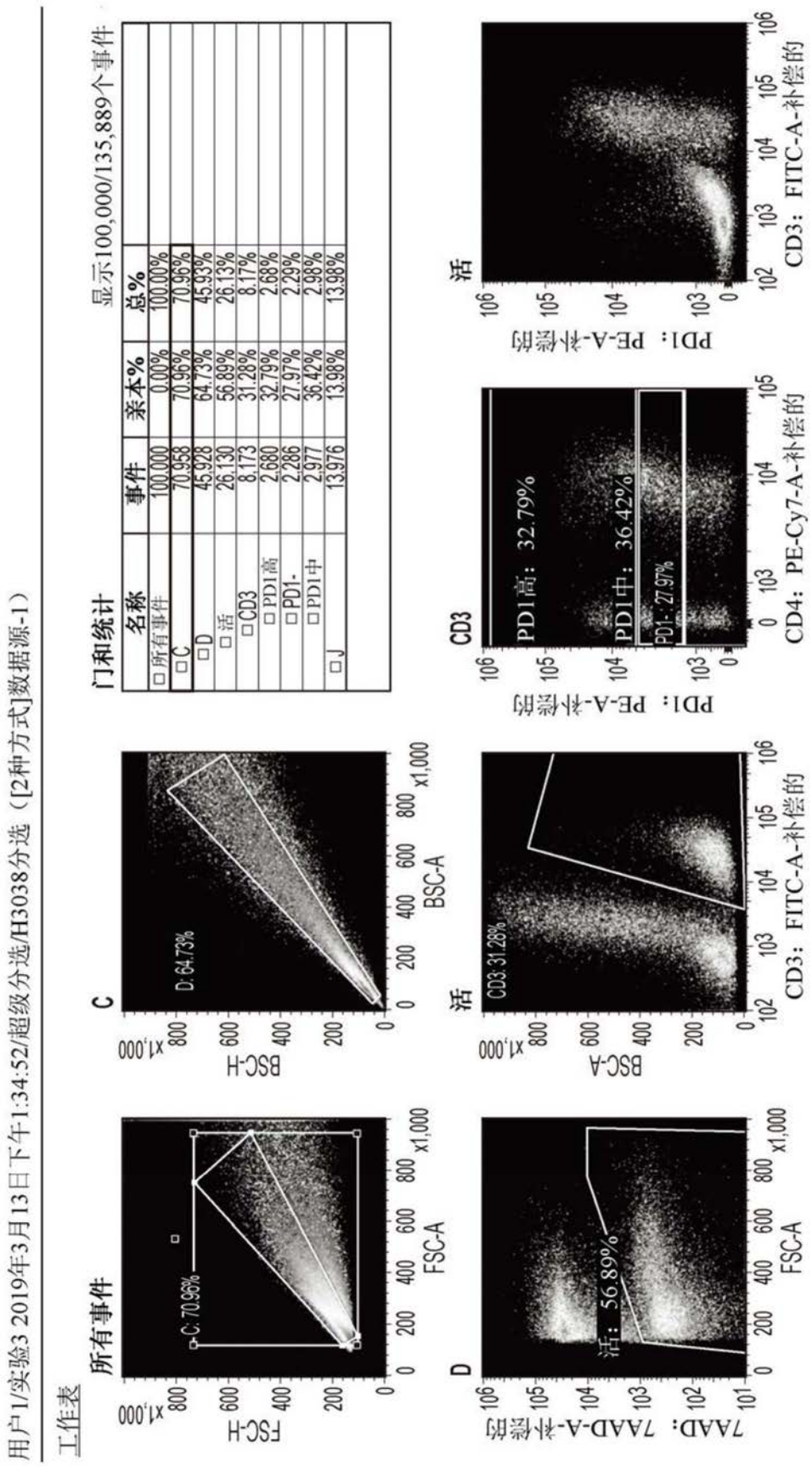

用户1/实验3 2019年3月13日下午1:34:52/超级分选/H3038分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/135,889个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 70,958 70.96% 70.96%
D 45,928 64.73% 45.93%
活 26,130 56.89% 26.13%
CD3 8,173 31.28% 8.17%
PD1高 2,680 32.79% 2.68%
PD1- 2,286 27.97% 2.29%
PD1中 2,977 36.42% 2.98%
J 13,976 13.98% 13.98%
所有事件
C: 70.96%
FSC-H
FSC-A
C
D: 64.73%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 31.28%
D
活: 56.89%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 32.79%
PD1中: 36.42%
PD1-: 27.97%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158J

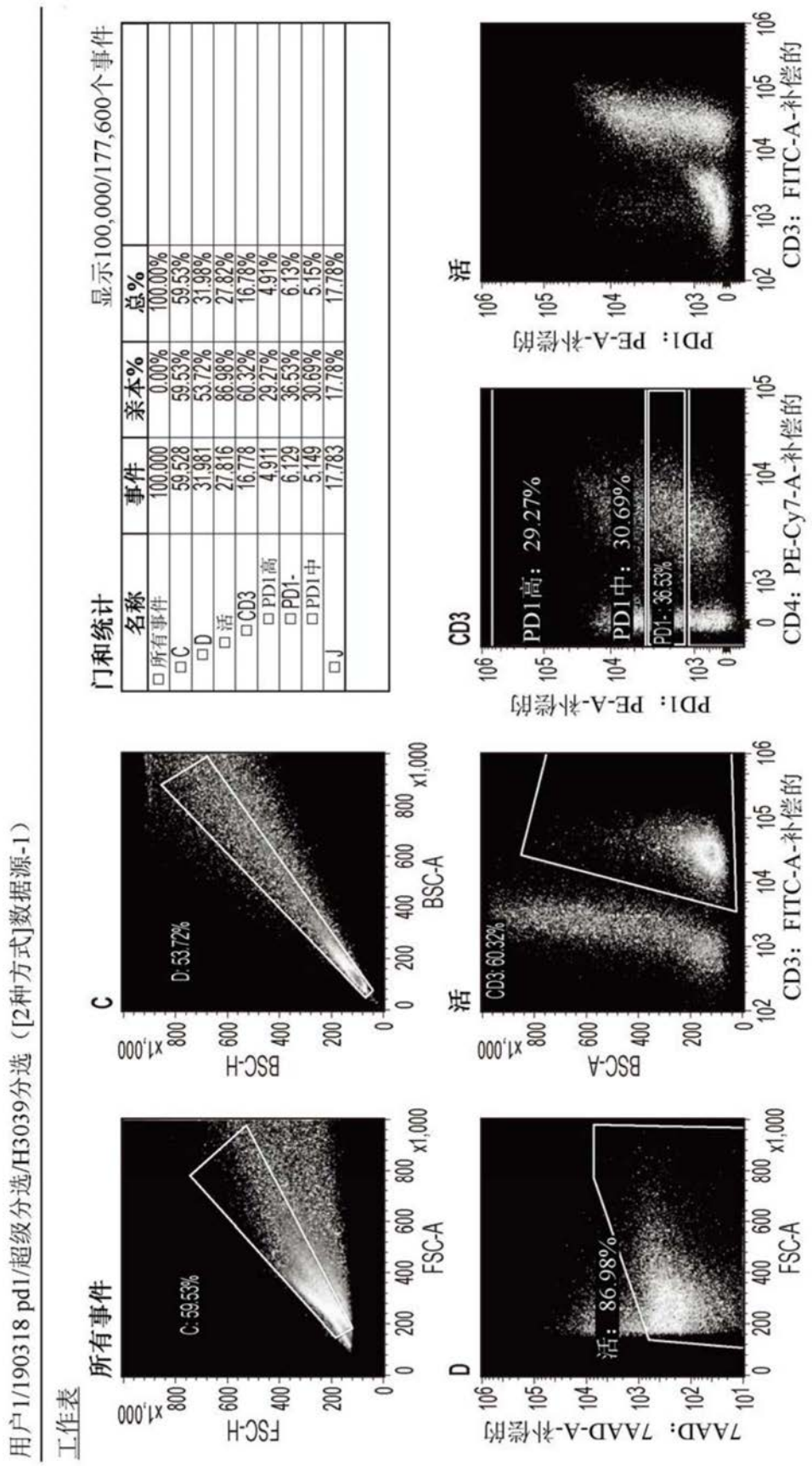

用户1/190318 pd1/超级分选/H3039分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/177,600个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100.000 0.00% 100.00%
C 59.528 59.53% 59.53%
D 31.981 53.72% 31.98%
活 27.816 86.98% 27.82%
CD3 16.778 60.32% 16.78%
PD1高 4.911 29.27% 4.91%
PD1- 6.129 36.53% 6.13%
PD1中 5.149 30.69% 5.15%
J 17.783 17.78% 17.78%
所有事件
C: 59.53%
FSC-H
FSC-A
C
D: 53.72%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 60.32%
D
活：86.98%
7AAD：7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高：29.27%
PD1中：30.69%
PD1-：36.53%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的

图158K

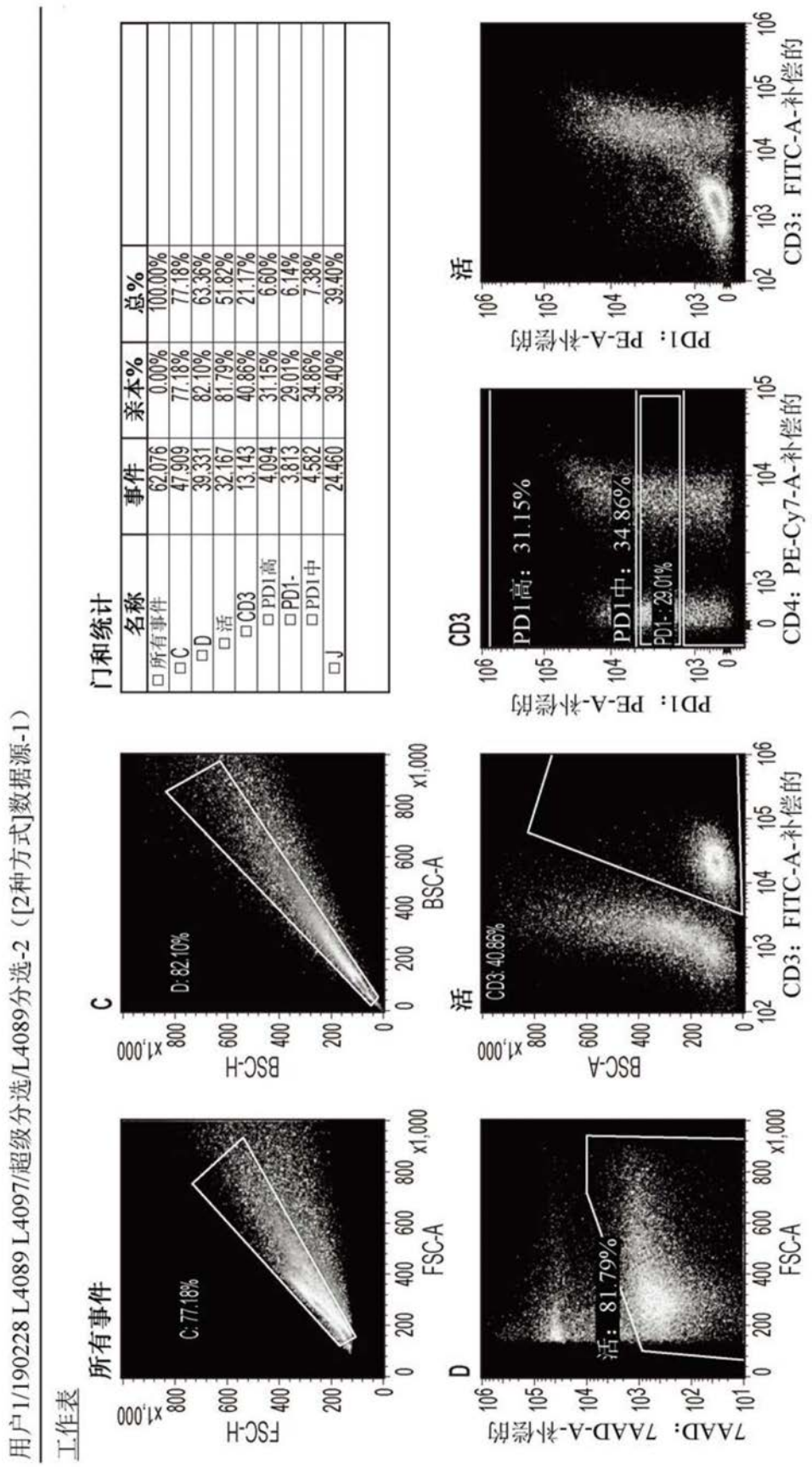

用户1/190228 L4089 L4097/超级分选/L4089分选-2（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 77.18%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 82.10%
BSC-H
BSC-A
门和统计
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 62,076 0.00% 100.00%
C 47,909 77.18% 77.18%
D 39,331 82.10% 63.36%
活 32,167 81.79% 51.82%
CD3 13,143 40.86% 21.17%
PD1高 4,094 31.15% 6.60%
PD1- 3,813 29.01% 6.14%
PD1中 4,582 34.86% 7.38%
J 24,460 39.40% 39.40%
D
活: 81.79%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
FSC-A
活
CD3: 40.86%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 31.15%
PD1中: 34.86%
PD1-: 29.01%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158L

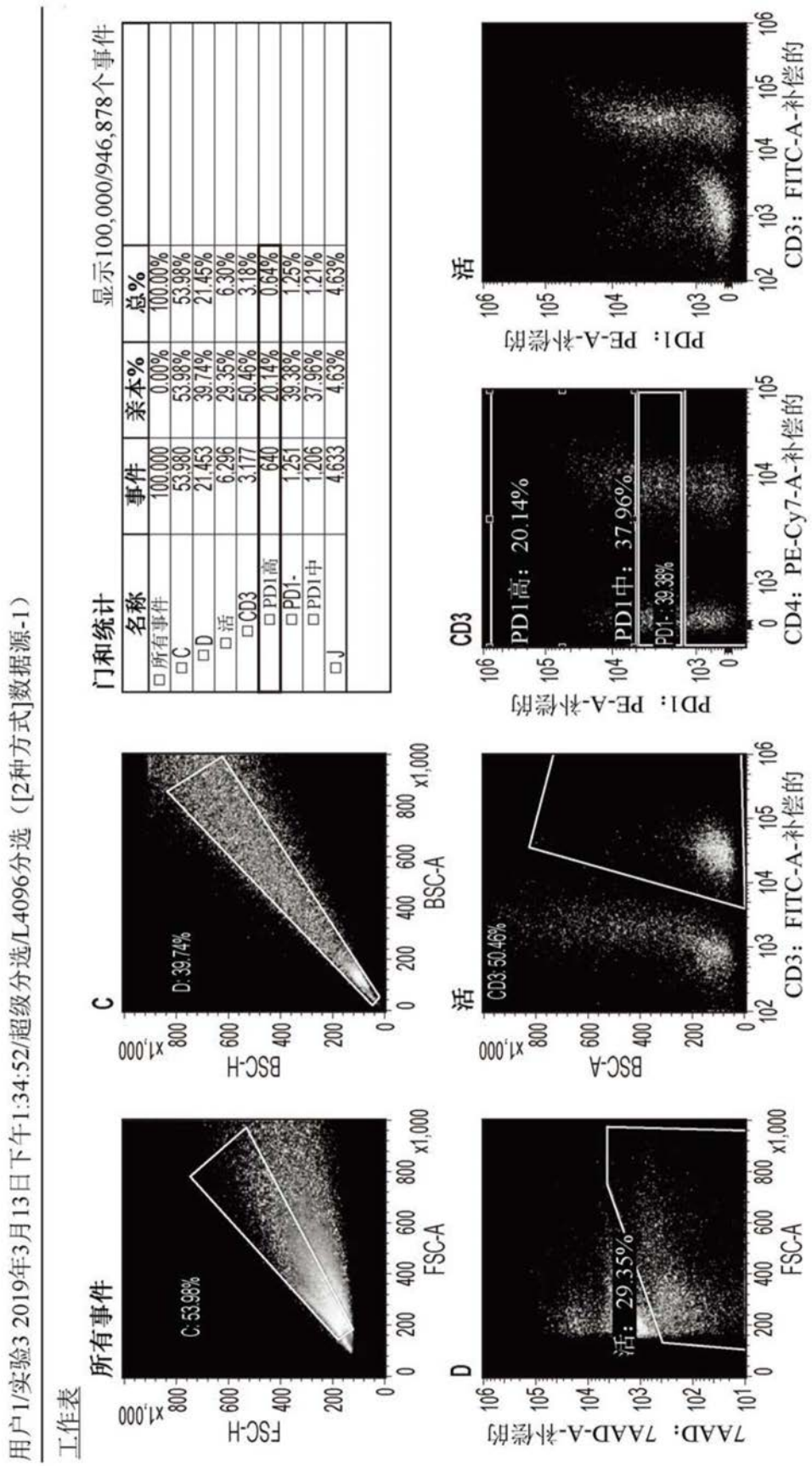

用户1/实验3 2019年3月13日下午1:34:52/超级分选/L4096分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/946,878个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 53,980 53.98% 53.98%
D 21,453 39.74% 21.45%
活 6,296 29.35% 6.30%
CD3 3,177 50.46% 3.18%
PD1高 640 20.14% 0.64%
PD1- 1,251 39.38% 1.25%
PD1中 1,206 37.96% 1.21%
J 4,633 4.63% 4.63%
所有事件
C: 53.98%
FSC-H
FSC-A
C
D: 39.74%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 50.46%
D
活: 29.35%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 20.14%
PD1中: 37.96%
PD1-: 39.38%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158M

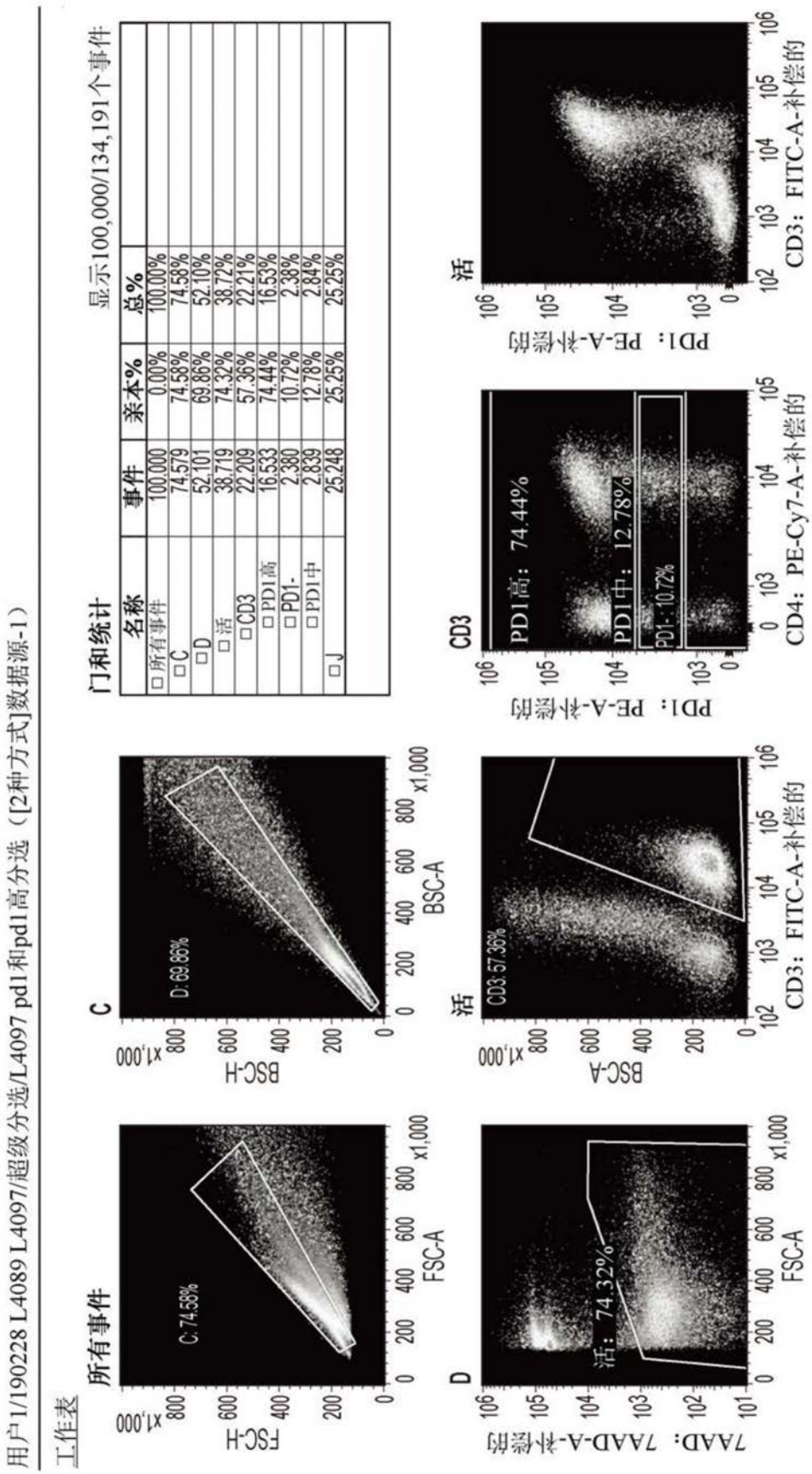

用户1/190228 L4089 L4097/超级分选/L4097 pd1和pd1高分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C
D
活
门和统计
显示100,000/134,191个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 74,579 74.58% 74.58%
D 52,101 69.86% 52.10%
活 38,719 74.32% 38.72%
CD3 22,209 57.36% 22.21%
PD1高 16,533 74.44% 16.53%
PD1- 2,380 10.72% 2.38%
PD1中 2,839 12.78% 2.84%
J 25,248 25.25% 25.25%
C:74.58%
D:69.86%
活：74.32%
CD3 57.36%
PD1高：74.44%
PD1中：12.78%
PD1- 10.72%
FSC-H
FSC-A
BSC-H
BSC-A
7AAD：7AAD-A-补偿的
PD1：PE-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
x1,000

图158N

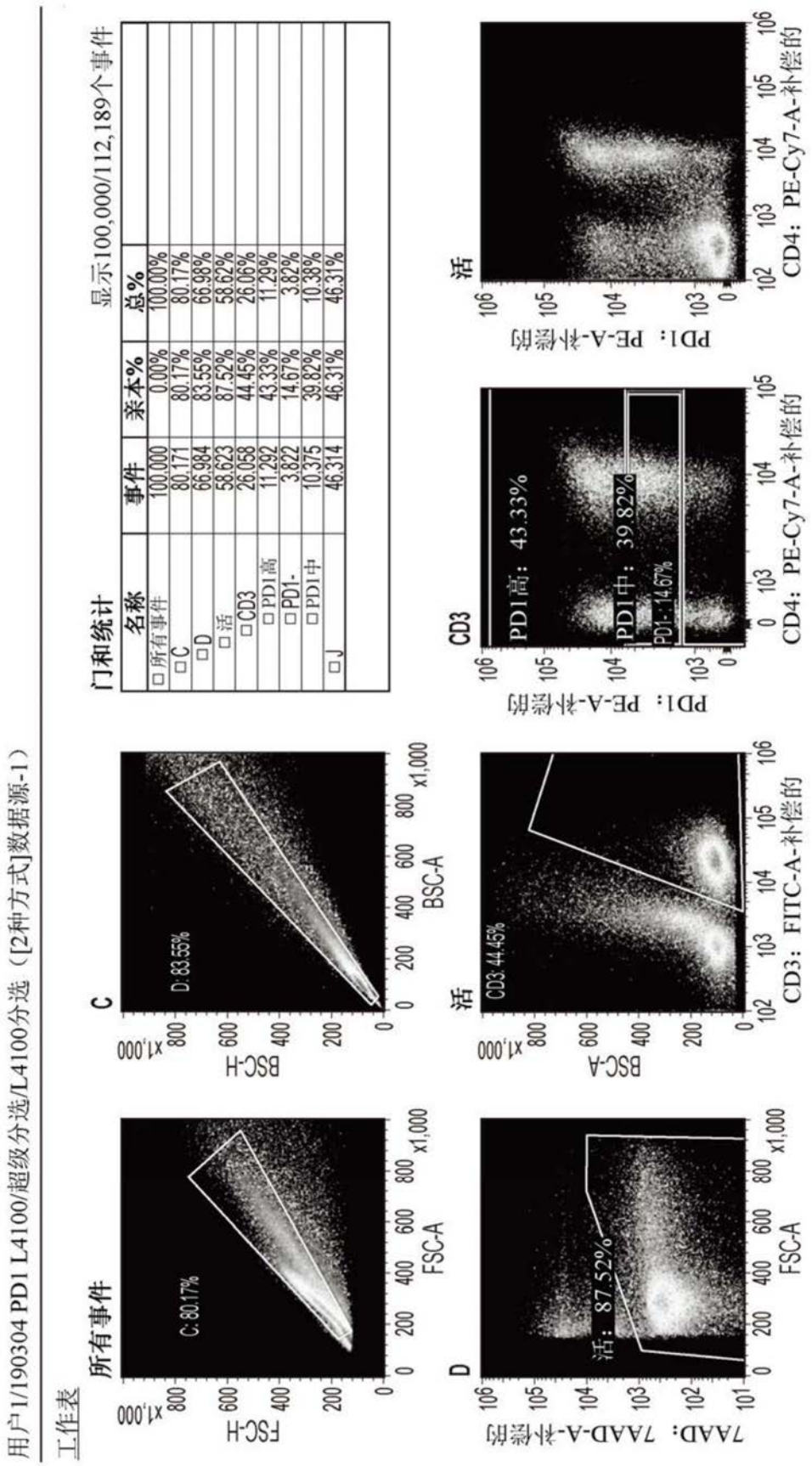

用户1/190304 PD1 L4100/超级分选/L4100分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 80.17%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 83.53%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/112,189个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100.000 0.00% 100.00%
C 80.171 80.17% 80.17%
D 66.984 83.55% 66.98%
活 58.623 87.52% 58.62%
CD3 26.058 44.45% 26.06%
PD1高 11.292 43.33% 11.29%
PD1- 3.822 14.67% 3.82%
PD1中 10.375 39.82% 10.38%
J 46.314 46.31% 46.31%
D
活: 87.52%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 44.45%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 43.33%
PD1中: 39.82%
PD1-: 14.67%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图1580

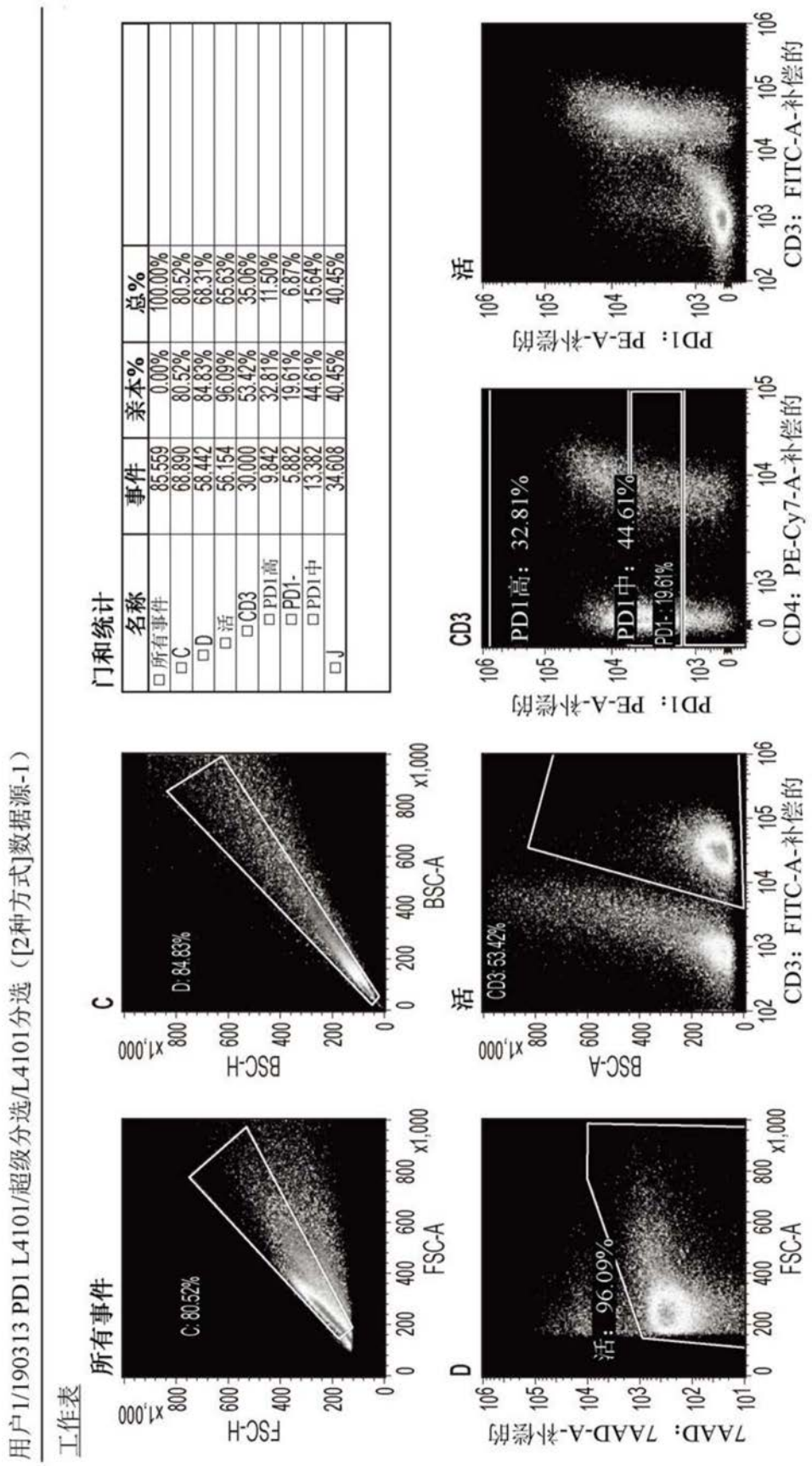

用户1/190313 PD1 L4101/超级分选/L4101分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 80.52%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 84.83%
BSC-H
BSC-A
门和统计
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 85,559 0.00% 100.00%
C 68,890 80.52% 80.52%
D 58,442 84.83% 68.31%
活 56,154 96.09% 65.63%
CD3 30,000 53.42% 35.06%
PD1高 9,842 32.81% 11.50%
PD1- 5,882 19.61% 6.87%
PD1中 13,382 44.61% 15.64%
J 34,608 40.45%
D
活：96.09%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
FSC-A
活
CD3: 53.42%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高：32.81%
PD1中：44.61%
PD1- 19.61%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158P

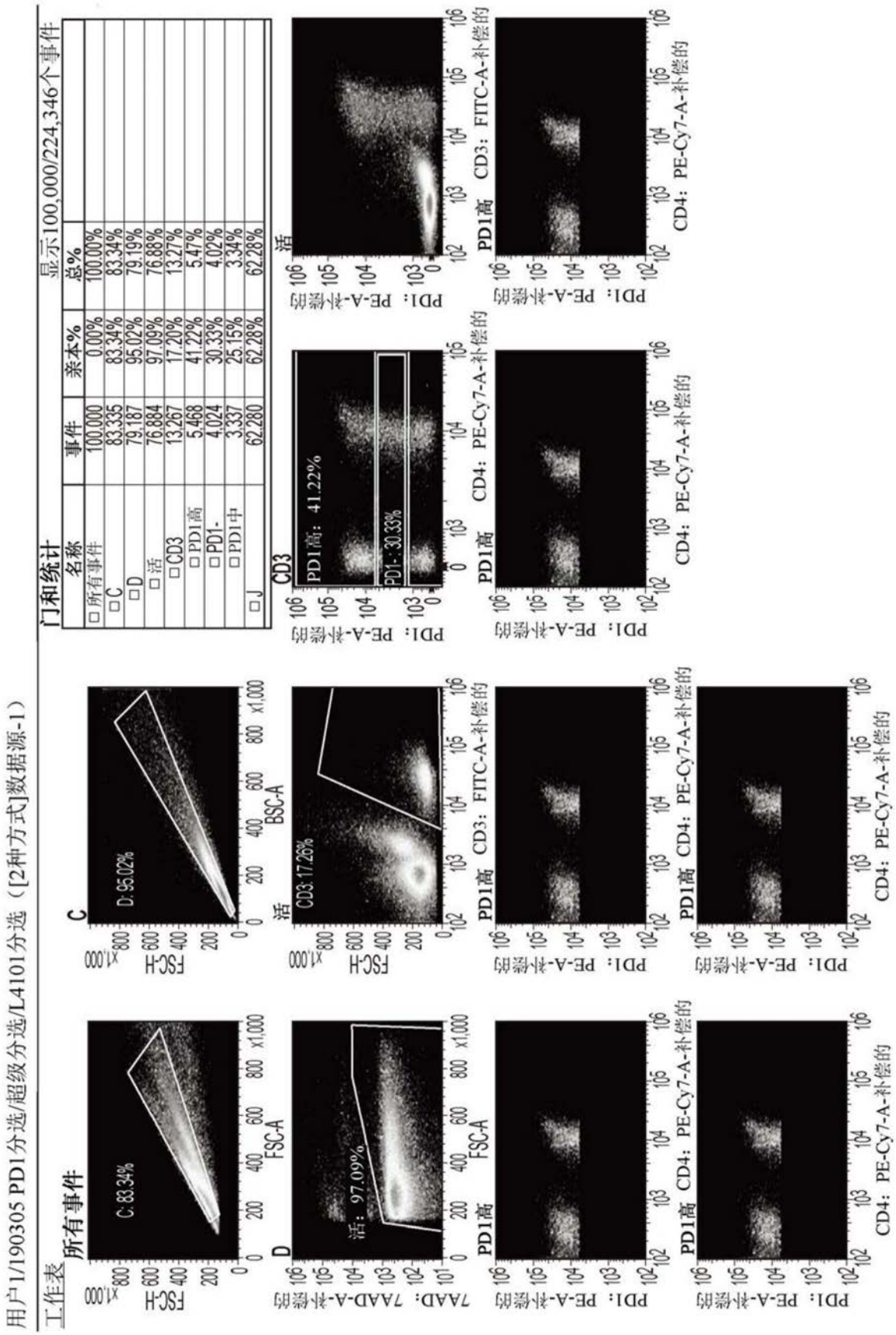

用户1/190305 PD1分选/超级分选/L4101分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 83.34%
D: 95.02%
活: 97.09%
CD3: 17.26%
PD1高: 41.22%
PD1-: 30.33%
FSC-H
FSC-A
BSC-A
7AAD: 7AAD-A-补偿的
PD1: PE-A-补偿的
PD1高 CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的
门和统计
显示100,000/224,346个事件
名称 事件 亲本% 总%
□所有事件 100,000 0.00% 100.00%
□C 83,335 83.34% 83.34%
□D 79,187 95.02% 79.19%
□活 76,884 97.09% 76.88%
□CD3 13,267 17.20% 13.27%
□PD1高 5,468 41.22% 5.47%
□PD1- 4,024 30.33% 4.02%
□PD1中 3,337 25.15% 3.34%
□J 62,280 62.28% 62.28%

图158Q

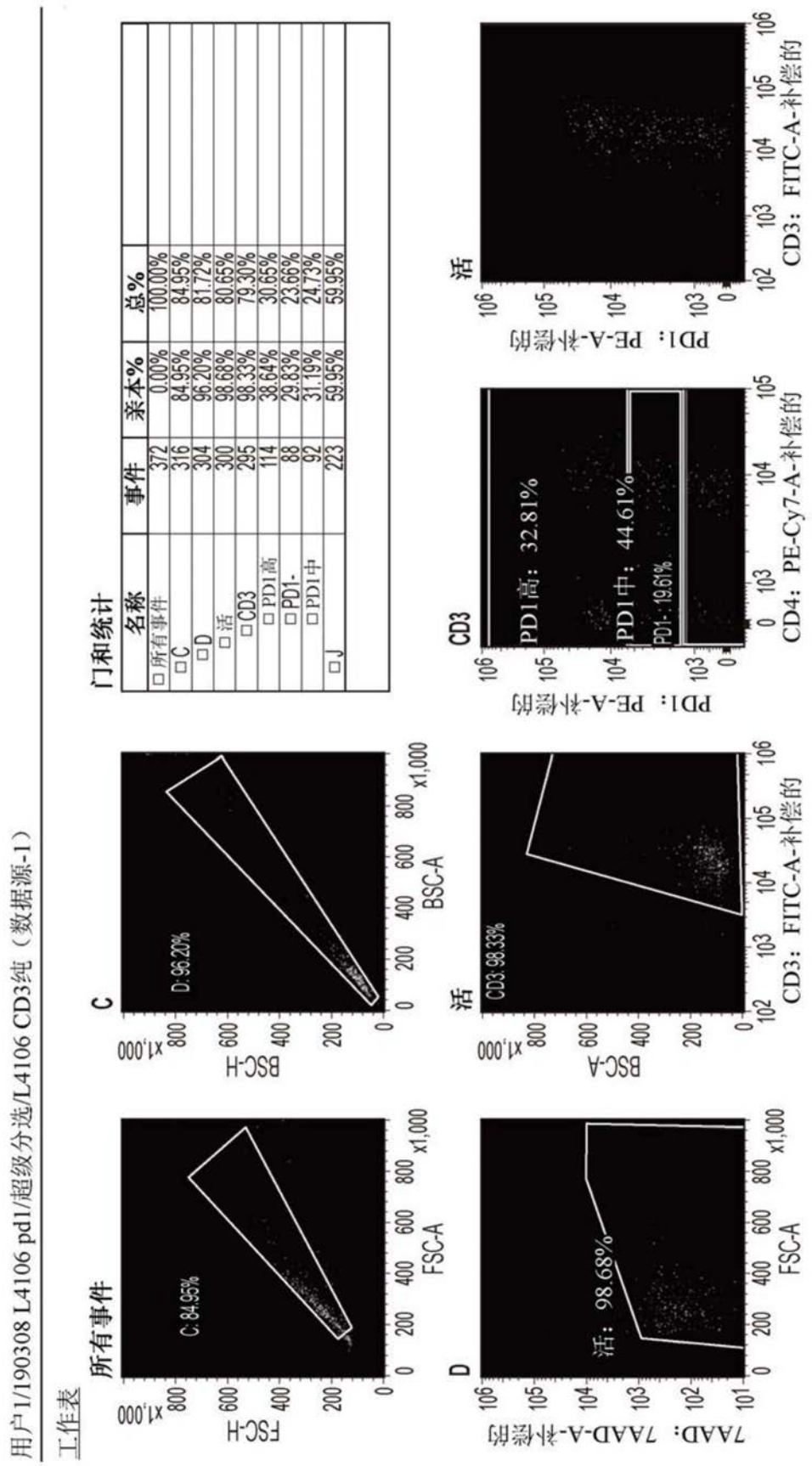

用户1/190308 L4106 pd1/超级分选/L4106 CD3纯（数据源-1）
工作表
门和统计
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 372 0.00% 100.00%
C 316 84.95% 84.95%
D 304 96.20% 81.72%
活 300 98.68% 80.65%
CD3 295 98.33% 79.30%
PD1高 114 38.64% 30.65%
PD1- 88 29.83% 23.66%
PD1中 92 31.19% 24.73%
J 223 59.95% 59.95%
所有事件
C: 84.95%
FSC-H
FSC-A
C
D: 96.20%
BSC-H
BSC-A
D
活: 98.68%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 98.33%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 32.81%
PD1中: 44.61%
PD1-: 19.61%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图158R

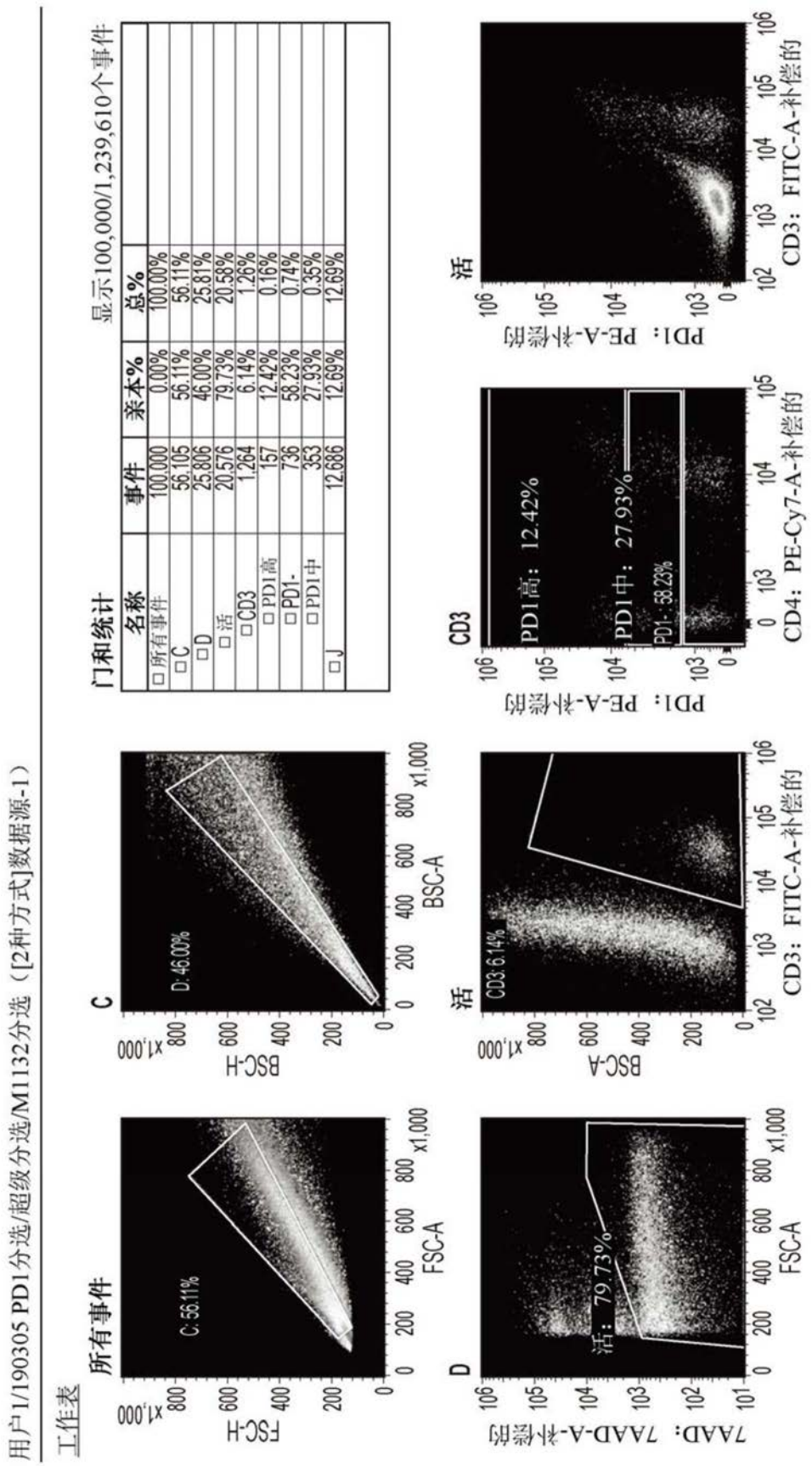

用户1/190305 PD1分选/超级分选/M1132分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/1,239,610个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 56,105 56.11% 56.11%
D 25,806 46.00% 25.81%
活 20,576 79.73% 20.58%
CD3 1,264 6.14% 1.26%
PD1高 157 12.42% 0.16%
PD1- 736 58.23% 0.74%
PD1中 353 27.93% 0.35%
J 12,686 12.69% 12.69%
所有事件
C: 56.11%
FSC-H
FSC-A
C
D: 46.00%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 6.14%
CD3: FITC-A-补偿的
D
活: 79.73%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 12.42%
PD1中: 27.93%
PD1-: 58.23%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158S

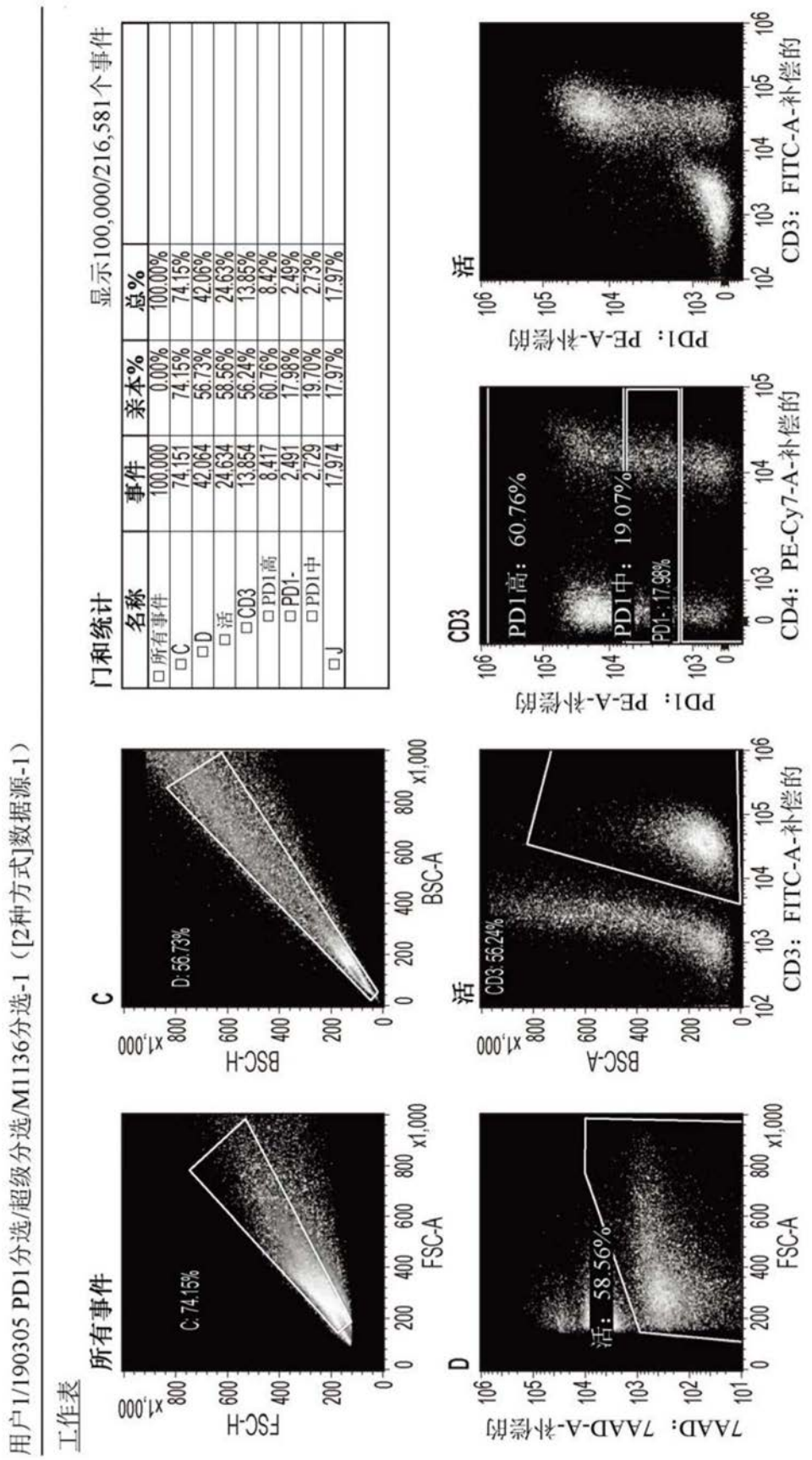

用户1/190305 PD1分选/超级分选/M1136分选-1（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/216,581个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 74,151 74.15% 74.15%
D 42,064 56.73% 42.06%
活 24,634 58.56% 24.63%
CD3 13,854 56.24% 13.85%
PD1高 8,417 60.76% 8.42%
PD1- 2,491 17.98% 2.49%
PD1中 2,729 19.70% 2.73%
J 17,974 17.97% 17.97%
所有事件
C: 74.15%
FSC-H
FSC-A
C
D: 56.73%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 56.24%
D
活: 58.56%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 60.76%
PD1中: 19.07%
PD1-: 17.98%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158T

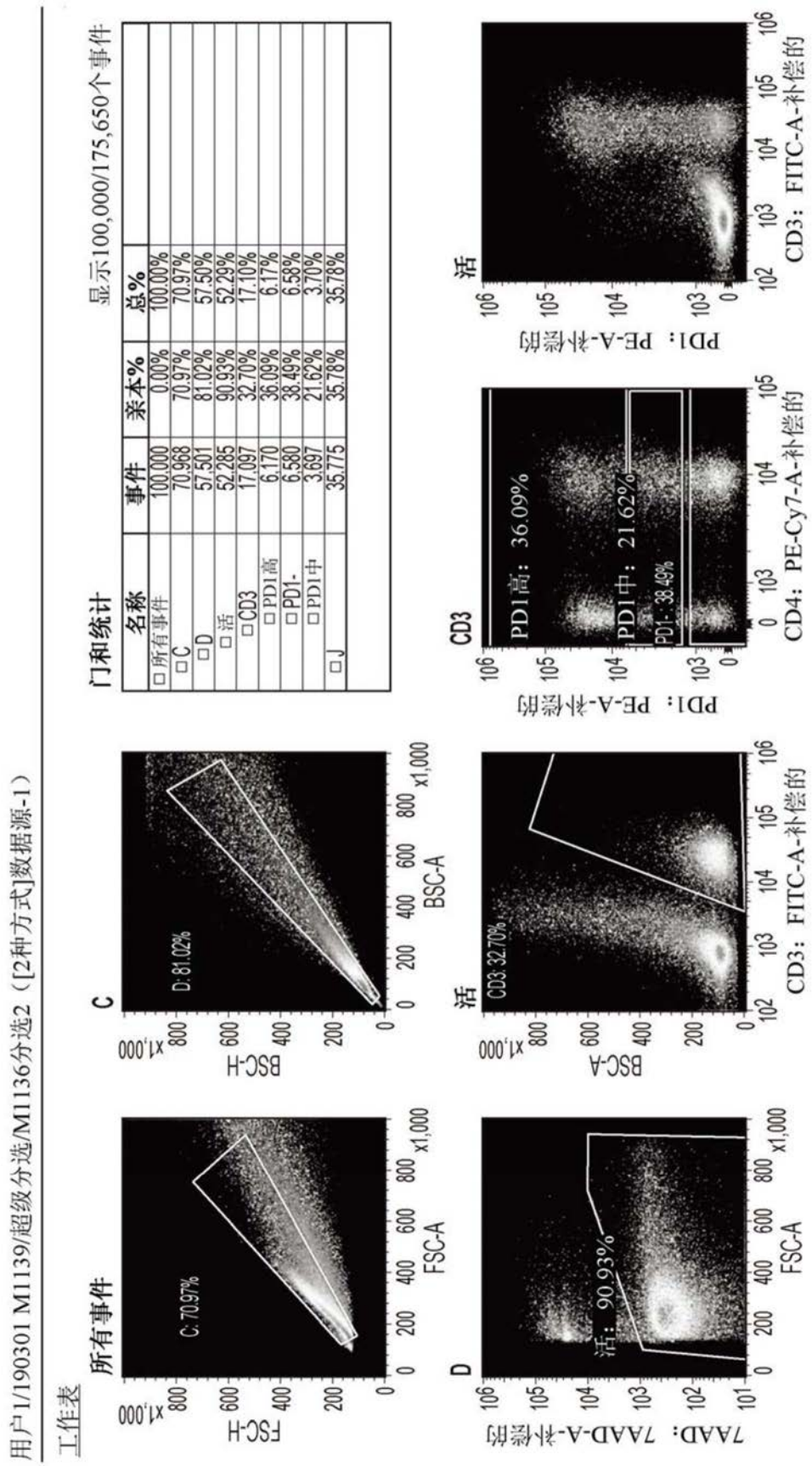

用户1/190301 M1139/超级分选/M1136分选2（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 70.97%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 81.02%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/175,650个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 70,968 70.97% 70.97%
D 57,501 81.02% 57.50%
活 52,285 90.93% 52.29%
CD3 17,097 32.70% 17.10%
PD1高 6,170 36.09% 6.17%
PD1- 6,580 38.49% 6.58%
PD1中 3,697 21.62% 3.70%
J 35,775 35.78% 35.78%
D
活：90.93%
7AAD：7AAD-A-补偿的
活
CD3: 32.70%
CD3：FITC-A-补偿的
CD3
PD1高：36.09%
PD1中：21.62%
PD1-：38.49%
PD1：PE-A-补偿的
CD4：PE-Cy7-A-补偿的
活
CD3：FITC-A-补偿的

图158U

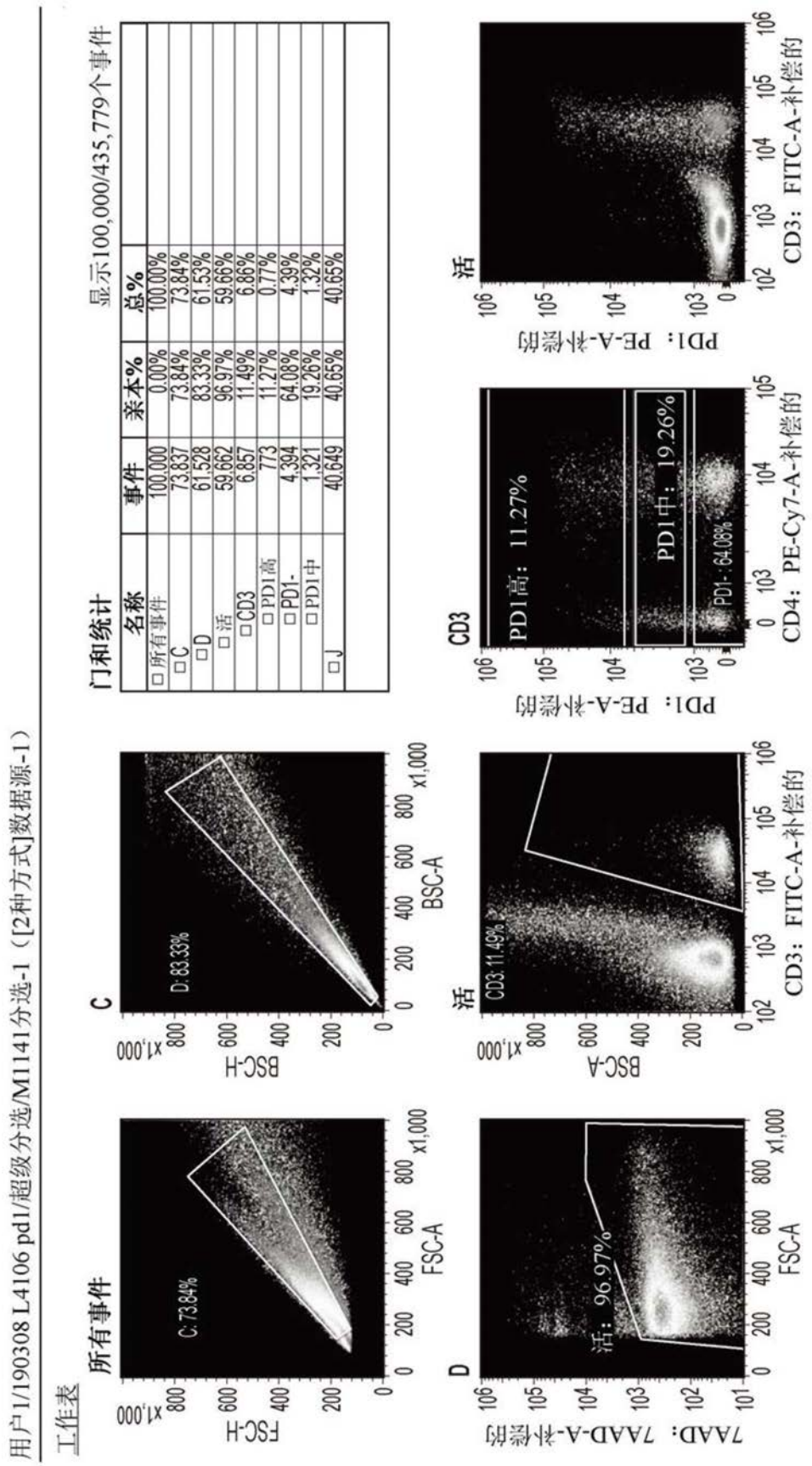

用户1/190308 L4106 pd1/超级分选/M1141分选-1（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/435,779个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 73,837 73.84% 73.84%
D 61,528 83.33% 61.53%
活 59,662 96.97% 59.66%
CD3 6,857 11.49% 6.86%
PD1高 773 11.27% 0.77%
PD1- 4,394 64.08% 4.39%
PD1中 1,321 19.26% 1.32%
J 40,649 40.65% 40.65%
所有事件
C: 73.84%
FSC-H
FSC-A
C
D: 83.33%
BSC-H
BSC-A
D
活: 96.97%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 11.49%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 11.27%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
PD1中: 19.26%
PD1- 64.08%

图158V

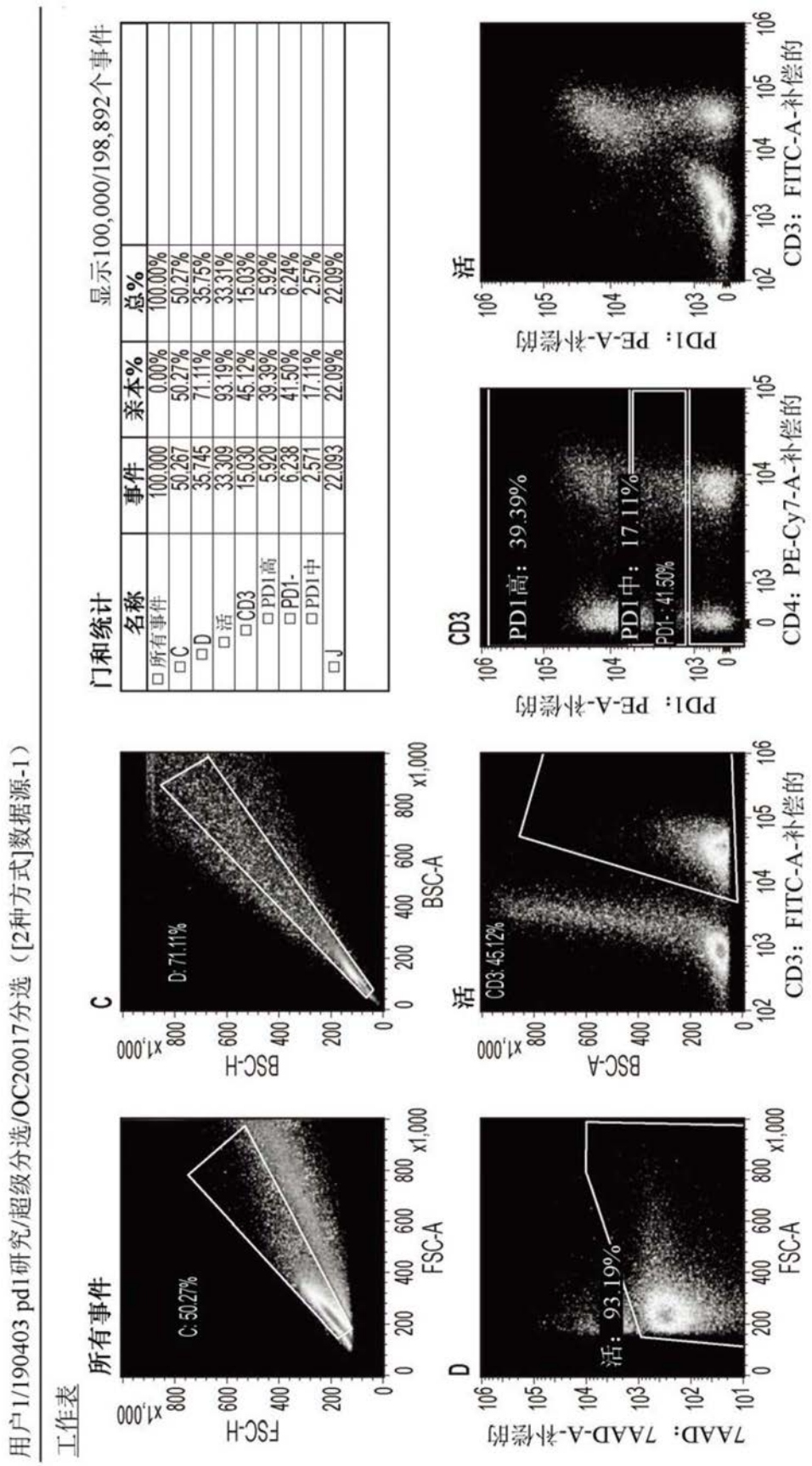

用户1/190403 pd1研究/超级分选/OC20017分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C
D
活
CD3
门和统计
显示100,000/198,892个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 50,267 50.27% 50.27%
D 35,745 71.11% 35.75%
活 33,309 93.19% 33.31%
CD3 15,030 45.12% 15.03%
PD1高 5,920 39.39% 5.92%
PD1- 6,238 41.50% 6.24%
PD1中 2,571 17.11% 2.57%
J 22,093 22.09% 22.09%
C: 50.27%
D: 71.11%
活: 93.19%
CD3: 45.12%
PD1高: 39.39%
PD1中: 17.11%
PD1-: 41.50%
FSC-H
FSC-A
BSC-H
BSC-A
7AAD: 7AAD-A-补偿的
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
x1,000

图158W

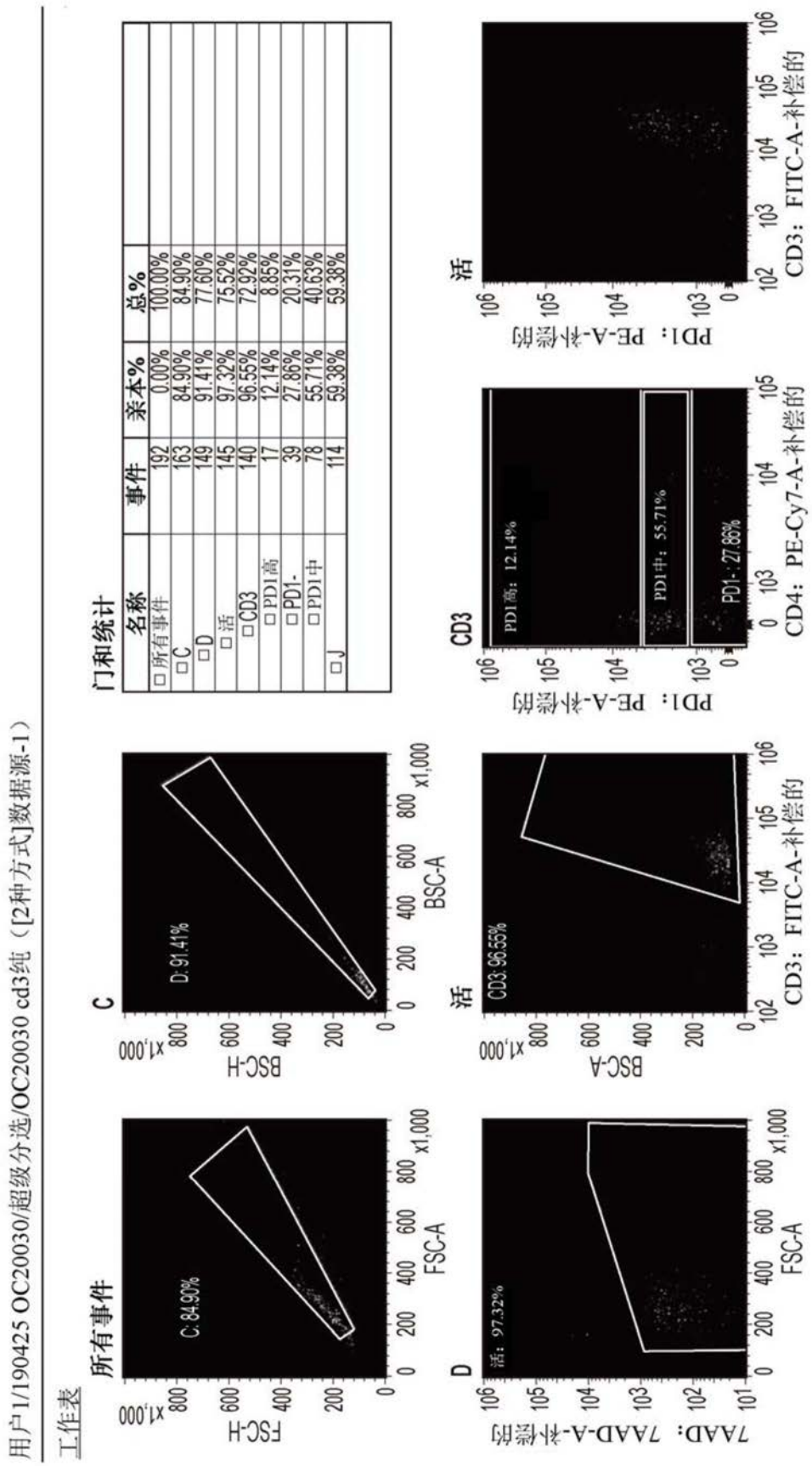

用户1/190425 OC20030/超级分选/OC20030 cd3纯（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 84.90%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 91.41%
BSC-H
BSC-A
门和统计
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 192 0.00% 100.00%
C 163 84.90% 84.90%
D 149 91.41% 77.60%
活 145 97.32% 75.52%
CD3 140 96.55% 72.92%
PD1高 17 12.14% 8.85%
PD1- 39 27.86% 20.31%
PD1中 78 55.71% 40.63%
J 114 59.38% 59.38%
D
活: 97.32%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
FSC-A
活
CD3: 96.55%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 12.14%
PD1中: 55.71%
PD1-: 27.86%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158X

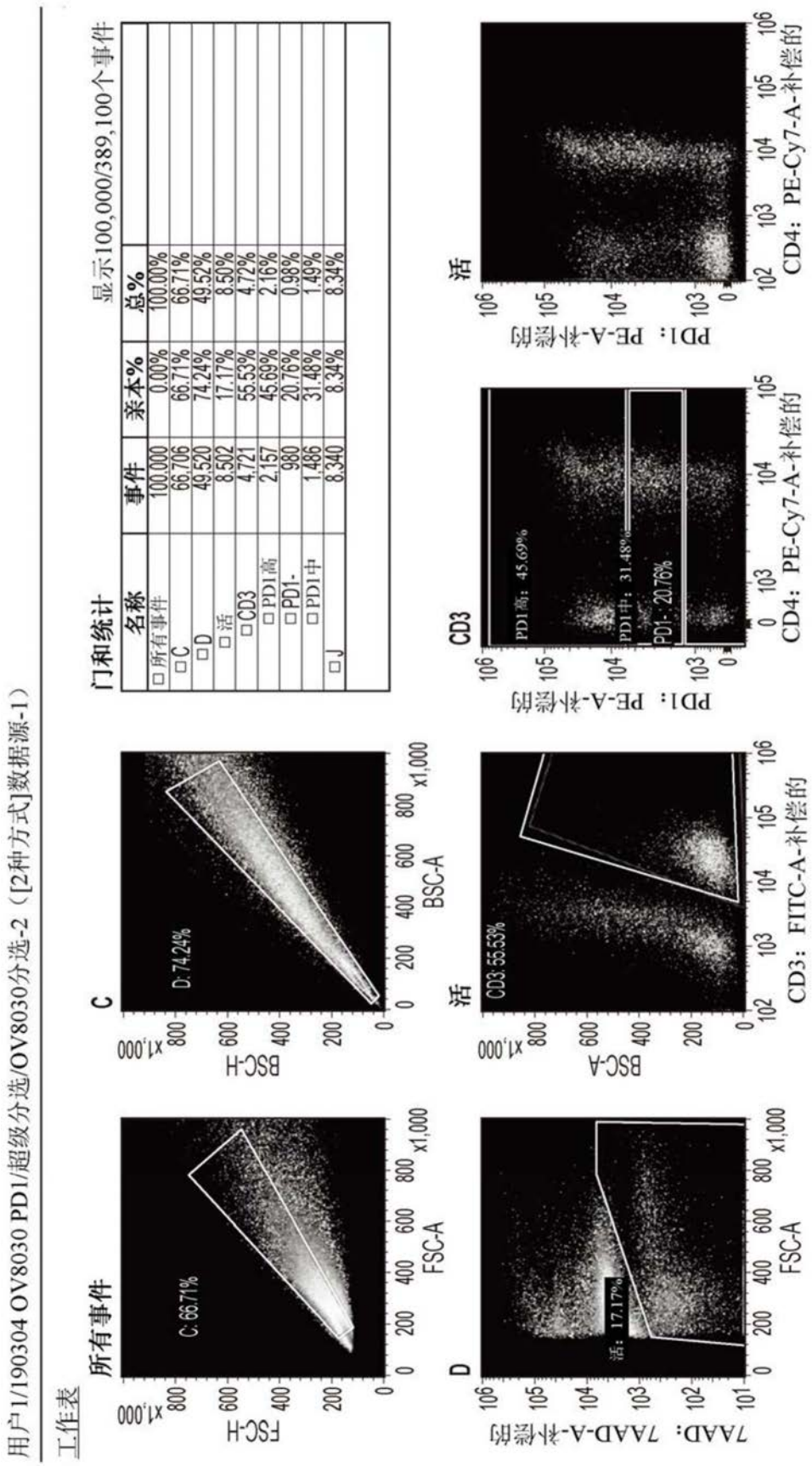

用户1/190304 OV8030 PD1/超级分选/OV8030分选-2（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 66.71%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 74.24%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/389,100个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 66,706 66.71% 66.71%
D 49,520 74.24% 49.52%
活 8,502 17.17% 8.50%
CD3 4,721 55.53% 4.72%
PD1高 2,157 45.69% 2.16%
PD1- 980 20.76% 0.98%
PD1中 1,486 31.48% 1.49%
J 8,340 8.34% 8.34%
D
活: 17.17%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 55.53%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 45.69%
PD1中: 31.48%
PD1-: 20.76%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图158Y

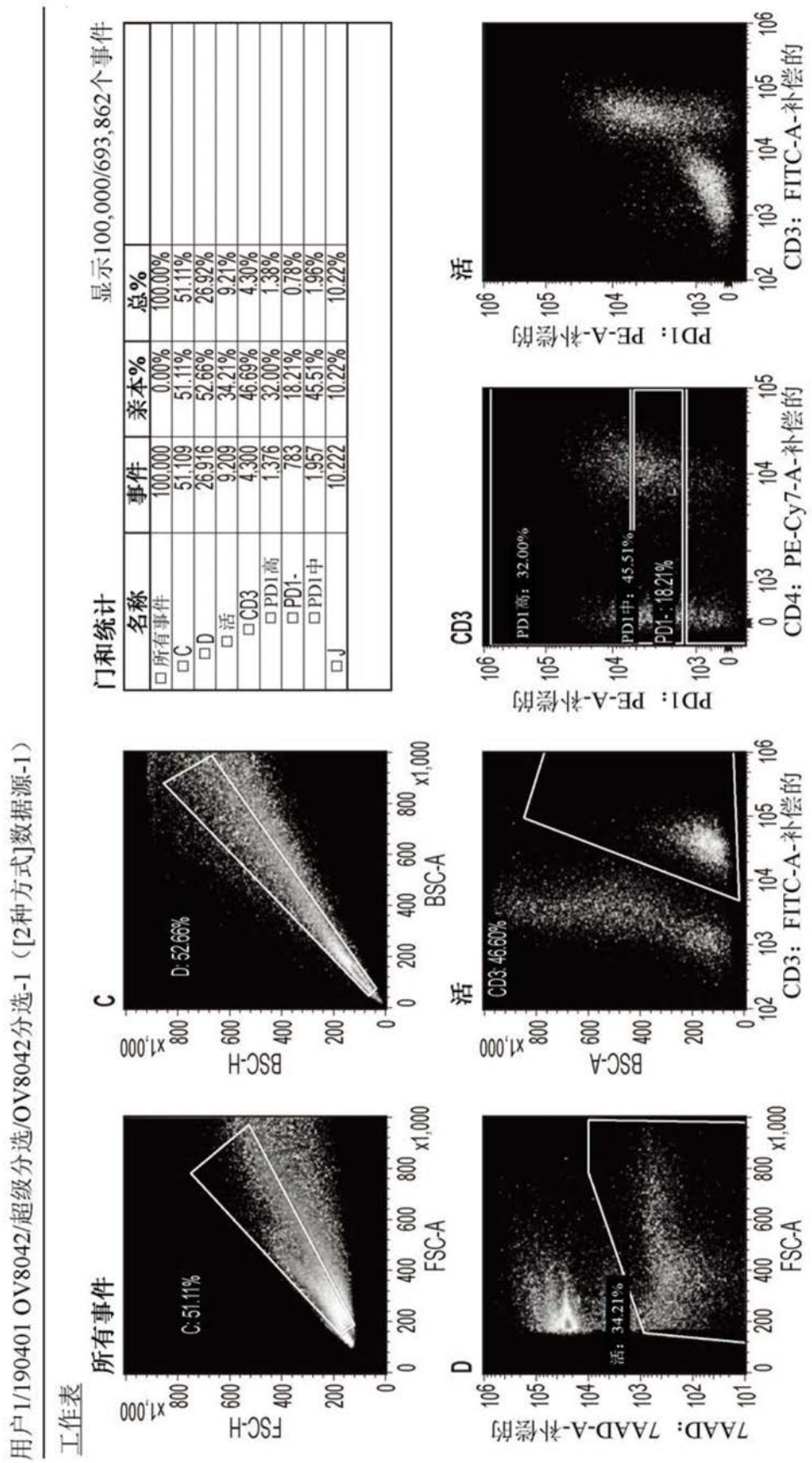

用户1/190401 OV8042/超级分选/OV8042分选-1（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 51.11%
FSC-H
FSC-A
C
D: 52.66%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/693,862个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 51,109 51.11% 51.11%
D 26,916 52.66% 26.92%
活 9,209 34.21% 9.21%
CD3 4,300 46.69% 4.30%
PD1高 1,376 32.00% 1.38%
PD1- 783 18.21% 0.78%
PD1中 1,957 45.51% 1.96%
J 10,222 10.22% 10.22%
D
活: 34.21%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
FSC-A
活
CD3: 46.60%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 32.00%
PD1中: 45.51%
PD1-: 18.21%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
PD1: PE-A-补偿的
CD3: FITC-A-补偿的

图158Z

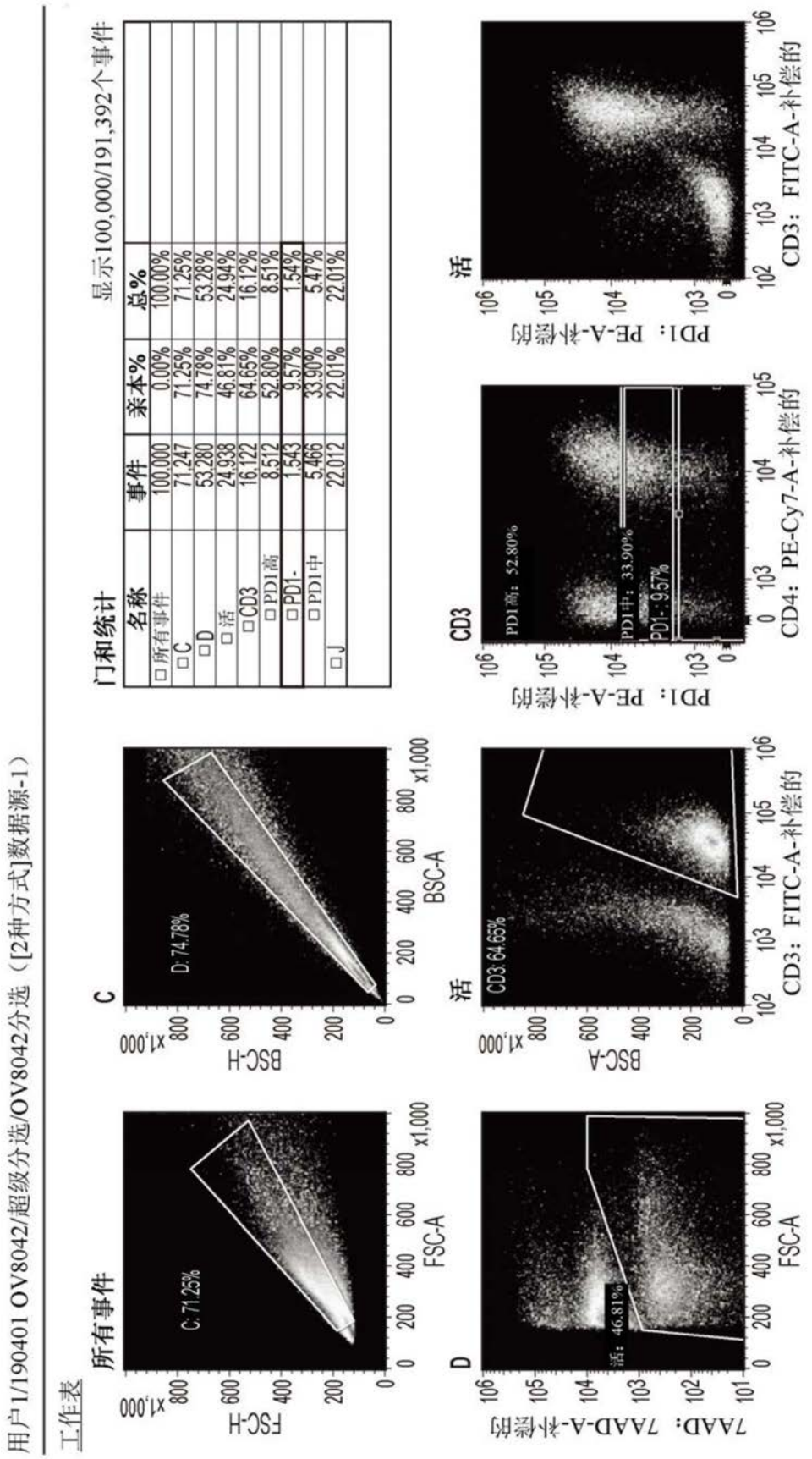

用户1/190401 OV8042/超级分选/OV8042分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/191,392个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100.000 0.00% 100.00%
C 71.247 71.25% 71.25%
D 53.280 74.78% 53.28%
活 24.938 46.81% 24.94%
CD3 16.122 64.65% 16.12%
PD1高 8.512 52.80% 8.51%
PD1- 1.543 9.57% 1.54%
PD1中 5.466 33.90% 5.47%
J 22.012 22.01% 22.01%
所有事件
C: 71.25%
FSC-H
FSC-A
C
D: 74.78%
BSC-H
BSC-A
活
CD3: 64.65%
CD3: FITC-A-补偿的
D
活: 46.81%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
CD3
PD1高: 52.80%
PD1中: 33.90%
PD1-: 9.57%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
CD3: FITC-A-补偿的

图158AA

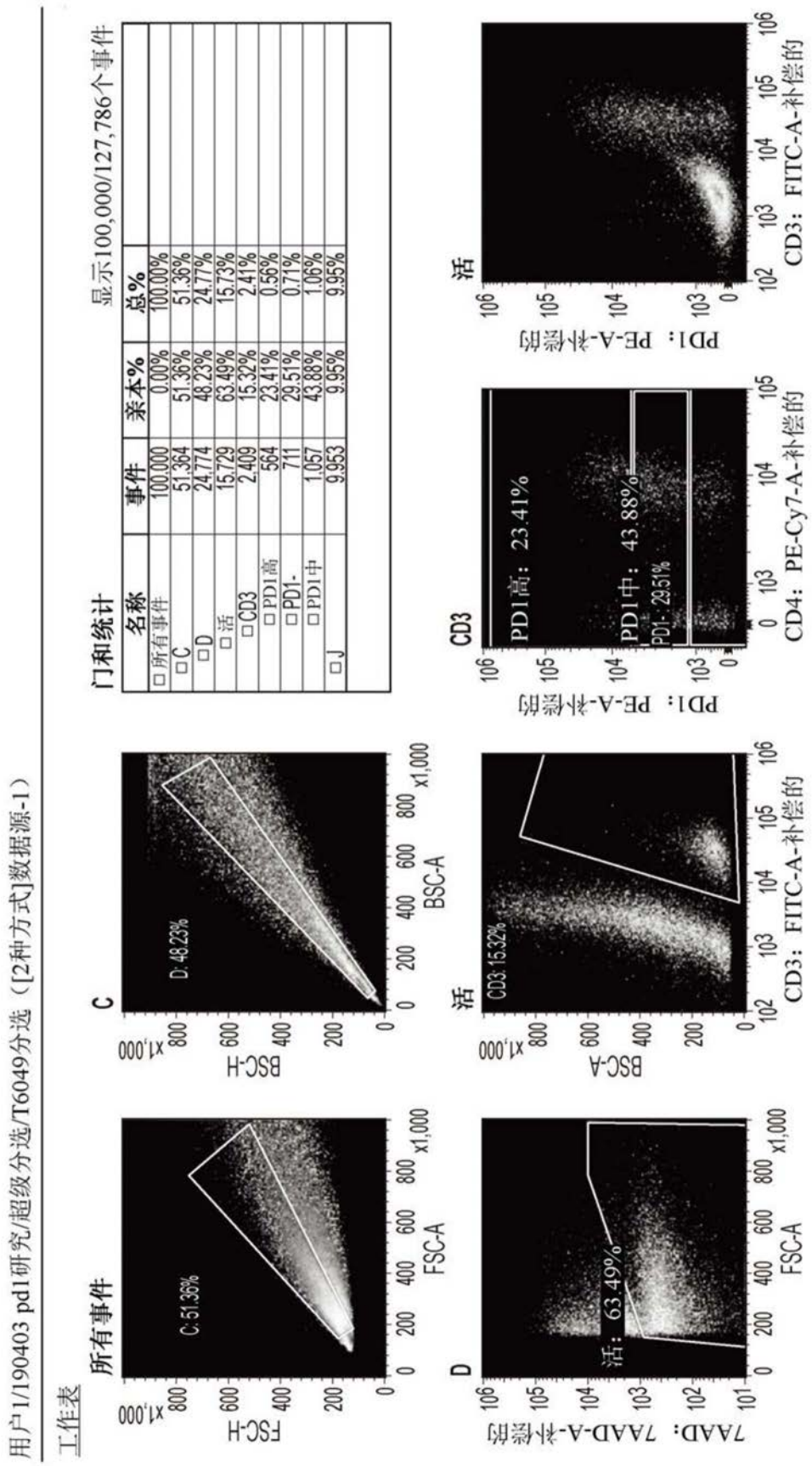

用户1/190403 pd1研究/超级分选/T6049分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 51.36%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 48.23%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/127,786个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 51,364 51.36% 51.36%
D 24,774 48.23% 24.77%
活 15,729 63.49% 15.73%
CD3 2,409 15.32% 2.41%
PD1高 564 23.41% 0.56%
PD1- 711 29.51% 0.71%
PD1中 1,057 43.88% 1.06%
J 9,953 9.95% 9.95%
D
活: 63.49%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 15.32%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 23.41%
PD1中: 43.88%
PD1-: 29.51%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图158BB

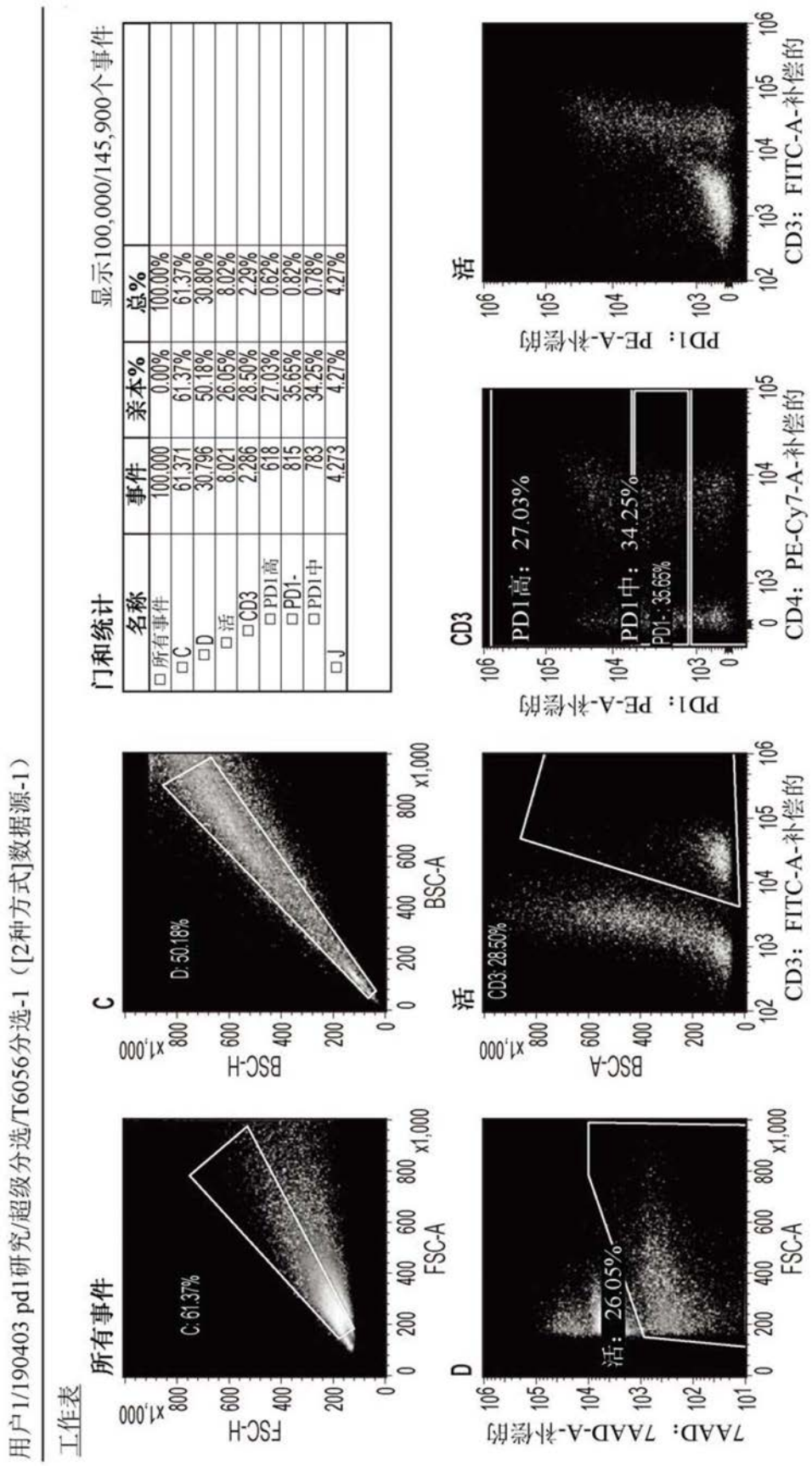

用户1/190403 pd1研究/超级分选/T6056分选-1（[2种方式]数据源-1）
工作表
门和统计
显示100,000/145,900个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 61,371 61.37% 61.37%
D 30,796 50.18% 30.80%
活 8,021 26.05% 8.02%
CD3 2,286 28.50% 2.29%
PD1高 618 27.03% 0.62%
PD1- 815 35.65% 0.82%
PD1中 783 34.25% 0.78%
J 4,273 4.27%
所有事件
C: 61.37%
FSC-H
FSC-A
C
D: 50.18%
BSC-H
BSC-A
D
活: 26.05%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 28.50%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 27.03%
PD1中: 34.25%
PD1-: 35.65%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的

图158CC

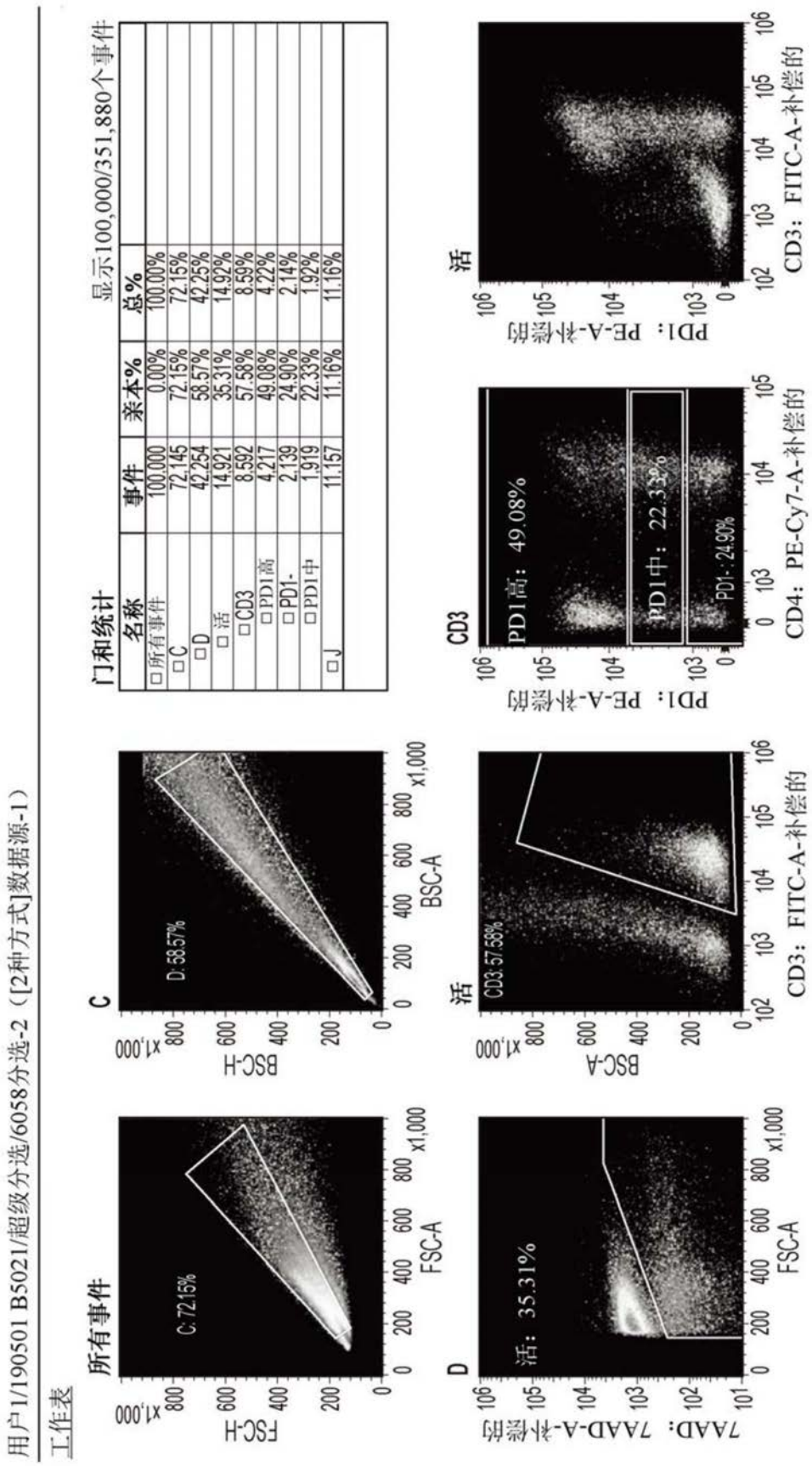

用户1/190501 B5021/超级分选/6058分选-2（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 72.15%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 58.57%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/351,880个事件
名称 事件 亲本% 总%
□所有事件 100,000 0.00% 100.00%
□C 72,145 72.15% 72.15%
□D 42,254 58.57% 42.25%
□活 14,921 35.31% 14.92%
□CD3 8,592 57.58% 8.59%
□PD1高 4,217 49.08% 4.22%
□PD1- 2,139 24.90% 2.14%
□PD1中 1,919 22.33% 1.92%
□J 11,157 11.16% 11.16%
D
活: 35.31%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 57.58%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 49.08%
PD1中: 22.33%
PD1-: 24.90%
PD1: PE-A-补偿的
CD4: PE-Cy7-A-补偿的
活
CD3: FITC-A-补偿的

图158DD

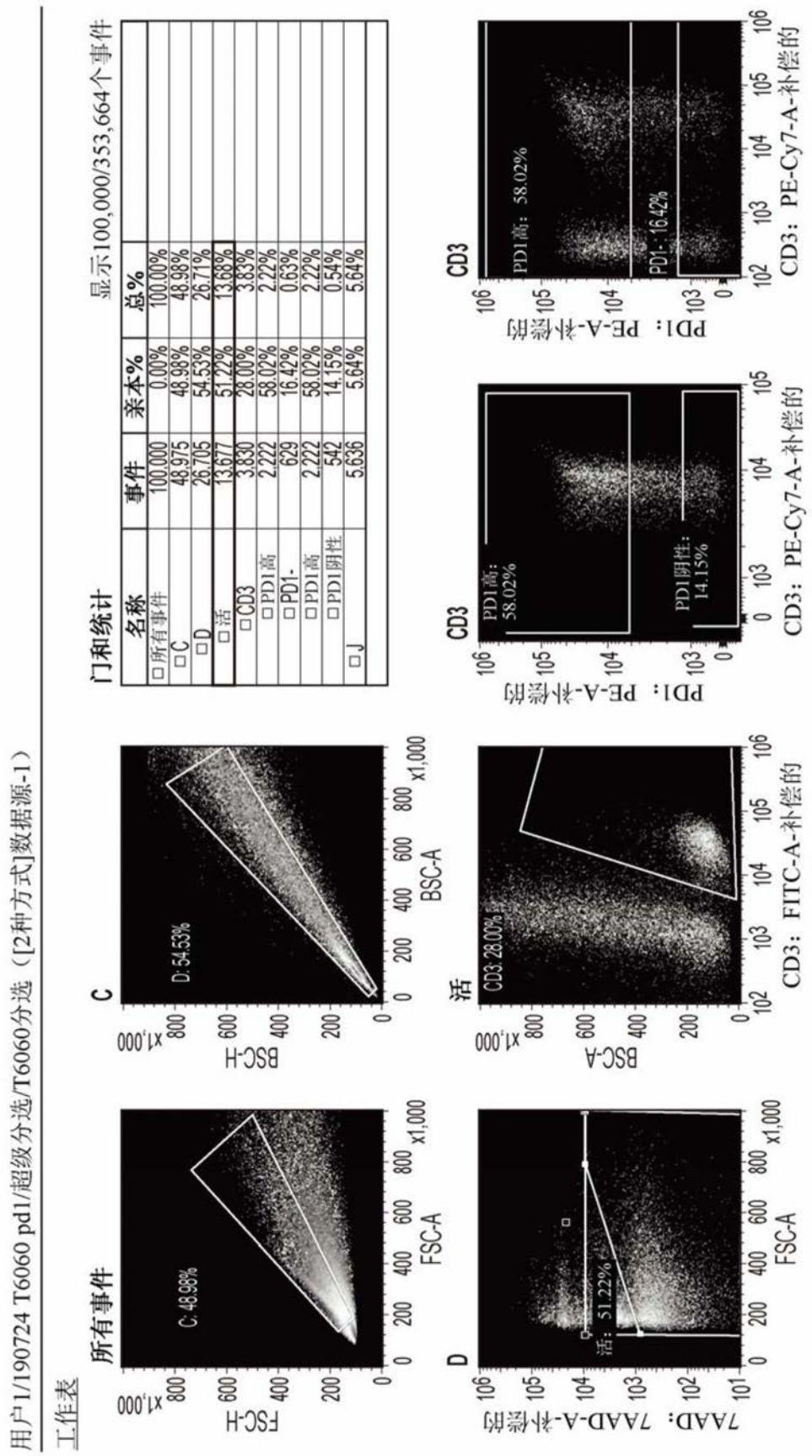

用户1/190724 T6060 pd1/超级分选/T6060分选（[2种方式]数据源-1）
工作表
所有事件
C: 48.98%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 54.53%
BSC-H
BSC-A
门和统计
显示100,000/353,664个事件
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 100,000 0.00% 100.00%
C 48,975 48.98% 48.98%
D 26,705 54.53% 26.71%
活 13,677 51.22% 13.68%
CD3 3,830 28.00% 3.83%
PD1高 2,222 58.02% 2.22%
PD1- 629 16.42% 0.63%
PD1高 2,222 58.02% 2.22%
PD1阴性 542 14.15% 0.54%
J 5,636 5.64% 5.64%
D
活: 51.22%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 28.00%
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 58.02%
PD1阴性: 14.15%
PD1: PE-A-补偿的
CD3: PE-Cy7-A-补偿的
PD1高: 58.02%
PD1-: 16.42%

图158EE

	FSC单细胞/SSC单细胞/活/CD3|亲本频率	FSC单细胞/SSC单细胞/活/CD3/PD1高|亲本频率
B3 CC10026.fcs	15.4%	32.5%
B4 CC10027.fcs	16.8%	31.6%
B5 PD-1 FMO.fcs	34.4%	0%
B6 PBMC.fcs	16.9%	4.52%
平均值	20.9%	17.2%
SD	9.04%	17.3%

图158FF

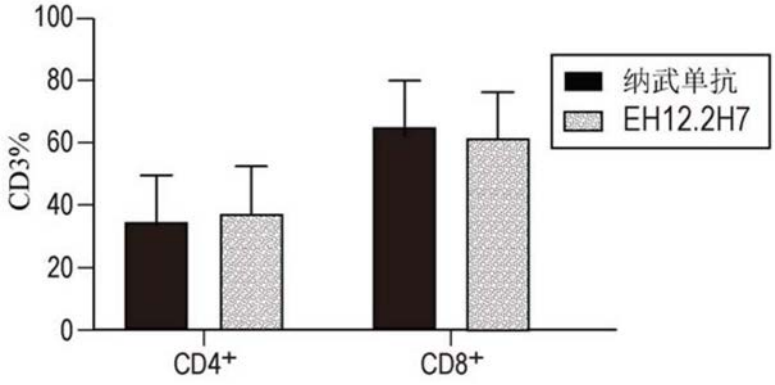


图159

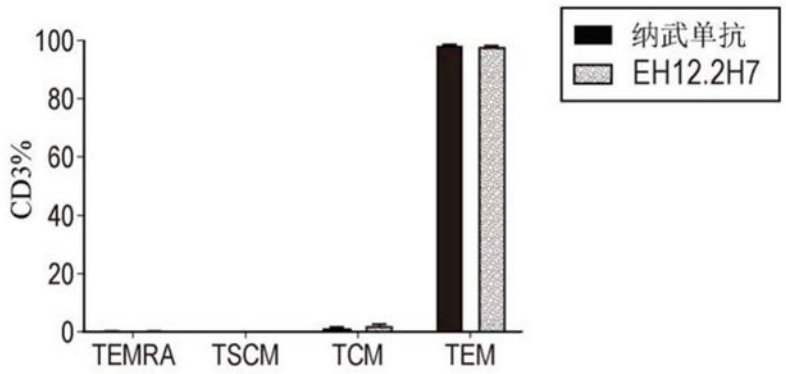

100
80
60
40
20
0
CD3%
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
纳武单抗
EH12.2H7

图160

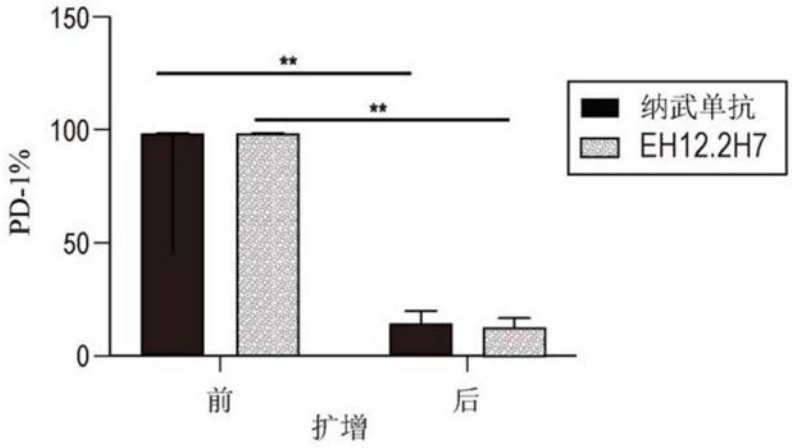

150
100
50
0
PD-1%
**
**
前
后
扩增
纳武单抗
EH12.2H7

图161A

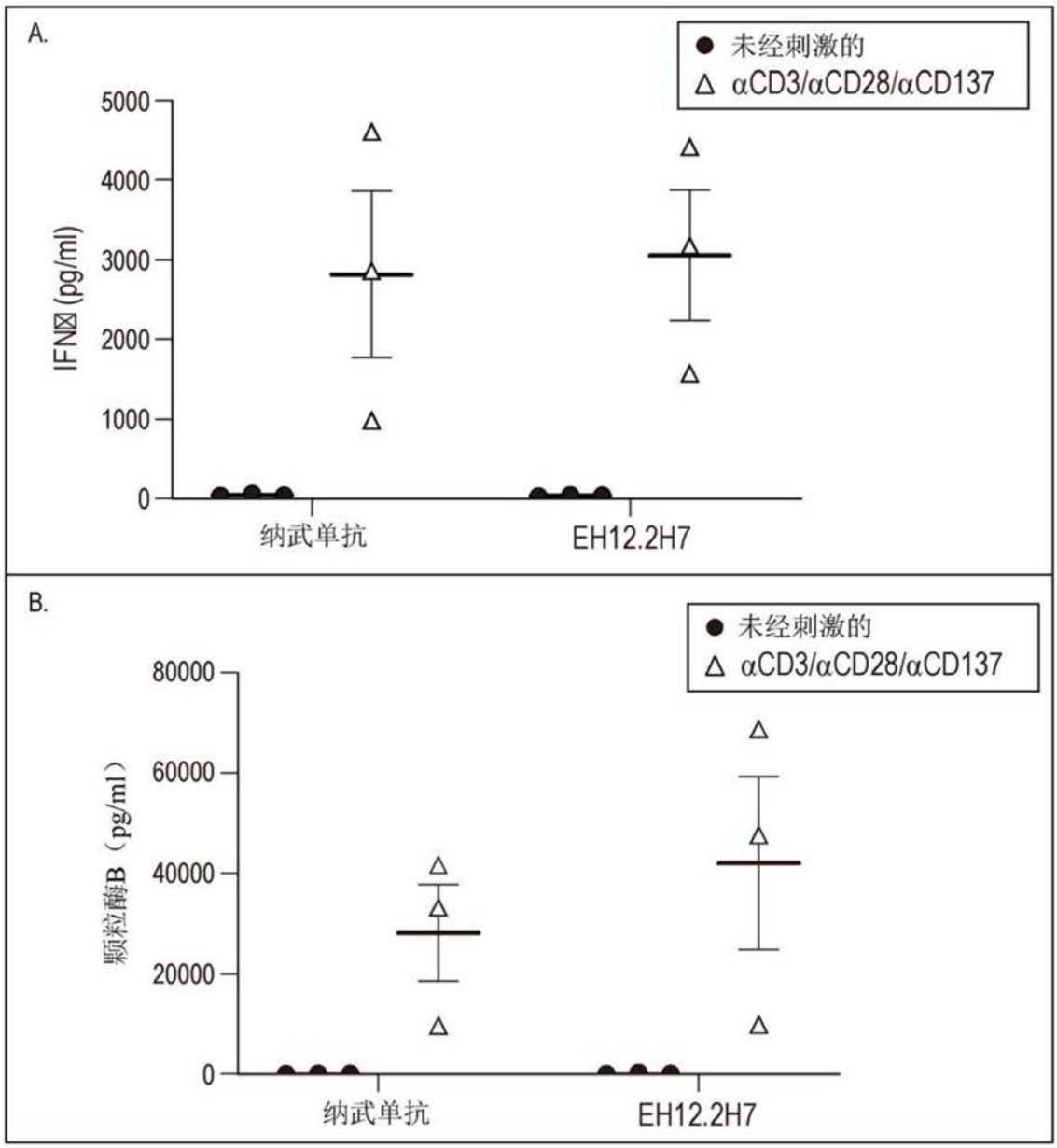

A.
未经刺激的
αCD3/αCD28/αCD137
IFN⊠ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
纳武单抗
EH12.2H7
B.
未经刺激的
αCD3/αCD28/αCD137
颗粒酶B（pg/ml）
80000
60000
40000
20000
0
纳武单抗
EH12.2H7

图161B

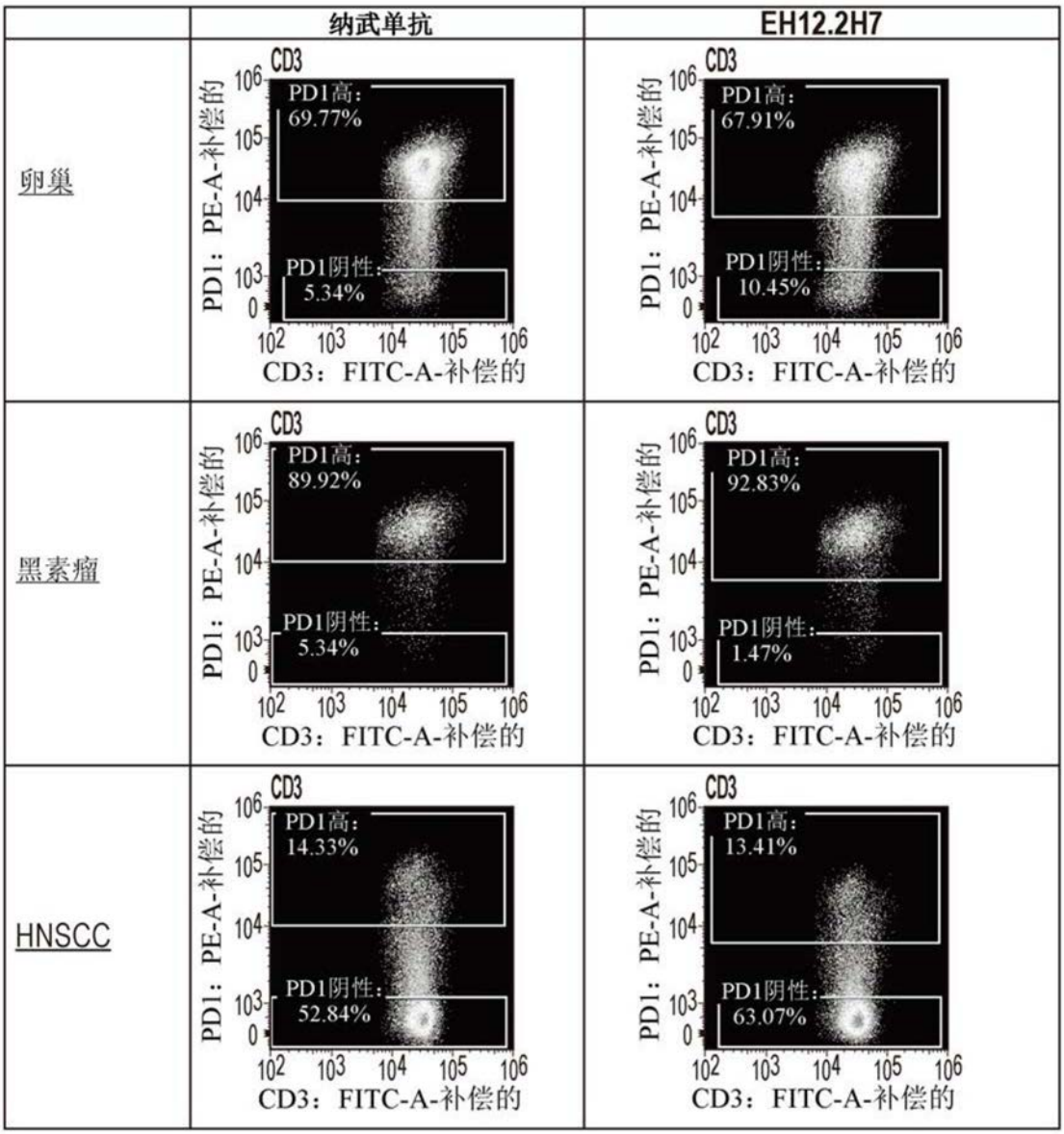

纳武单抗
EH12.2H7
卵巢
黑素瘤
HNSCC
CD3
PD1高：69.77%
PD1阴性：5.34%
PD1高：67.91%
PD1阴性：10.45%
PD1高：89.92%
PD1阴性：5.34%
PD1高：92.83%
PD1阴性：1.47%
PD1高：14.33%
PD1阴性：52.84%
PD1高：13.41%
PD1阴性：63.07%
PD1：PE-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的

图162

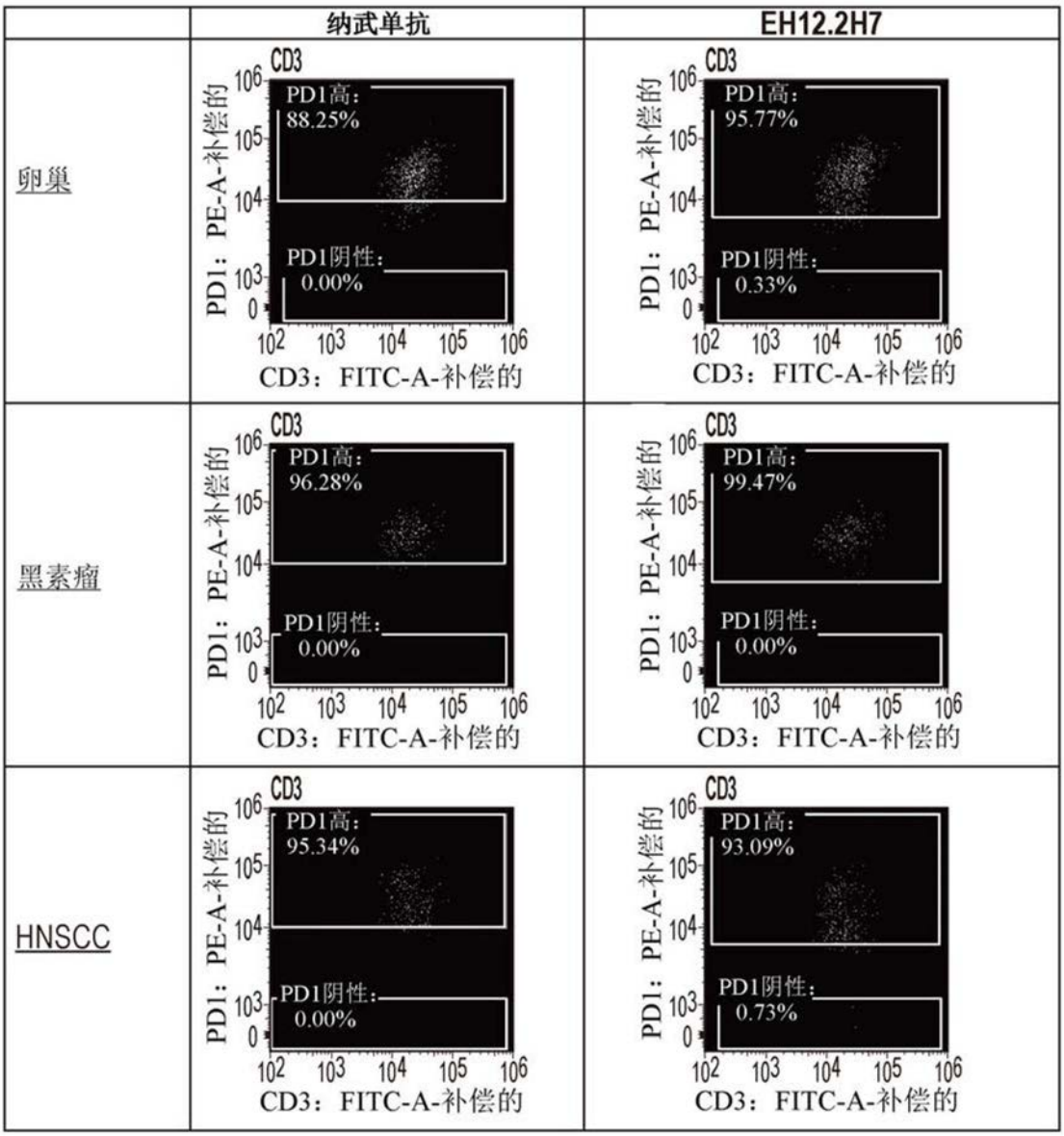

纳武单抗
EH12.2H7
卵巢
黑素瘤
HNSCC
CD3
PD1高：88.25%
PD1阴性：0.00%
PD1高：95.77%
PD1阴性：0.33%
PD1高：96.28%
PD1阴性：0.00%
PD1高：99.47%
PD1阴性：0.00%
PD1高：95.34%
PD1阴性：0.00%
PD1高：93.09%
PD1阴性：0.73%
PD1：PE-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的

图163

样品名称	细胞计数和活力															
	体积（ml）	计数1		计数2			计数1和2是否处于平均值的10%之内？	计数3		计数4		计数3和4是否处于平均值的10%之内？	平均数		总活细胞
		活细胞/毫升	活力%	活细胞/毫升	活力%			活细胞/毫升	活力%	活细胞/毫升	活力%		活细胞/毫升	活力%	
纳武单抗稳定性120小时基线 vol 30 C1	30	4.75E+07	90.9	5.40E+07	89.8		是	5.56E+07	91.40	5.71E+07	91.40	是	5.36E+07	90.88	1.61E+09

图164

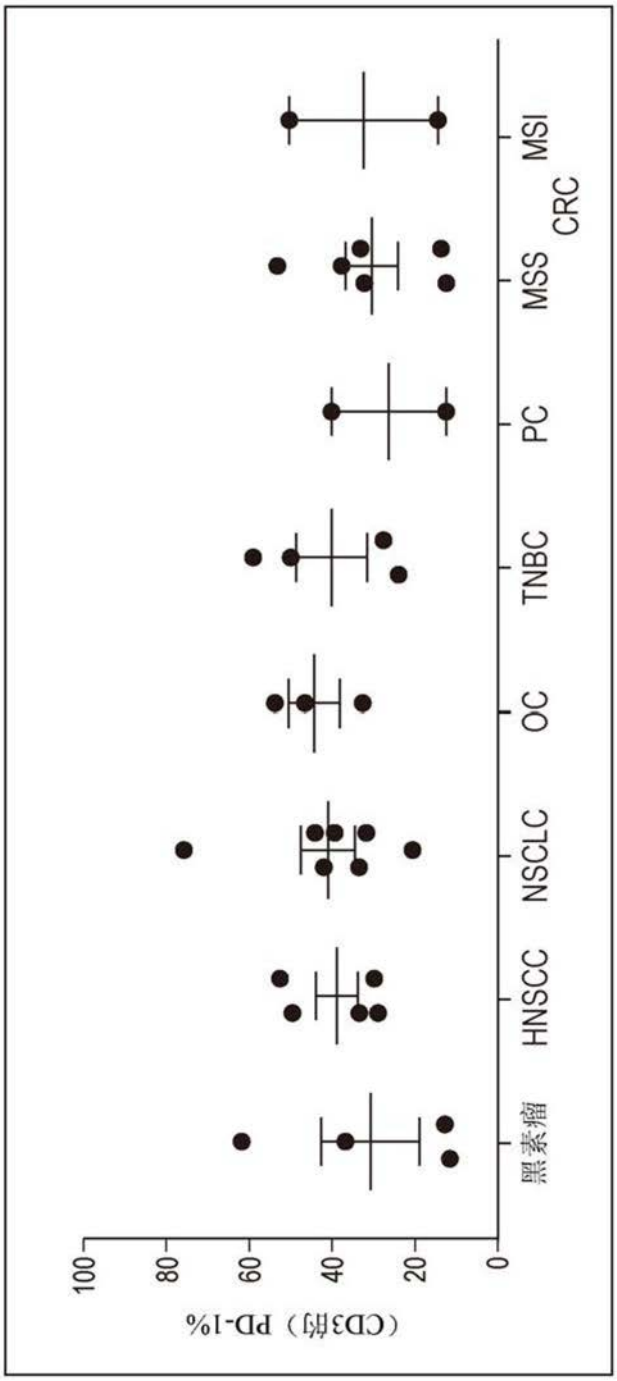

（CD3的）PD-L1%
100
80
60
40
20
0
黑素瘤
HNSCC
NSCLC
OC
TNBC
PC
MSS
CRC
MSI

图165

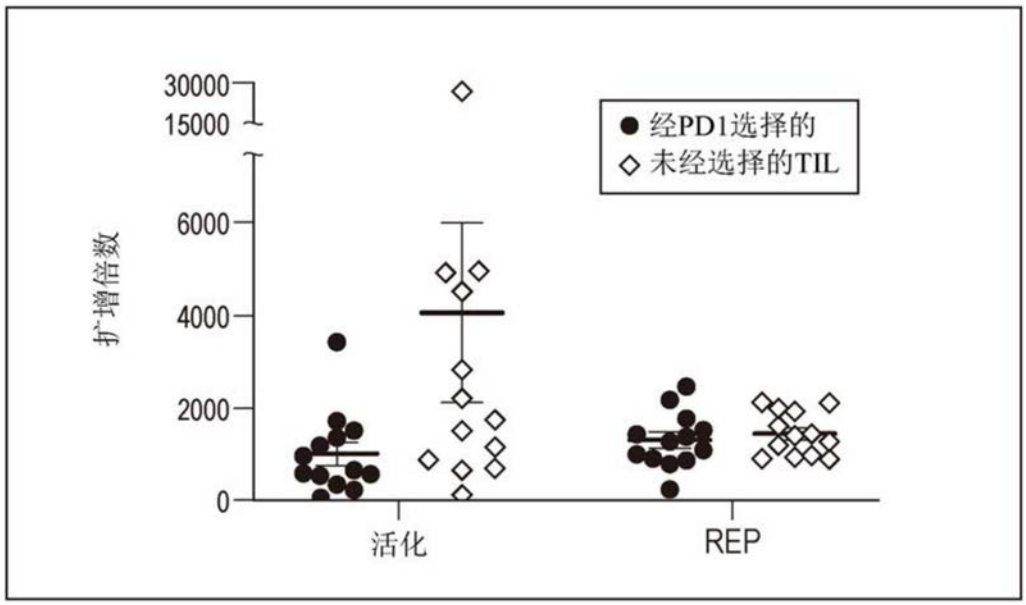

30000
15000
6000
4000
2000
0
扩增倍数
经PD1选择的
未经选择的TIL
活化
REP

图166

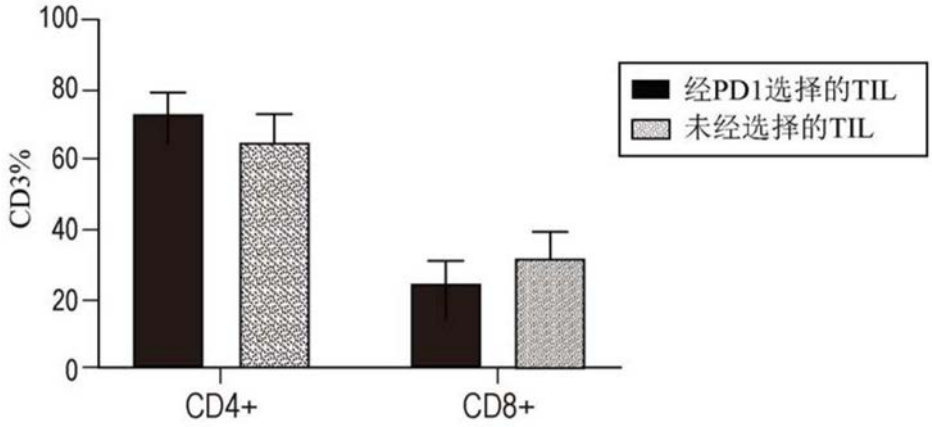

100
80
60
40
20
0
CD3%
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL
CD4+
CD8+

图167

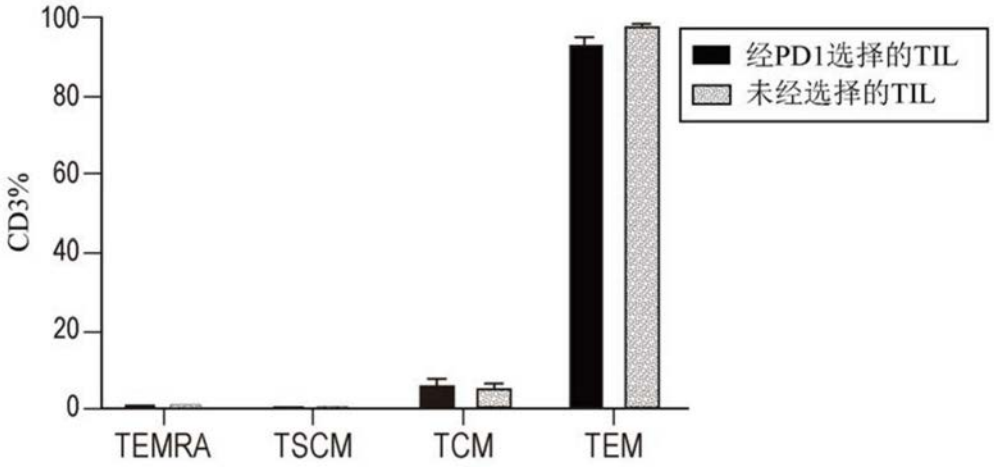

100
80
60
40
20
0
CD3%
TEMRA
TSCM
TCM
TEM
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL

图168

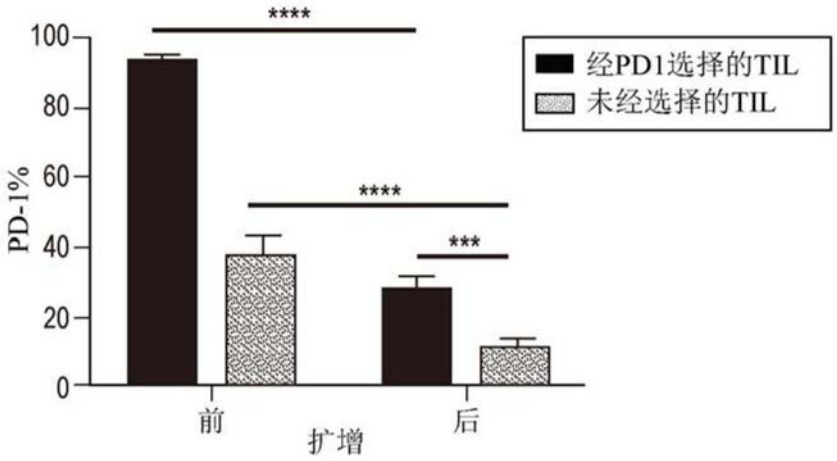

****
****
***
100
80
60
40
20
0
PD-1%
前
后
扩增
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL

图169

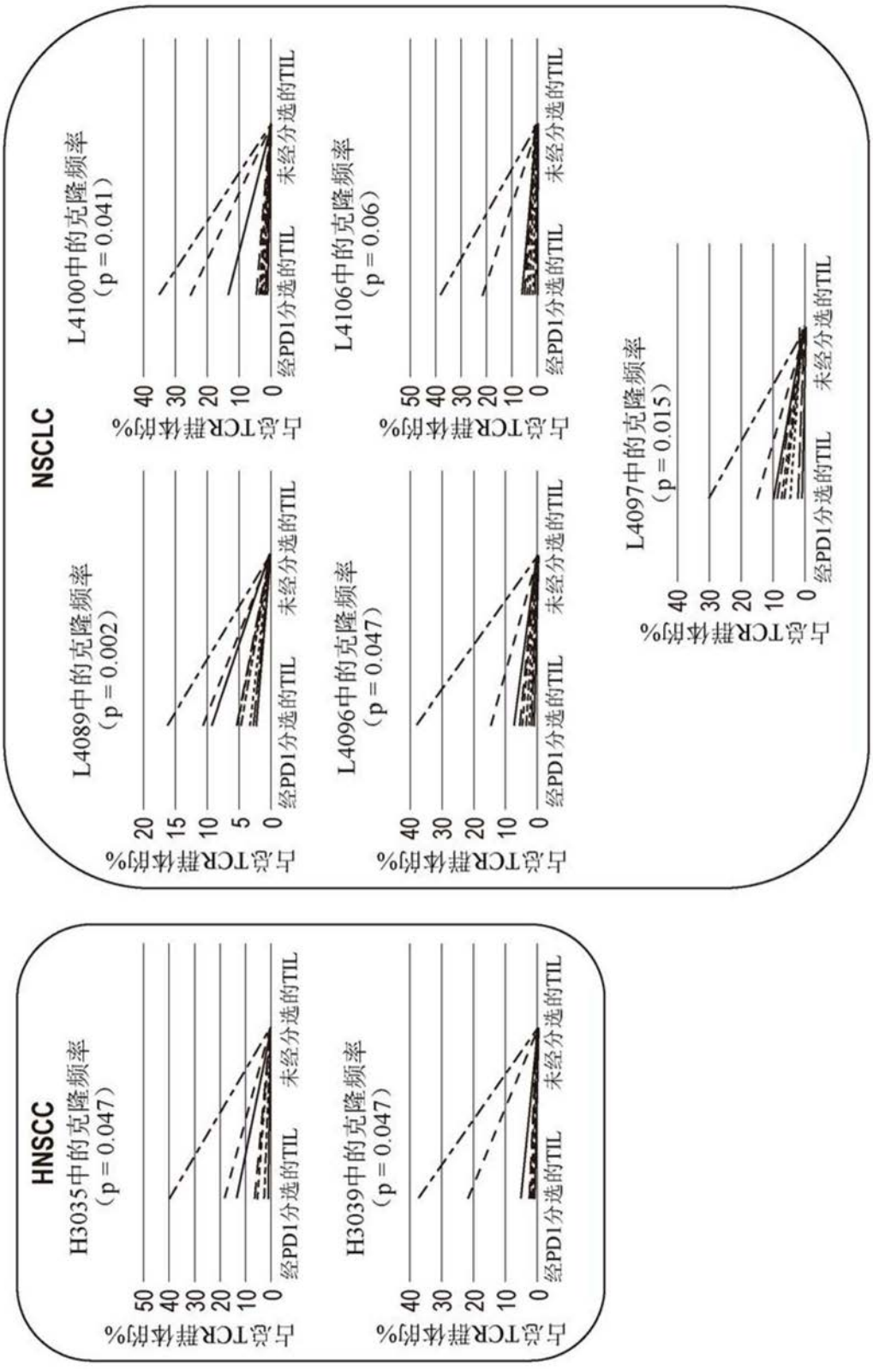

NSCLC
L4089中的克隆频率
（p = 0.002）
L4100中的克隆频率
（p = 0.041）
L4096中的克隆频率
（p = 0.047）
L4106中的克隆频率
（p = 0.06）
L4097中的克隆频率
（p = 0.015）
HNSCC
H3035中的克隆频率
（p = 0.047）
H3039中的克隆频率
（p = 0.047）
占总TCR群体的%
经PD1分选的TIL
未经分选的TIL

图170

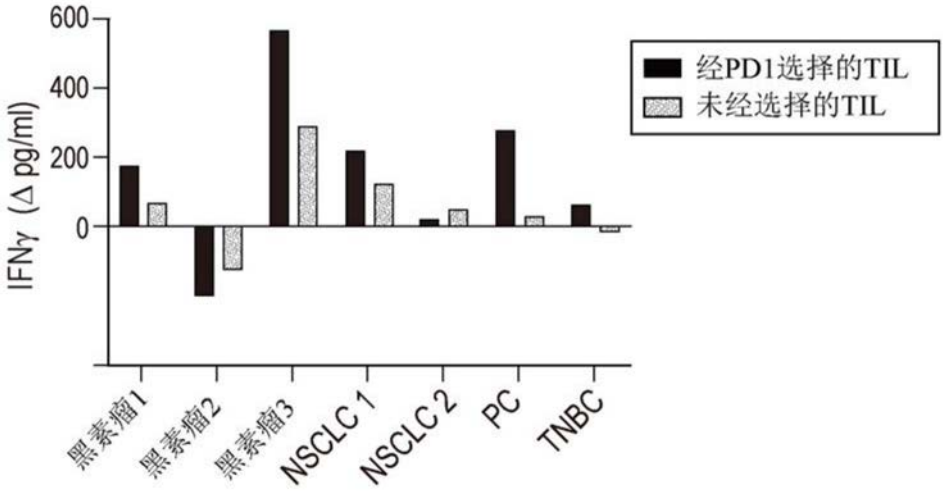

600
400
200
0
IFNγ (Δ pg/ml)
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL
黑素瘤1
黑素瘤2
黑素瘤3
NSCLC 1
NSCLC 2
PC
TNBC

图171

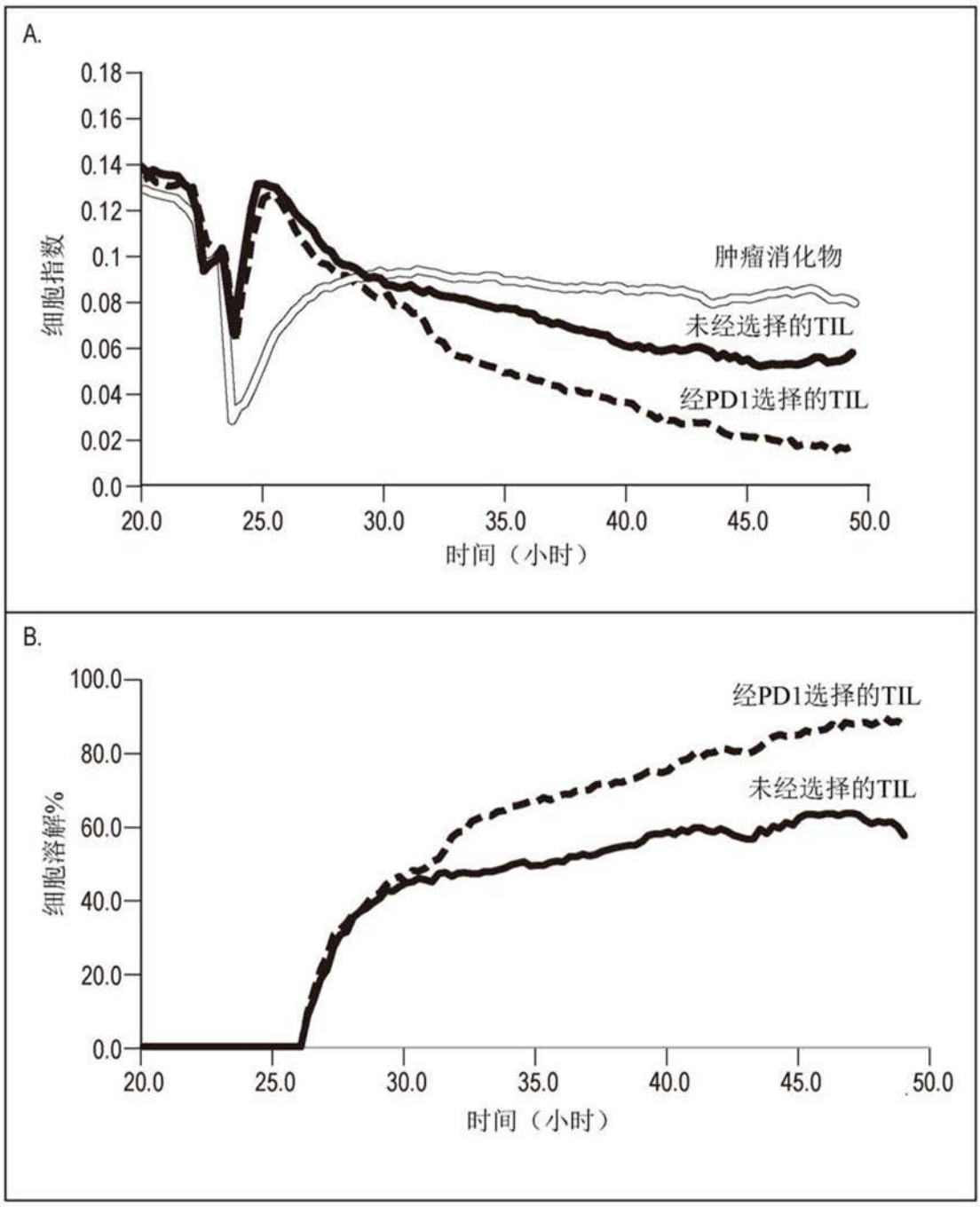

A.
细胞指数
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
时间（小时）
肿瘤消化物
未经选择的TIL
经PD1选择的TIL
B.
细胞溶解%
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
时间（小时）
经PD1选择的TIL
未经选择的TIL

图172

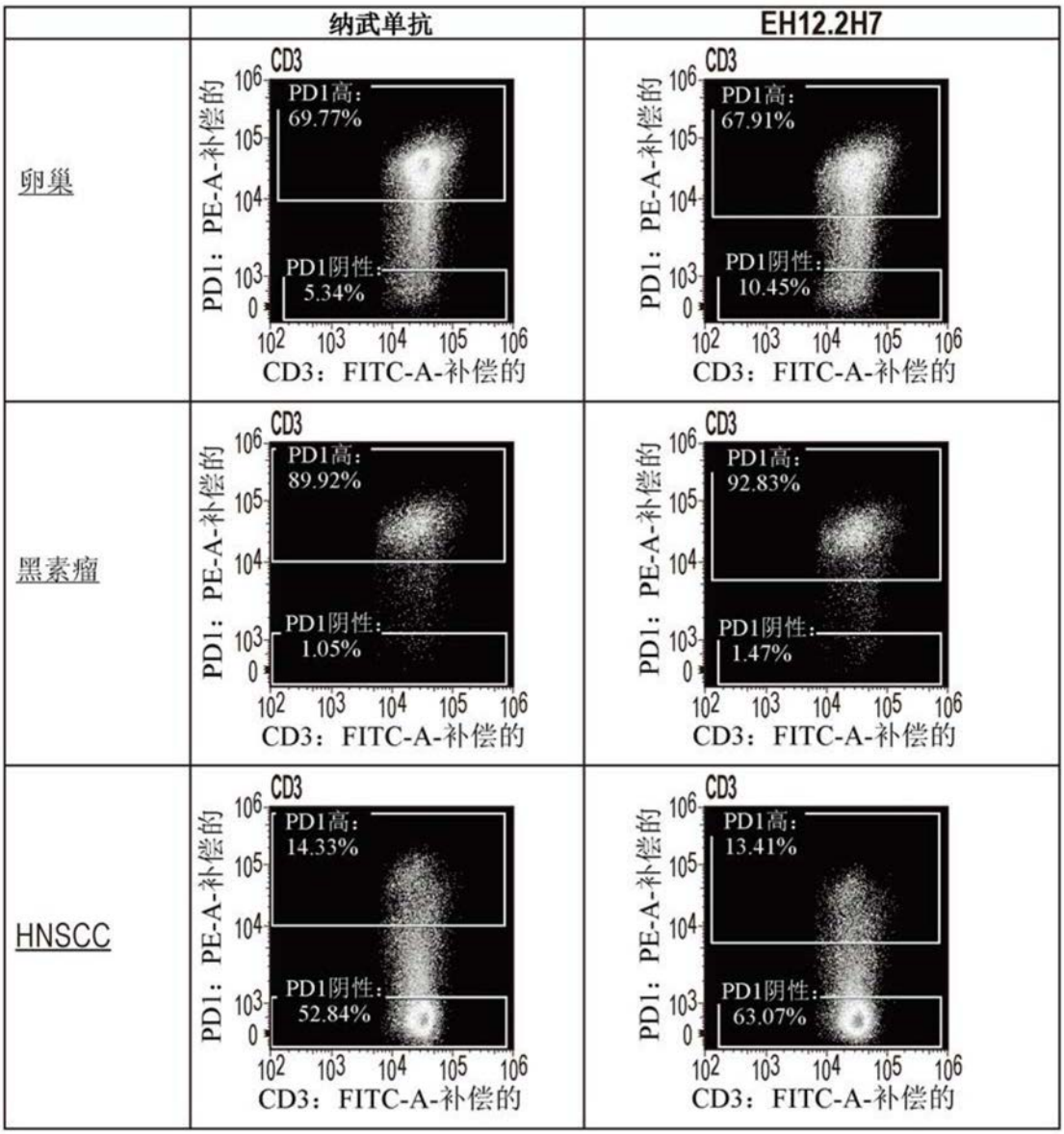

纳武单抗
EH12.2H7
卵巢
黑素瘤
HNSCC
CD3
PD1高：69.77%
PD1阴性：5.34%
PD1高：67.91%
PD1阴性：10.45%
PD1高：89.92%
PD1阴性：1.05%
PD1高：92.83%
PD1阴性：1.47%
PD1高：14.33%
PD1阴性：52.84%
PD1高：13.41%
PD1阴性：63.07%
PD1：PE-A-补偿的
CD3：FITC-A-补偿的

图172C

肿瘤组织学	对抗PD-1抗体进行分选	（CD3的）PD-1%	PD-1分选后纯度	活化扩增倍数	REP扩增倍数	总活细胞产率（$\times 10^9$）
卵巢*	纳武单抗	79.66	98.98	2960	570	114.1
	EH12.2H7	69.91	97.89	4905	461	92.3
黑素瘤*	纳武单抗	90.10	96.28	1975	434	86.8
	EH12.2H7	93.57	100.00	1427	559	84.1
HNSCC**	纳武单抗	14.61	95.34	1291	720	88.1
	EH12.2H7	14.60	96.36	1486	612	81.0

图173

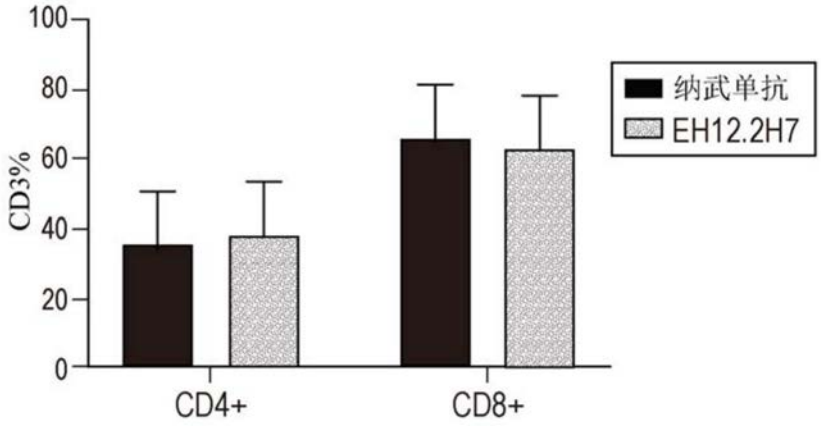


图174

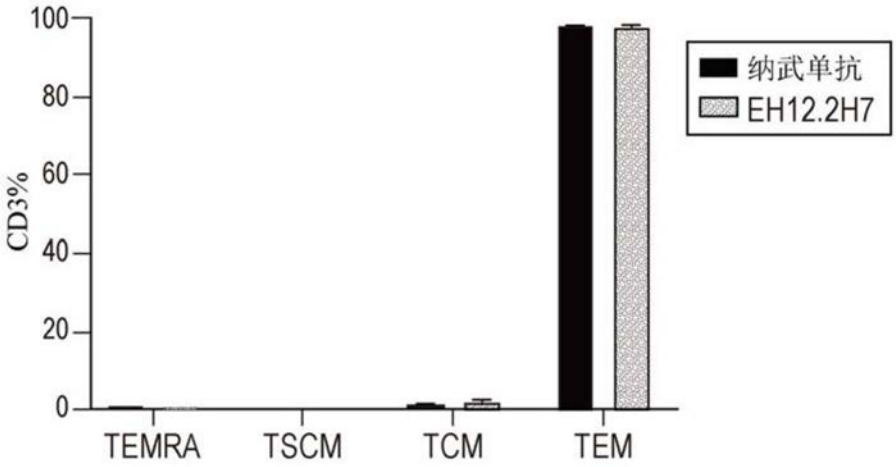


图175

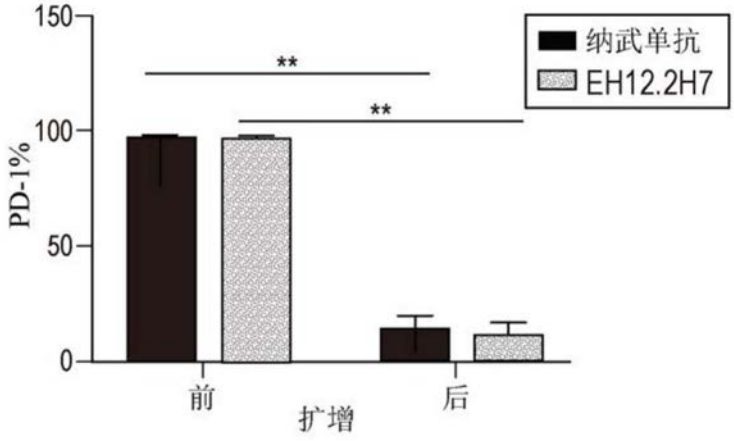


图176

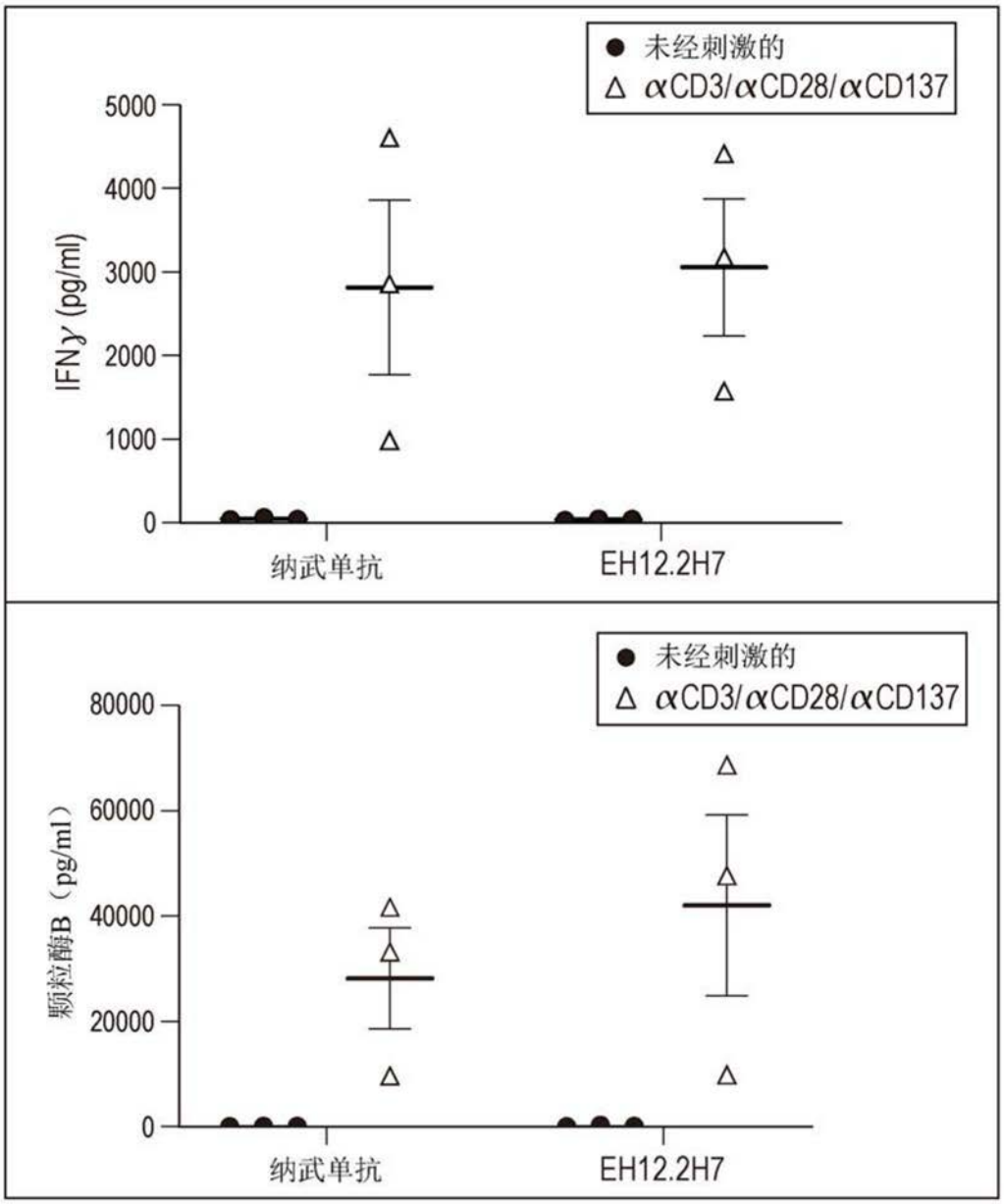

未经刺激的
αCD3/αCD28/αCD137
IFNγ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
纳武单抗
EH12.2H7
未经刺激的
αCD3/αCD28/αCD137
颗粒酶B（pg/ml）
80000
60000
40000
20000
0
纳武单抗
EH12.2H7

图177

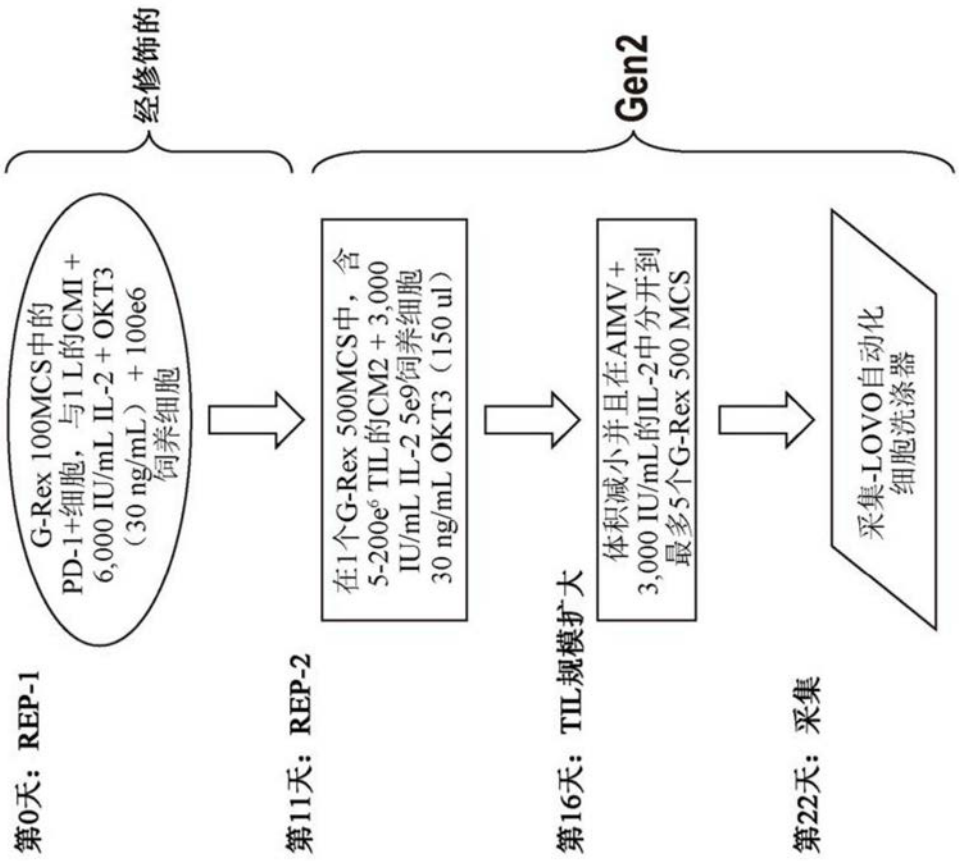

经修饰的
Gen2
PD-1^高Gen 2
G-Rex 100MCS中的
PD-1+细胞，与1 L的CMI +
6,000 IU/mL IL-2 + OKT3
（30 ng/mL）+ 100e6
饲养细胞
在1个G-Rex 500MCS中，含
5-200e^6 TIL的CM2 + 3,000
IU/mL IL-2 5e9饲养细胞
30 ng/mL OKT3（150 ul）
体积减小并且在AIMV +
3,000 IU/mL的IL-2中分开到
最多5个G-Rex 500 MCS
采集-LOVO自动化
细胞洗涤器
第0天：REP-1
第11天：REP-2
第16天：TIL规模扩大
第22天：采集

图178

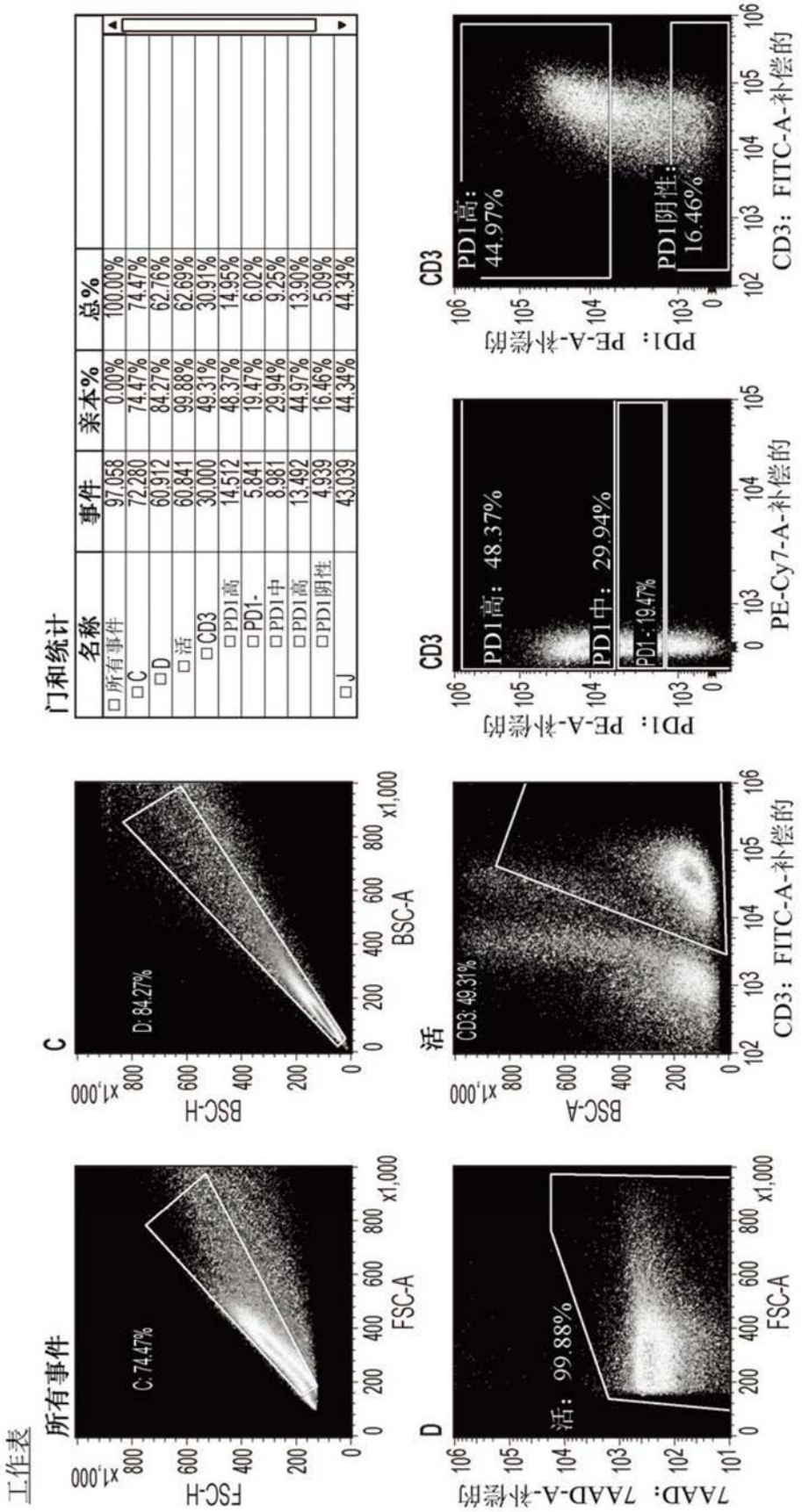

工作表
所有事件
C: 74.47%
FSC-H
FSC-A
x1,000
C
D: 84.27%
BSC-H
BSC-A
D
活: 99.88%
7AAD: 7AAD-A-补偿的
活
CD3: 49.31%
BSC-A
CD3: FITC-A-补偿的
CD3
PD1高: 48.37%
PD1中: 29.94%
PD1-: 19.47%
PD1: PE-A-补偿的
PE-Cy7-A-补偿的
PD1高: 44.97%
PD1阴性: 16.46%
门和统计
名称 事件 亲本% 总%
所有事件 97,058 0.00% 100.00%
C 72,280 74.47% 74.47%
D 60,912 84.27% 62.76%
活 60,841 99.88% 62.69%
CD3 30,000 49.31% 30.91%
PD1高 14,512 48.37% 14.95%
PD1- 5,841 19.47% 6.02%
PD1中 8,981 29.94% 9.25%
PD1高 13,492 44.97% 13.90%
PD1阴性 4,939 16.46% 5.09%
J 43,039 44.34% 44.34%

图179