202239415

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202239415 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：110147483 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 12 月 17 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/675 (2006.01)* *A61K35/17 (2015.01)*
A61K38/20 (2006.01) *A61K39/395 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01) *C12N5/0783 (2010.01)*

(30)優先權：2020/12/17 美國 63/127,060
2021/02/05 美國 63/146,425
2021/11/09 美國 63/277,371

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

(72)發明人：法笛斯 瑪利亞 FARDIS, MARIA (US)；芬肯斯坦 弗里德里希 FINCKENSTEIN, FRIEDRICH GRAF (DE)；戈德堡 澤蘭娜 GOLDBERG, ZELANNA (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：94 項 圖式數：39 共 1066 頁

(54)名稱

腫瘤浸潤性淋巴球療法與ＣＴＬＡ－４及ＰＤ－１抑制劑組合之治療

(57)摘要

本發明提供用於製備 TIL 之經改進及/或縮短的過程及方法，以製備具有增加的治療功效的 TIL 之治療性群體，用於用如本文所描述之 TIL 與 CTLA-4 及 PD-1 抑制劑及/或 PD-L1 抑制劑組合治療癌症。

The present invention provides improved and/or shortened processes and methods for preparing TILs in order to prepare therapeutic populations of TILs with increased therapeutic efficacy for the treatment of cancer with TILs in combination with CTLA-4 and PD-1 inhibitors and/or PD-L1 inhibitors as described herein.

指定代表圖：

過程2A：步驟A-E約22天

1. **步驟A**

獲得患者腫瘤樣本

2. **步驟B**

碎斷及第一擴增
3天至14天

3. **步驟C**

第一擴增至第二擴增之轉變
無儲存及密閉系統

4. **步驟D**

第二擴增
IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞
密閉系統

5. **步驟E**

自步驟D收集TIL
密閉系統

6. **步驟F**

最終調配及/或轉移至輸注袋
（視情況冷凍保存）

【圖 1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

腫瘤浸潤性淋巴球療法與ＣＴＬＡ－４及ＰＤ－１抑制劑組合之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT WITH TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTE THERAPIES IN COMBINATION WITH CTLA-4 AND PD-1 INHIBITORS

【中文】

本發明提供用於製備TIL之經改進及/或縮短的過程及方法，以製備具有增加的治療功效的TIL之治療性群體，用於用如本文所描述之TIL與CTLA-4及PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑組合治療癌症。

【英文】

The present invention provides improved and/or shortened processes and methods for preparing TILs in order to prepare therapeutic populations of TILs with increased therapeutic efficacy for the treatment of cancer with TILs in combination with CTLA-4 and PD-1 inhibitors and/or PD-L1 inhibitors as described herein.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

腫瘤浸潤性淋巴球療法與ＣＴＬＡ－４及ＰＤ－１抑制劑組合之治療

【英文發明名稱】

TREATMENT WITH TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTE THERAPIES IN COMBINATION WITH CTLA-4 AND PD-1 INHIBITORS

【技術領域】

相關申請案之交叉引用

【0001】本申請案主張2020年12月17日申請之美國臨時申請案第63/127,060號、2021年2月5日申請之美國臨時申請案第63/146,425號及2021年11月9日申請之美國臨時申請案第63/277,371號之優先權，其中之每一者出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

序列表併入段落

【0002】本申請案含有序列表，該序列表已按ASCII格式以電子方式提交，且特此以全文引用之方式併入。2021年12月15日創建之該ASCII複本命名為116983-5085-AR_ST25.txt且大小為245,483個位元組。

【先前技術】

【0003】癌症(諸如黑色素瘤)之治療仍然具有挑戰性，特別係對於對常用初始療法系列無反應的患者，該等療法包括納武單抗(nivolumab)單藥療法、帕博利珠單抗(pembrolizumab)單藥療法、使用納武單抗及伊匹木單抗(ipilimumab)之組合的療法、伊匹木單抗單藥療法、達拉非尼(dabrafenib)及曲美替尼(trametinib)組合療法、維羅非尼(vemurafenib)單藥療法及聚乙二醇化干擾素(preinterferon)α-2b。已獲批准之轉移性黑色素瘤的一線治療包括阻斷PD-1之免疫治療策略(帕博利珠單抗，納武單抗)，或將納武單抗與抗CTLA4阻斷劑伊匹木單抗相結合，或用靶向BRAF路徑中特定活化突變的藥物進行化療(例如，維羅非尼、達拉非尼、曲美替尼)。隨著疾病進展，患者可接受額外的抗PD-1單藥療法；納武單抗/伊匹木單抗組合療法；伊匹木單抗單藥療法；BRAF突變體之靶向療法；高劑量阿地介白素(介白素-2；IL-2)；細胞毒素劑(例如，達卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、紫杉醇、順鉑、卡鉑、長春鹼)；或伊馬替尼(imatinib)來治療KIT突變型黑色素瘤。2015年，talimogene laherparepvec係一種活溶瘤病毒療法，經批准用於在初始手術切除後復發的患有黑色素瘤之患者中不可切除性皮膚、皮下及結節病變的局部治療。此產品尚未展示可改善整體存活率或對內臟癌轉移具有影響。

【0004】直至最近，高劑量阿地介白素係唯一一種經

FDA批准之用於轉移性黑色素瘤的全身性治療，能夠誘導持久的客觀癌症反應，總體客觀反應率(ORR)為16%且在高達6%之治療患者中觀測到持久的腫瘤完全消退(CR)(Proleukin®(阿地介白素)標籤，FDA，2012年7月)。Alva等人，《癌症免疫學及免疫療法(*Cancer Immunol. Immunother.*)》**2016,** *65,* 1533-1544。近年來審批通過之PD-1免疫檢查點抑制劑帕博利珠單抗及納武單抗在轉移性黑色素瘤中的持久反應率相對於阿地介白素治療大約增加一倍。Larkin等人，《新英格蘭醫學雜誌(*N. Engl. J. Med.*)》**2015,** *373,* 23-34；Robert等人，《新英格蘭醫學雜誌》**2015,** *372,* 2521-32。在先前治療之患者中，納武單抗之ORR為32%，且更高及更持久反應與腫瘤之較高水準之PD-1配體表現相關；且在先前用治療後伊匹木單抗的帕博利珠單抗之ORR為21%(表2)。在未接受治療之患者中，當納武單抗及伊匹木單抗組合投與時，50%患者達成持久客觀反應，儘管CR率仍然很低僅為8.9%(Opdivo®(納武單抗)標籤，FDA，2016年10月)。

【0005】檢查點抑制劑之用途與一系列免疫相關不良事件相關，包括肺炎、結腸炎、肝炎、腎炎及腎功能障礙(Opdivo(納武單抗)標籤，FDA，2016年10月)。Hofmann等人，《歐洲癌症雜誌(*Eur. J. Cancer*)》**2016,** *60,* 190-209。在用納武單抗及伊匹木單抗組合療法治療之患者中觀測到增加之毒性。在接受組合療法、單獨使用納武單抗或單獨使用伊匹木單抗之患者中，導致療法中斷的治療相關不良

事件的發生率分別為36.4%、7.7%及14.8%。Larkin等人，《新英格蘭醫學雜誌》**2015,** *373,* 23-34；Johnson等人，《新英格蘭醫學雜誌》**2016,** *375,* 1749-1755。

【0006】雖然靶向療法及免疫檢查點抑制劑可在患有轉移性黑色素瘤之患者中達成顯著反應，但預計到2030年，此癌之死亡率將保持穩定。2011年經年齡調整之黑色素瘤總死亡率為每10萬人中有2.7人，且2015年仍保持這一水準。Guy等人，《發病率及死亡率週報(*Morbidity Mortality Weekly Rep.*)》**2015,** *64,* 591-596。

【0007】使用授受性自體轉移腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)治療大型、難治性癌症表示對於不良預後患者的一種強大的治療方案。Gattinoni等人，《自然免疫學評論(*Nat. Rev. Immunol.*)》**2006,** *6,* 383-393。TIL係由T細胞主導，且基於IL-2之TIL擴增及隨後的「快速擴增過程」(REP)已因其速度及效率而成為TIL擴增之較佳方法。Dudley等人，《科學(*Science*)》**2002**，*298,* 850-54；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌(*J. Clin. Oncol.*)》**2005,** *23,* 2346-57；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26,* 5233-39；Riddell等人，《科學》**1992,** *257,* 238-41；Dudley等人，《免疫療法雜誌(*J. Immunother.*)》**2003**, *26,* 332-42。已探究許多改善黑色素瘤對TIL療法的反應且將TIL療法擴展到其他腫瘤類型的方法，但成效有限，該領域仍然具有挑戰性。Goff等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2016,** *34,* 2389-97；Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》

2008, *26*, 5233-39；Rosenberg等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》**2011,** *17*, 4550-57。亦已描述單一免疫檢查點抑制劑之組合研究，但其他研究正在進行中且需要額外治療方法(Kverneland等人，《腫瘤標靶(*Oncotarget*)》, **2020**, 11(22), 2092-2105)。

【0008】此外，當前的TIL製造及治療過程受到長度、成本、無菌性問題及本文所描述之其他因素的限制，使得治療對其他檢查點抑制劑療法難治的患者的潛力受到嚴重限制。迫切需要提供TIL製造過程及基於此類過程的療法，此類過程適合用於治療剩餘極少治療選擇方案或無可行的治療選擇方案的患者。本發明藉由提供一種用於產生TIL之縮短製造過程來滿足此需要。

【0009】本發明提供用於製備TIL之經改進及/或縮短的過程及方法，以製備具有增加的治療功效的TIL之治療性群體，用於用如本文所描述之TIL與CTLA-4及PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑組合治療癌症。

【發明內容】

【0010】本文提供產生TIL的方法，TIL可隨後用於治療癌症，該等方法藉由將TIL與如本文所描述之CTLA-4及PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑組合投與。

【0011】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與

一或多種PD-1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【0012】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以

用於治療患者或個體之癌症。

【0013】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【0014】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，視情況其中該患者或個體已接受至少一種先前療法，其中該至少一種先前療法包括CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0015】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含

以下步驟：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況

下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0016】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得

該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0017】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群

體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0018】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含

以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0019】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(c) 將該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)

及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0020】本發明提供一種治療有需要之患者或個體之黑色素瘤的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該腫瘤碎斷成腫瘤碎片；

(c) 將該等腫瘤碎片與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【0021】在一些實施例中，患者或個體患有腫瘤，該腫瘤不可切除、轉移、耐藥及/或難以用CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑治療。

【0022】在一些實施例中，在步驟(c)中，第二TIL群體在數目上比第一TIL群體大至少50倍。

【0023】在一些實施例中，PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑係與治療有效劑量之第三TIL群體同時投與。

【0024】在一些實施例中，在投與治療有效劑量之第三TIL群體之後維持投與PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【0025】在一些實施例中，PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑係在投與治療有效劑量之第三TIL群體之後投與。

【0026】在一些實施例中，PD-1抑制劑及/或PD-L1抑

制劑不與治療有效劑量之第三TIL群體同時投與。

【0027】在一些實施例中，在投與治療有效劑量之第三TIL群體之後至少一週向個體投與PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【0028】在一些實施例中，在投與治療有效劑量之第三TIL群體之後視情況向患者投與CTLA-4抑制劑。

【0029】在一些實施例中，在步驟(a)中切除及/或獲得及/或接受之前視情況向患者投與PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【0030】在一些實施例中，患者或個體先前已用CTLA-4抑制劑或其生物類似物及/或PD-1抑制劑或其生物類似物及/或PD-L1抑制劑或其生物類似物治療。

【0031】在一些實施例中，腫瘤先前已用PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑或其生物類似物治療。

【0032】在一些實施例中，PD-1抑制劑係選自由以下組成之群組：納武單抗、帕博利珠單抗及其生物類似物。

【0033】在一些實施例中，PD-L1抑制劑係選自由以下組成之群組：阿維魯單抗(avelumab)、阿替利珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)及其生物類似物。

【0034】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑係選自由以下組成之群組：伊匹木單抗(ipilumumab)、曲美單抗(tremelimumab)及其生物類似物。

【0035】在一些實施例中，第一擴增在約11天之時段

內進行。

【0036】在一些實施例中，初始擴增在約11天之時段內進行。

【0037】在一些實施例中，IL-2在第一擴增中之細胞培養基中以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在。

【0038】在一些實施例中，IL-2在初始擴增中之細胞培養基中以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在。

【0039】在一些實施例中，在第二擴增步驟中，IL-2以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且OKT-3抗體以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【0040】在一些實施例中，在快速擴增步驟中，IL-2以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且OKT-3抗體以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【0041】在一些實施例中，第一擴增使用透氣容器來進行。

【0042】在一些實施例中，初始擴增使用透氣容器來進行。

【0043】在一些實施例中，第二擴增使用透氣容器來進行。

【0044】在一些實施例中，快速擴增使用透氣容器來進行。

【0045】在一些實施例中，第一細胞培養基進一步包

含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【0046】在一些實施例中，第一擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【0047】在一些實施例中，第二細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【0048】在一些實施例中，第二擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

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

【0050】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱(fludarabine)持續五天。

【0051】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【0052】在一些實施例中，環磷醯胺與美司鈉(mesna)一起投與。

【0053】在一些實施例中，該方法進一步包含在向患者投與第三TIL群體之後次日開始用IL-2方案治療患者的步驟。

【0054】在一些實施例中，該方法進一步包含以在向患者投與第三TIL群體之同一天開始用IL-2方案治療患者的步驟。

【0055】在一些實施例中，IL-2方案係在向患者完成投與第三TIL群體之後3至24小時投與。

【0056】在一些實施例中，IL-2方案為包含600,000或720,000 IU/kg阿地介白素或其生物類似物或變異體之高劑量IL-2方案，其以每八小時15分鐘的推注靜脈內輸注形式投與直至耐受為止。

【0057】在一些實施例中，投與治療有效之TIL群體且該TIL群體包含約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL。

【0058】在一些實施例中，初始擴增係在21天或更短之時段內進行。

【0059】在一些實施例中，初始擴增係在7天或更短之時段內進行。

【0060】在一些實施例中，快速擴增係在7天或更短之時段內進行。

【0061】在一些實施例中，步驟(c)中之第一擴增及步驟(d)中之第二擴增各自單獨地在11天之時段內進行。

【0062】在一些實施例中，步驟(a)至(f)在約10天至約22天內進行。

【0063】在一些實施例中，個體經歷先前治療，其包含在切除腫瘤之前投與CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑。

【0064】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗或其生物類似物係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。

【0065】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗或其生物類似物係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。

【0066】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗或其生物類似物每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【0067】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗或其生物類似物係以約1 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg或75 mg之劑量投與。

【0068】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗或其生物類似物每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【0069】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，其中納武單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。

【0070】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，其中納武單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。

【0071】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或

其生物類似物，其中納武單抗每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【0072】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。

【0073】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。

【0074】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【0075】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑在切除腫瘤之前1、2、3、4或5週投與，且視情況在切除腫瘤之前1、2或3週投與。

【0076】在一些實施例中，PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑在IL-2投與之後1、2、3、4或5天投與，Tablend視情況在IL-2投與之後1、2或3天投與。

【0077】在一些實施例中，在步驟(a)中將獲自個體之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物包含在酶素性培養基中培育腫瘤樣本。

【0078】在一些實施例中，在步驟(a)中將獲自個體之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包含以機械方式破壞腫瘤樣本以便解離腫瘤樣本。

【0079】在一些實施例中，在步驟(a)中將獲自個體之

腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包含使用密度梯度分離純化解離的腫瘤樣本。

【0080】在一些實施例中，酶素性培養基包含DNA酶。

【0081】在一些實施例中，酶素性培養基包含30單位/mL之DNA酶。

【0082】在一些實施例中，酶素性培養基包含膠原蛋白酶。

【0083】在一些實施例中，酶素性培養基包含1.0 mg/mL膠原蛋白酶。

【圖式簡單說明】

【0084】[**圖1**]：例示性Gen 2(過程2A)圖表提供了步驟A至F之概述。

【0085】[**圖2A至2C**]：用於TIL製造之Gen 2(過程2A)實施例的過程流程圖。

【0086】[**圖3**]：顯示冷凍保存之TIL例示性製造過程(約22天)的實施例的圖式。

【0087】[**圖4**]：顯示Gen 2(過程2A)之實施例的圖式，此係一個用於TIL製造的22天過程。

【0088】[**圖5**]：過程1C及用於TIL製造之Gen 2(過程2A)的例示性實施例的步驟A至F的比較表。

【0089】[**圖6**]：過程1C之實施例及用於TIL製造之Gen 2(過程2A)之實施例的詳細比較。

【0090】[**圖7**]：例示性Gen 3型TIL製造過程。

【0091】[**圖8A至圖8D**]：**A)**顯示2A過程(大約22天過程)與用於TIL製造之Gen 3過程(大約14天至16天過程)的實施例之間的比較。**B)**例示性Gen 3圖表提供了步驟A至F之概述(大約14天至16天過程)。**C)**該圖表提供三種例示性Gen 3過程，其中概述三種過程變化中之每一者的步驟A至F(大約14天或16天過程)。**D)**例示性經修改之類Gen 2過程，其提供步驟A至F之概述(大約22天過程)。

【0092】[**圖9**]：提供Gen 2(過程2A)與Gen 3過程之間的可比較性之實驗流程圖。

【0093】[**圖10**]：顯示各種Gen 2(過程2A)與Gen 3.1過程實施例之間的比較。

【0094】[**圖11**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0095】[**圖12**]：Gen 3過程(被稱作Gen 3.1)之一實施例的培養基條件的概述。

【0096】[**圖13**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0097】[**圖14**]：比較Gen 2及Gen 3.0過程之實施例之各種特徵的表。

【0098】[**圖15**]：提供所描述擴增過程之各種實施例中的培養基用途的表。

【0099】[**圖16**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0100】[**圖17**]：使用Gen 3擴增平台擴增來自造血性惡性病之T細胞之方法的例示性實施例的示意圖。

【0101】[**圖18**]：提供結構I-A及I-B。圓柱體係指單獨的多肽結合域。結構I-A及I-B包含三個線性連接的衍生自例如4-1BBL或結合4-1BB的抗體的TNFRSF結合域，其摺疊形成三價蛋白質，該三價蛋白質接著經由IgG1-Fc((包括CH3及CH2域)與第二三價蛋白質連接，該IgG1-Fc隨後經由二硫鍵(小長橢圓形)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而穩定結構且提供能夠將六個受體之細胞內信號傳導域與信號傳導蛋白集合在一起以形成信號傳導複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包含例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包含親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。

【0102】[**圖19**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0103】[**圖20**]：提供Gen 3.1過程(16天過程)之例示性實施例的過程概述。

【0104】[**圖21**]：Gen 3.1測試過程(16天至17天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0105】[**圖22**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0106】[**圖23**]：例示性Gen 2及例示性Gen 3過程之比較表。

【0107】[**圖24**]：Gen 3過程(16天至17天過程)製備時

間線之例示性實施例之示意圖。

【0108】[**圖25**]：Gen 3過程(14天至16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0109】[**圖26A至圖26B**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0110】[**圖27**]：Gen 3過程(16天過程)之例示性實施例之示意圖。

【0111】[**圖28**]：Gen 2、Gen 2.1與Gen 3過程(16天過程)之實施例的比較。

【0112】[**圖29**]：Gen 2、Gen 2.1與Gen 3過程(16天過程)之實施例的比較。

【0113】[**圖30**]：Gen 3實施例組分。

【0114】[**圖31**]：Gen 3實施例流程圖比較(Gen 3.0、Gen 3.1對照、Gen 3.1測試)。

【0115】[**圖32**]：顯示Gen 3過程(16天至17天過程)之例示性實施例之組分。

【0116】[**圖33**]：驗收準則表。

【0117】[**圖34**]：實例16中所描述之臨床試驗之TIL之製造及投與的示意性說明。

【0118】[**圖35**]：實例16中所描述之臨床試驗之治療方案。

【0119】[**圖36**]：實例16中所描述之臨床試驗隨時間推移之治療引發之不良事件。

【0120】[**圖37**]：實例16中所描述之臨床試驗之最佳

整體反應。

【0121】[**圖38**]：實例16中所描述之臨床試驗之反應時間。

【0122】[**圖39**]：實例16中所描述之臨床試驗之腫瘤大小相對於基線之變化。

【實施方式】

序列表之簡要說明

【0123】SEQ ID NO:1為莫羅單抗(muromonab)之重鏈之胺基酸序列。

【0124】SEQ ID NO:2為莫羅單抗之輕鏈之胺基酸序列。

【0125】SEQ ID NO:3為重組人類IL-2蛋白之胺基酸序列。

【0126】SEQ ID NO:4為阿地介白素之胺基酸序列。

【0127】SEQ ID NO:5為IL-2形式。

【0128】SEQ ID NO:6為奈瓦紐金α(nemvaleukin alfa)之胺基酸序列。

【0129】SEQ ID NO:7為IL-2形式。

【0130】SEQ ID NO:8為黏蛋白域多肽。

【0131】SEQ ID NO:9為重組人類IL-4蛋白之胺基酸序列。

【0132】SEQ ID NO:10為重組人類IL-7蛋白之胺基酸序列。

【0133】SEQ ID NO:11為重組人類IL-15蛋白之胺基酸序列。

【0134】SEQ ID NO:12為重組人類IL-21蛋白之胺基酸序列。

【0135】SEQ ID NO:13為IL-2序列。

【0136】SEQ ID NO:14為IL-2突變蛋白序列。

【0137】SEQ ID NO:15為IL-2突變蛋白序列。

【0138】SEQ ID NO:16為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2。

【0139】SEQ ID NO:17為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2。

【0140】SEQ ID NO:18為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3。

【0141】SEQ ID NO:19為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 kabat。

【0142】SEQ ID NO:20為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 kabat。

【0143】SEQ ID NO:21為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 kabat。

【0144】SEQ ID NO:22為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 clothia。

【0145】SEQ ID NO:23為IgG.IL2R67A.H1之 HCDR2 clothia。

【0146】SEQ ID NO:24為IgG.IL2R67A.H1之 HCDR3 clothia。

【0147】SEQ ID NO:25為IgG.IL2R67A.H1之

HCDR1_IL-2 IMGT。

【0148】SEQ ID NO:26為IgG.IL2R67A.H1之 HCDR2 IMGT。

【0149】SEQ ID NO:27為IgG.IL2R67A.H1之 HCDR3 IMGT。

【0150】SEQ ID NO:28為IgG.IL2R67A.H1之V_H鏈。

【0151】SEQ ID NO:29為IgG.IL2R67A.H1之重鏈。

【0152】SEQ ID NO:30為IgG.IL2R67A.H1之 LCDR1 kabat。

【0153】SEQ ID NO:31為IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 kabat。

【0154】SEQ ID NO:32為IgG.IL2R67A.H1之 LCDR3 kabat。

【0155】SEQ ID NO:33為IgG.IL2R67A.H1之LCDR1 chothia。

【0156】SEQ ID NO:34為IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 chothia。

【0157】SEQ ID NO:35為IgG.IL2R67A.H1之LCDR3 chothia。

【0158】SEQ ID NO:36為V_L鏈。

【0159】SEQ ID NO:37為輕鏈。

【0160】SEQ ID NO:38為輕鏈。

【0161】SEQ ID NO:39為輕鏈。

【0162】SEQ ID NO:40為人類4-1BB之胺基酸序列。

【0163】SEQ ID NO:41為鼠類4-1BB之胺基酸序列。

【0164】SEQ ID NO:42為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(utomilumab)(PF-05082566)之重鏈。

【0165】SEQ ID NO:43為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈。

【0166】SEQ ID NO:44為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈可變區(V_H)。

【0167】SEQ ID NO:45為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈可變區(V_L)。

【0168】SEQ ID NO:46為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR1。

【0169】SEQ ID NO:47為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR2。

【0170】SEQ ID NO:48為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR3。

【0171】SEQ ID NO:49為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR1。

【0172】SEQ ID NO:50為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR2。

【0173】SEQ ID NO:51為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR3。

【0174】SEQ ID NO:52為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(urelumab)(BMS-663513)之重鏈。

【0175】SEQ ID NO:53為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞

魯單抗(BMS-663513)之輕鏈。

【0176】SEQ ID NO:54為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈可變區(V_H)。

【0177】SEQ ID NO:55為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈可變區(V_L)。

【0178】SEQ ID NO:56為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR1。

【0179】SEQ ID NO:57為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR2。

【0180】SEQ ID NO:58為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR3。

【0181】SEQ ID NO:59為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR1。

【0182】SEQ ID NO:60為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR2。

【0183】SEQ ID NO:61為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR3。

【0184】SEQ ID NO:62為TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域。

【0185】SEQ ID NO:63為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0186】SEQ ID NO:64為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0187】SEQ ID NO:65為TNFRSF促效劑融合蛋白之

連接子。

【0188】SEQ ID NO:66為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0189】SEQ ID NO:67為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0190】SEQ ID NO:68為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0191】SEQ ID NO:69為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0192】SEQ ID NO:70為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0193】SEQ ID NO:71為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0194】SEQ ID NO:72為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0195】SEQ ID NO:73為TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域。

【0196】SEQ ID NO:74為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0197】SEQ ID NO:75為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0198】SEQ ID NO:76為TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子。

【0199】SEQ ID NO:77為4-1BB配體(4-1BBL)胺基酸

序列。

【0200】SEQ ID NO:78為4-1BBL多肽之可溶部分。

【0201】SEQ ID NO:79為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之重鏈可變區(V_H)。

【0202】SEQ ID NO:80為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之輕鏈可變區(V_L)。

【0203】SEQ ID NO:81為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之重鏈可變區(V_H)。

【0204】SEQ ID NO:82為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之輕鏈可變區(V_L)。

【0205】SEQ ID NO:83為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區(V_H)。

【0206】SEQ ID NO:84為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區(V_L)。

【0207】SEQ ID NO:85為人類OX40之胺基酸序列。

【0208】SEQ ID NO:86為鼠類OX40之胺基酸序列。

【0209】SEQ ID NO:87為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)之重鏈。

【0210】SEQ ID NO:88為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈。

【0211】SEQ ID NO:89為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈可變區(V_H)。

【0212】SEQ ID NO:90為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈可變區(V_L)。

【0213】SEQ ID NO:91為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR1。

【0214】SEQ ID NO:92為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR2。

【0215】SEQ ID NO:93為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR3。

【0216】SEQ ID NO:94為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR1。

【0217】SEQ ID NO:95為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR2。

【0218】SEQ ID NO:96為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR3。

【0219】SEQ ID NO:97為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈。

【0220】SEQ ID NO:98為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈。

【0221】SEQ ID NO:99為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區(V_H)。

【0222】SEQ ID NO:100為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈可變區(V_L)。

【0223】SEQ ID NO:101為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1。

【0224】SEQ ID NO:102為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2。

【0225】SEQ ID NO:103為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3。

【0226】SEQ ID NO:104為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1。

【0227】SEQ ID NO:105為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2。

【0228】SEQ ID NO:106為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3。

【0229】SEQ ID NO:107為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈。

【0230】SEQ ID NO:108為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈。

【0231】SEQ ID NO:109為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區(V_H)。

【0232】SEQ ID NO:110為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區(V_L)。

【0233】SEQ ID NO:111為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1。

【0234】SEQ ID NO:112為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR2。

【0235】SEQ ID NO:113為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR3。

【0236】SEQ ID NO:114為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR1。

【0237】SEQ ID NO:115為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR2。

【0238】SEQ ID NO:116為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR3。

【0239】SEQ ID NO:117為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈可變區(V_H)。

【0240】SEQ ID NO:118為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈可變區(V_L)。

【0241】SEQ ID NO:119為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR1。

【0242】SEQ ID NO:120為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR2。

【0243】SEQ ID NO:121為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR3。

【0244】SEQ ID NO:122為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR1。

【0245】SEQ ID NO:123為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR2。

【0246】SEQ ID NO:124為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR3。

【0247】SEQ ID NO:125為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈可變區(V_H)。

【0248】SEQ ID NO:126為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈可變區(V_L)。

【0249】SEQ ID NO:127為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR1。

【0250】SEQ ID NO:128為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR2。

【0251】SEQ ID NO:129為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR3。

【0252】SEQ ID NO:130為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR1。

【0253】SEQ ID NO:131為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR2。

【0254】SEQ ID NO:132為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR3。

【0255】SEQ ID NO:133為OX40配體(OX40L)胺基酸序列。

【0256】SEQ ID NO:134為OX40L多肽之可溶部分。

【0257】SEQ ID NO:135為OX40L多肽之替代性可溶部分。

【0258】SEQ ID NO:136為OX40促效劑單株抗體008之重鏈可變區(V_H)。

【0259】SEQ ID NO:137為OX40促效劑單株抗體008之輕鏈可變區(V_L)。

【0260】SEQ ID NO:138為OX40促效劑單株抗體011之重鏈可變區(V_H)。

【0261】SEQ ID NO:139為OX40促效劑單株抗體011

之輕鏈可變區(V_L)。

【0262】SEQ ID NO:140為OX40促效劑單株抗體021之重鏈可變區(V_H)。

【0263】SEQ ID NO:141為OX40促效劑單株抗體021之輕鏈可變區(V_L)。

【0264】SEQ ID NO:142為OX40促效劑單株抗體023之重鏈可變區(V_H)。

【0265】SEQ ID NO:143為OX40促效劑單株抗體023之輕鏈可變區(V_L)。

【0266】SEQ ID NO:144為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0267】SEQ ID NO:145為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0268】SEQ ID NO:146為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0269】SEQ ID NO:147為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0270】SEQ ID NO:148為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0271】SEQ ID NO:149為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0272】SEQ ID NO:150為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0273】SEQ ID NO:151為人類化OX40促效劑單株抗

體之輕鏈可變區(V_L)。

【0274】SEQ ID NO:152為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0275】SEQ ID NO:153為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0276】SEQ ID NO:154為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0277】SEQ ID NO:155為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0278】SEQ ID NO:156為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0279】SEQ ID NO:157為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0280】SEQ ID NO:158為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈胺基酸序列。

【0281】SEQ ID NO:159為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0282】SEQ ID NO:160為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0283】SEQ ID NO:161為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0284】SEQ ID NO:162為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0285】SEQ ID NO:163為PD-1抑制劑納武單抗之重

鏈CDR2胺基酸序列。

【0286】SEQ ID NO:164為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0287】SEQ ID NO:165為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0288】SEQ ID NO:166為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0289】SEQ ID NO:167為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0290】SEQ ID NO:168為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈胺基酸序列。

【0291】SEQ ID NO:169為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0292】SEQ ID NO:170為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0293】SEQ ID NO:171為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0294】SEQ ID NO:172為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0295】SEQ ID NO:173為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0296】SEQ ID NO:174為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0297】SEQ ID NO:175為PD-1抑制劑帕博利珠單抗

之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0298】SEQ ID NO:176為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0299】SEQ ID NO:177為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0300】SEQ ID NO:178為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈胺基酸序列。

【0301】SEQ ID NO:179為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0302】SEQ ID NO:180為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0303】SEQ ID NO:181為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0304】SEQ ID NO:182為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0305】SEQ ID NO:183為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0306】SEQ ID NO:184為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0307】SEQ ID NO:185為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0308】SEQ ID NO:186為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0309】SEQ ID NO:187為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之

輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0310】SEQ ID NO:188為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈胺基酸序列。

【0311】SEQ ID NO:189為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0312】SEQ ID NO:190為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0313】SEQ ID NO:191為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0314】SEQ ID NO:192為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0315】SEQ ID NO:193為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0316】SEQ ID NO:194為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0317】SEQ ID NO:195為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0318】SEQ ID NO:196為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0319】SEQ ID NO:197為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0320】SEQ ID NO:198為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈胺基酸序列。

【0321】SEQ ID NO:199為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗

之輕鏈胺基酸序列。

【0322】SEQ ID NO:200為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0323】SEQ ID NO:201為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0324】SEQ ID NO:202為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0325】SEQ ID NO:203為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0326】SEQ ID NO:204為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0327】SEQ ID NO:205為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0328】SEQ ID NO:206為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0329】SEQ ID NO:207為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0330】SEQ ID NO:208為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈胺基酸序列。

【0331】SEQ ID NO:209為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0332】SEQ ID NO:210為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0333】SEQ ID NO:211為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗

之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0334】SEQ ID NO:212為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0335】SEQ ID NO:213為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0336】SEQ ID NO:214為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0337】SEQ ID NO:215為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0338】SEQ ID NO:216為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0339】SEQ ID NO:217為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0340】SEQ ID NO:218為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈胺基酸序列。

【0341】SEQ ID NO:219為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0342】SEQ ID NO:220為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0343】SEQ ID NO:221為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0344】SEQ ID NO:222為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0345】SEQ ID NO:223為CTLA-4抑制劑曲美單抗之

重鏈CDR2胺基酸序列。

【0346】SEQ ID NO:224為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0347】SEQ ID NO:225為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0348】SEQ ID NO:226為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0349】SEQ ID NO:227為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0350】SEQ ID NO:228為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗(zalifrelimab)之重鏈胺基酸序列。

【0351】SEQ ID NO:229為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0352】SEQ ID NO:230為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0353】SEQ ID NO:231為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0354】SEQ ID NO:232為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0355】SEQ ID NO:233為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0356】SEQ ID NO:234為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0357】SEQ ID NO:235為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗

之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0358】SEQ ID NO:236為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0359】SEQ ID NO:237為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

具體實施方式

I. 引言

【0360】利用藉由快速擴增方案(REP)離體培養之TIL的授受性細胞療法已在患有諸如黑色素瘤之癌症的患者的宿主免疫抑制之後產生成功的授受性細胞療法。目前的輸注接受參數依賴於TIL之組成的讀數(例如CD28、CD8或CD4陽性率)及REP產物之擴增倍數及存活率。

【0361】當前REP方案對將輸注患者體內的TIL的健康狀況提供極少瞭解。T細胞在其自幼稚T細胞至效應T細胞的成熟過程中經歷了深刻的代謝轉變(參見Chang等人，《自然·免疫學(*Nat. Immunol.*)》**2016**, *17*, 364，特此明確地以全文併入，且尤其對於厭氧及好氧代謝之論述及標記物而言)。例如，幼稚T細胞依賴於粒線體呼吸產生ATP，而成熟、健康效應T細胞(諸如TIL)則具有高度糖酵解，依賴於好氧性糖酵解來提供它們增殖、遷移、激活及抗腫瘤功效所需的生物能量底物。

【0362】當前TIL製造及治療過程受到長度、成本、無菌性問題及本文所描述之其他因素的限制，使得治療對

BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑難治的患者的潛力受到嚴重限制。迫切需要提供TIL製造過程及基於此類過程的療法，此類過程適合用於治療剩餘極少治療選擇方案或無可行的治療選擇方案的患者。本發明藉由提供一種縮短的製造過程來滿足此需要，該方法用於產生可隨後用於治療難以用BRAF及/或MEK抑制劑治療之黑色素瘤癌症的患者的TIL。

定義

【0363】除非另外定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬的領域之一般熟習此項技術者通常所理解的相同之含義。本文所提及之所有專利及公開案均以全文引用的方式併入本文中。

【0364】如本文所用，術語「共同投與(co-administration/co-administering)」、「與...組合投與(administered in combination with/administering in combination with)」、「同時(simultaneous)」及「併發(concurrent)」涵蓋向個體投與兩種或更多種活性醫藥成分(在本發明之一較佳實施例中，例如複數個TIL組合)，以使得活性醫藥成分及/或其代謝物兩者同時存在於個體中。共同投與包括以分開的組合物同時投與、以分開的組合物在不同時間投與或以其中存在兩種或更多種活性醫藥成分之組合物之形式投與。以分開的組合物同時投與及以其中存在兩種試劑之組合物之形式投與為較佳的。

【0365】術語「活體內」係指發生於個體體內之事件。

【0366】術語「活體外」係指發生於個體體外之事件。活體外分析涵蓋採用活細胞或死細胞的基於細胞之分析，且亦可涵蓋不採用完整細胞的不含細胞之分析。

【0367】術語「離體」係指涉及對已自個體身體移除的細胞、組織及/或器官進行治療或執行程序的事件。適當地，細胞、組織及/或器官可利用手術或治療方法返回至個體體內。

【0368】術語「快速擴增」意謂抗原特異性TIL之數目在一週時間內增加至少約3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍)，更佳地在一週時間內增加至少約10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍)，或最佳在一週時間內增加至少約100倍。多種快速擴增方案描述於本文中。

【0369】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包括(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包括初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文所概述之獲自患者組織樣本的細胞(有時稱為「新鮮收集(freshly harvested)」)，且「繼代TIL」係任何如本文所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體，包括(但不限於)主體TIL(bulk TIL)及經擴增之

TIL(「REP TIL」或「REP後TIL」)。TIL細胞群體可包括經遺傳修飾之TIL。

【0370】本文中之「細胞群體」(包括TIL)意指許多具有共同特質之細胞。一般而言，群體數目在1×10^6至1×10^{10}之範圍內，其中不同的TIL群體包含不同數目。例如，初代TIL在IL-2的存在下的初始生長產生大約1×10^8個細胞之主體TIL群體。一般進行REP擴增以提供1.5×10^9至1.5×10^{10}個細胞群體用於輸注。

【0371】本文中「冷凍保存之TIL」意謂在約-150℃至-60℃之範圍內處理且儲存TIL，無論係初代的、主體的或經擴增的(REP TIL)。用於冷凍保存之通用方法亦描述於本文別處，包括在實例中。為了清楚起見，「冷凍保存之TIL」可與可用作初代TIL來源之冷凍組織樣本區分。

【0372】本文之「解凍之冷凍保存之TIL」意謂先前經冷凍保存且隨後處理以恢復至室溫或更高溫度(包括但不限於細胞培養溫度或可向患者投與TIL之溫度)的TIL群體。

【0373】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標記物)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標記物中之一或多者分類：CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地，TIL可藉由重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。

【0374】術語「冷凍保存培養基(cryopreservation media/cryopreservation medium)」係指可用於冷凍保存細胞之任何培養基。此類培養基可包括包含7%至10% DMSO之培養基。例示性培養基包括CryoStor CS10、HypoThermosol以及其組合。術語「CS10」係指獲自Stemcell Technologies或Biolife Solutions之冷凍保存培養基。CS10培養基可以商品名「CryoStor® CS10」來指代。CS10培養基為包含DMSO之無血清、無動物組分的培養基。

【0375】術語「中樞記憶T細胞」係指在人類中為CD45R0+且組成性表現CCR7 (CCR7^{hi})及CD62L (CD62^{hi})之T細胞子集。中樞記憶T細胞之表面表型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中樞記憶T細胞之轉錄因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2及BMI1。中樞記憶T細胞在TCR引發之後主要分泌IL-2及CD40L作為效應分子。中樞記憶T細胞主要存在於血液的CD4隔室中，且在人類中按比例富集於淋巴結及扁桃體中。

【0376】術語「效應記憶T細胞」係指人類或哺乳動物T細胞之子集，如中樞記憶T細胞，為CD45R0+，但已經失去對CCR7的組成性表現(CCR7^{lo})且對於CD62L表現而言為異質的或低的(CD62L^{lo})。中樞記憶T細胞之表面表型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中樞記憶T細胞之轉錄因子包括BLIMP1。效應記憶T細胞在抗原刺激之後快速分泌高含量發炎性細胞介素，包括干擾素-γ、IL4-及

IL-5。效應記憶T細胞主要存在於血液的CD8隔室中，且在人類中按比例富集於肺、肝臟及腸道中。CD8+效應記憶T細胞攜帶大量的穿孔素。

【0377】術語「密閉系統」係指對外部環境密閉之系統。適用於細胞培養方法之任何密閉系統均可用於本發明之方法。密閉系統包括例如(但不限於)密閉G容器。一旦將腫瘤區段添加至密閉系統中，該系統不對外部環境開放，直至TIL準備好向患者投與為止。

【0378】如本文所用，術語「碎斷(fragmenting)」、「碎片(fragment)」及「碎斷的(fragmented)」描述將腫瘤破壞之過程，包括機械碎斷方法，諸如壓碎、切片、分割及粉碎腫瘤組織，以及任何其他用於破壞腫瘤組織之物理結構的方法。

【0379】術語「周邊血液單核細胞」及「PBMC」係指具有圓形細胞核之周邊血液細胞，包括淋巴球(T細胞、B細胞、NK細胞)及單核球。當用作抗原呈現細胞(PBMC為一種類型之抗原呈現細胞)時，周邊血液單核細胞較佳地係經輻照之同種異體周邊血液單核細胞。

【0380】術語「周邊血液淋巴球」及「PBL」係指自周邊血液擴增的T細胞。在一些實施例中，PBL係與來自供體之全血或血球分離產物分離。在一些實施例中，PBL係藉由正向或負向選擇T細胞表型(諸如CD3+CD45+之T細胞表型)而與來自供體之全血或血球分離產物分離。

【0381】術語「抗CD3抗體」係指針對成熟T細胞之T

細胞抗原受體中之CD3受體的抗體或其變異體，例如單株抗體，且包括人類、人類化、嵌合或鼠類抗體。抗CD3抗體包括OKT-3，亦稱為莫羅單抗。抗CD3抗體亦包括UHCT1殖株，亦稱為T3及CD3ε。其他抗CD3抗體包括例如奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizuma)及維西珠單抗(visilizumab)。

【0382】術語「OKT-3」(在本文中亦被稱作「OKT3」)係指針對成熟T細胞之T細胞抗原受體中之CD3受體的單株抗體或其生物類似物或變異體，包括人類、人類化、嵌合或鼠類抗體，且包括市售形式，諸如OKT-3(30 ng/mL，MACS GMP CD3純，美國加利福尼亞州聖地亞哥美天旎生物技術有限公司(Miltenyi Biotech, Inc.))及莫羅單抗或其變異體、保守胺基酸取代、糖型或生物類似物。莫羅單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列在表1中給出(SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2)。能夠產生OKT-3之融合瘤寄存於美國菌種保藏中心(美國菌種保藏中心)且所指派之ATCC寄存號為CRL 8001。能夠產生OKT-3之融合瘤亦寄存於歐洲認證細胞培養物保藏中心(European Collection of Authenticated Cell Cultures；ECACC)且所指派之目錄號為86022706。

【0383】

表 1. 莫羅單抗 (例示性OKT-3抗體)之胺基酸序列

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:1 莫羅單抗重鏈	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 莫羅單抗輕鏈	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

【0384】術語「IL-2」(在本文中亦稱為「IL2」)係指稱為介白素-2之T細胞生長因子，且包括所有形式之IL-2，包括人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖型、生物類似物及其變異體。IL-2係描述於例如Nelson的《免疫學雜誌(*J. Immunol.*)》2004, *172*, 3983-88及Malek, 《免疫學年度評論(*Annu. Rev. Immunol.*)》2008, *26*, 453-79，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之重組人類IL-2之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:3)。舉例而言，術語IL-2涵蓋人類重組形式之IL-2，諸如阿地介白素(PROLEUKIN，可購自多個供應商，每單次使用小瓶含22百萬IU)以及由美國新罕布什爾州次茅斯的CellGenix, Inc.或美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-209-b)供應的重組IL-2形式及來自其他供應商的其他商業等效物。阿地介白素(去丙胺醯基-1，絲胺酸-125人類IL-2)為分子量大約15 kDa之非糖基化人類重組形式的IL-2。適用於本發明之阿地介白素之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:4)。術語IL-2亦涵蓋如本文所描述之聚乙二醇化形式的IL-2，包括聚乙二醇

化IL2前藥貝培阿地介白素(bempegaldesleukin)(NKTR-214，如同SEQ ID NO:4之聚乙二醇化人類重組IL-2，其中平均6個離胺酸殘基係經[(2,7-雙{[甲基聚(氧乙烯)]胺基甲醯基}-9H-芴-9-基)甲氧基]羰基取代的N^6)，其可購自美國加利福尼亞州南舊金山的Nektar Therapeutics，或可藉由本領域中已知之方法製備，諸如國際專利申請公開案第WO 2018/132496 A1號之實例19中描述之方法或美國專利申請公開案第US 2019/0275133 A1號之實例1中描述之方法，該等公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之貝培阿地介白素(NKTR-214)及其他聚乙二醇化IL-2分子描述於美國專利申請公開案第US 2014/0328791 A1號及國際專利申請公開案第WO 2012/065086 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之替代形式的結合IL-2描述於美國專利第4,766,106號、第5,206,344號、第5,089,261號及第4,902,502號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之IL-2調配物描述於美國專利第6,706,289號中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0385】在一些實施例中，適合用於本發明之IL-2形式為可購自Synthorx, Inc.之THOR-707。THOR-707及適用於本發明之另外替代形式之IL-2的製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2020/0181220 A1號及第US 2020/0330601 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為介白

素2(IL-2)結合物，其包含：分離及純化之IL-2多肽；及在選自以下之胺基酸位置結合至分離及純化之IL-2多肽的結合部分：K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107，其中胺基酸殘基之編號對應於SEQ ID NO:5。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自R38及K64。在一些實施例中，胺基酸位置選自E61、E62及E68。在一些實施例中，胺基酸位置在E62。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成離胺酸、半胱胺酸或組胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成半胱胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成離胺酸。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成非天然胺基酸。在一些實施例中，非天然胺基酸包含N6-疊氮基乙氧基-L-離胺酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-離胺酸(PraK)、BCN-L-離胺酸、降冰片烯離胺酸、TCO-離胺酸、甲基四嗪離胺酸、烯丙氧基羰基離胺酸、2-

胺基-8-側氧基壬酸、2-胺基-8-側氧基辛酸、對乙醯基-L-苯丙胺酸、對疊氮基甲基-L-苯丙胺酸(pAMF)、對碘-L-苯丙胺酸、間乙醯基苯丙胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、對炔丙基氧基苯丙胺酸、對炔丙基-苯丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、L-多巴(L-Dopa)、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、對疊氮基-L-苯丙胺酸、對醯基-L-苯丙胺酸、對苯甲醯基-L-苯丙胺酸、對溴苯基丙胺酸、對胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、O-烯丙基酪胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、膦醯基酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcp-絲胺酸、L-磷絲胺酸、膦醯基絲胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、2-胺基-3-((2-((3-(苯甲氧基)-3-側氧基丙基)胺基)乙基)硒烷基)丙酸、2-胺基-3-(苯基硒烷基)丙酸或硒半胱胺酸。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，IL-2結合物與IL-2受體α(IL-2Rα)次單元之親和力降低。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係與IL-2Rα之結合親和力降低約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或大於99%。在一些實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍、1000倍或更大。在一些實施例中，結合部分削弱或阻斷IL-2與IL-2Rα之結合。在一些實施例中，結合部分包含水溶性聚合物。在一些實施例中，另外的結合部分包含水溶性聚合物。在一些實施例中，水溶性聚合物各

獨立地包含聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇及丙二醇之共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯啶酮)、聚(羥烷基甲基丙烯醯胺)、聚(羥烷基甲基丙烯酸酯)、聚(醣)、聚(α-羥基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷氮烯、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯醯吗啉)或其組合。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含PEG。在一些實施例中，PEG為線性PEG或分支鏈PEG。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含多醣。在一些實施例中，多醣包含聚葡萄糖、聚唾液酸(PSA)、玻尿酸(HA)、直鏈澱粉、肝素、硫酸乙醯肝素(HS)、糊精或羥乙基澱粉(HES)。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含聚醣。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含多元胺。在一些實施例中，結合部分包含蛋白質。在一些實施例中，另外的結合部分包含蛋白質。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包含白蛋白、轉鐵蛋白(transferrin)或運甲狀腺素蛋白(transthyretin)。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包含Fc部分。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包含IgG之Fc部分。在一些實施例中，結合部分包含多肽。在一些實施例中，另外的結合部分包含多肽。在一些實施例中，多肽各獨立地包含XTEN肽、富甘胺酸高胺基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、彈性蛋白樣多肽(ELP)、CTP肽或明膠樣蛋白質(GLK)聚合物。在一些實施例中，分離及純化之IL-2多肽藉由麩胺醯化修飾。在一些實施例中，結合部分直接結合至分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，

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

酸N-琥珀醯亞胺酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀醯亞胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯(sMPT)、磺基琥珀醯亞胺基-6-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯醯胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBs)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBs)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(sIAB)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sIAB)、琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)琥珀醯亞胺酯(GMBs)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-GMBs)、6-((碘乙醯基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIAX)、6-[6-(((碘乙醯基)胺基)己醯基)胺基]己酸琥珀醯亞胺酯(sIAXX)、4-(((碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(sIAC)、6-(((((4-碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-羰基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIACX)、碘乙酸對硝苯酯(NPIA)、羰基反應性及硫氫基反應性交聯劑，諸如4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸醯肼(MPBH)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-醯肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫基)丙醯基醯肼(PDPH)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-疊氮柳酸(NHs-AsA)、N-

羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-疊氮水楊酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-(4-疊氮柳基醯胺基己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(對疊氮柳基醯胺基)乙基-1,3′-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(HsAB)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀醯亞胺基-6-(4′-疊氮基-2′-硝基苯基胺基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-疊氮基-2-硝基苯甲醯氧基丁二醯亞胺(ANB-NOs)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(間疊氮基-鄰硝基苯甲醯胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAND)、N-琥珀醯亞胺基-4(4-疊氮苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、(4-疊氮苯基)-1,3'-二硫丙酸N-磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sADP)、4-(對疊氮苯基)丁酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAPB)、2-(7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙醯胺)乙基-1,3'-二硫丙酸磺基琥珀醯亞胺酯(sAED)、7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAMCA)、重氮丙酮酸對硝苯酯(ρNPDP)、對硝苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(對疊氮基柳基醯胺基)-4-(碘乙醯胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙醯胺、對疊氮基苯甲醯基醯肼(ABH)、4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁胺(AsBA)或對疊氮苯基乙二醛(APG)。在一些實施例中，連接子包含可裂解連接子，視情況包含二肽連接子。在一些實施例中，二肽連接子包含Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或

Val-Lys。在一些實施例中，連接子包含不可裂解連接子。在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺基，視情況包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。在一些實施例中，連接子進一步包含間隔子。在一些實施例中，間隔子包含對胺基苯甲基醇(PAB)、對胺基苯甲氧基羰基(PABC)、其衍生物或類似物。在一些實施例中，結合部分能夠延長IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，另外的結合部分能夠延長IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為本文所描述之任一種IL-2形式的片段。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式係如美國專利申請公開案US 2020/0181220 A1號及美國專利申請公開案US 2020/0330601 A1號中所揭示般聚乙二醇化。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少80%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，IL-2多肽包含相對於SEQ ID NO:5之一個殘基的N端缺失。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式缺乏IL-2R α鏈接

合，但保持與中間親和力IL-2R β-γ傳訊複合物的正常結合。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少90%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-迭氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少98%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。

【0386】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式之奈瓦紐金α(亦稱為ALKS-4230(SEQ ID NO:6)，其購自阿

爾凱默斯公司(Alkermes, Inc.))。奈瓦紐金α亦被稱為人類介白素2片段(1-59)變異體($Cys^{125}>Ser^{51}$)，其經由肽基連接子($^{60}GG^{61}$)融合至人類介白素2片段(62-132)，其經由肽基連接子($^{133}GSGGGS^{138}$)融合至人類介白素2受體α鏈片段(139-303)，在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中產生，經糖基化；人類介白素2(IL-2)(75-133)-肽[Cys^{125}(51)>Ser]-突變體(1-59)，其經由G_2肽連接子(60-61)融合至人類介白素2(IL-2)(4-74)-肽(62-132)且經由GSG_3S肽連接子(133-138)融合至人類介白素2受體α鏈(IL2R次單位α、IL2Rα、IL2RA)(1-165)-肽(139-303)，在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中產生，糖型α。奈瓦紐金α之胺基酸序列係以SEQ ID NO:6給出。在一些實施例中，奈瓦紐金α展現以下轉譯後修飾：在以下位置處之雙硫橋鍵：31-116、141-285、184-242、269-301、166-197或166-199、168-199或168-197(使用SEQ ID NO:6中之編號)，及使用SEQ ID NO:6中之編號在位置N187、N206、T212處之糖基化位點。奈瓦紐金α之製備及特性以及適用於本發明之IL-2的另外替代形式描述於美國專利申請公開案號US 2021/0038684 A1**及美國專利號**10,183,979中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為與SEQ ID NO:6具有至少80%、至少90%、至少95%或至少90%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式具有SEQ ID NO:6中所載之胺基酸序列或其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為

包含SEQ ID NO:7之胺基酸24-452或其變異體、片段或衍生物的融合蛋白。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包含與SEQ ID NO:7之胺基酸24-452或其變異體、片段或衍生物具有至少80%、至少90%、至少95%或至少90%序列一致性之胺基酸序列的融合蛋白。適合用於本發明之其他IL-2形式描述於美國專利第10,183,979號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。視情況，在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包含第一融合搭配物之融合蛋白，該第一融合搭配物藉由黏蛋白域多肽連接子與第二融合搭配物連接，其中該第一融合搭配物為IL-1Rα或與IL-1Rα具有至少98%胺基酸序列一致性且具有IL-Rα的受體拮抗劑活性的蛋白質，並且其中第二融合搭配物包含全部或部分包含Fc區的免疫球蛋白，其中該黏蛋白域多肽連接子包含SEQ ID NO:8或與SEQ ID NO:8具有至少90%序列一致性的胺基酸序列，且其中融合蛋白的半衰期與第一融合搭配物在沒有黏蛋白域多肽連接子的情況下與第二融合搭配物的融合相比有所改良。

表 2. 介白素之胺基酸序列。

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

【0387】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式包括抗體細胞介素移植蛋白質，該抗體細胞介素移植蛋白質包含：重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該抗體細胞介素移植蛋白質優先於調節性T細胞擴增T效應細胞，在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、

LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該IL-2分子為突變蛋白，且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，IL-2方案包含投與美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中所描述之抗體，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含：重鏈可變區(VH)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(VL)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中；其中該IL-2分子為突變蛋白，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞，且其中該抗體進一步包含IgG類重鏈及IgG類輕鏈，其選自由以下組成之群組：包含SEQ ID NO:39之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:38之IgG類重鏈；包含SEQ ID NO:37之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:29之IgG類重鏈；包含SEQ ID NO:39之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:29之IgG類重鏈；及包含SEQ ID NO:37之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:38之IgG類重鏈。

【0388】在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR1中，其中IL-2

分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。

【0389】IL-2分子之插入可在CDR之N端區處或附近，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含併入CDR中之IL-2分子，其中IL2序列不會將CDR序列框移。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含併入CDR中之IL-2分子，其中IL-2序列置換CDR序列之全部或一部分。IL-2分子置換可在CDR之N端區域處，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區域處或附近。IL-2分子置換可少至CDR序列或整個CDR序列之一或兩個胺基酸。

【0390】在一些實施例中，IL-2分子直接移植至無肽連接子之CDR中，CDR序列與IL-2序列之間沒有另外的胺基酸。在一些實施例中，IL-2分子間接移植至具有肽連接子之CDR中，其中CDR序列與IL-2序列之間存在一或多個另外的胺基酸。

【0391】在一些實施例中，本文所描述之IL-2分子為IL-2突變蛋白。在一些情況下，IL-2突變蛋白包含R67A取代。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包含美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中表1中的胺基酸序列，該公開案之揭示內容以引用之方式併

入本文。

【0392】在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含選自由SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:25組成之群組的HCDR1。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含選自由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:16組成之群組的HCDR1。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含選自由以下組成之群組的HCDR1：選自由SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:26組成之群組的HCDR2。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含選自由SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:27組成之群組的HCDR3。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含V_H區，其包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含V_L區，其包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含輕鏈，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含V_H區，其包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列；及V_L區，其包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列的。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈區，其包含

SEQ ID NO:29之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號之IgG.IL2F71A.H1或IgG.IL2R67A.H1或其變異體、衍生物或片段，或其保守胺基酸取代，或與其具有至少80%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白之抗體組分包含帕利珠單抗之免疫球蛋白序列、構架序列或CDR序列。在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素或可比分子)長。在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白具有如表3中所闡述之序列。

表 3：例示性帕利珠單抗體-IL-2 移植蛋白之序列

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
SEQ ID NO:14 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
SEQ ID NO:15 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
SEQ ID NO:16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
SEQ ID NO:17 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
SEQ ID NO:18 HCDR3	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:19 HCDR1_IL-2 kabat	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
SEQ ID NO:20 HCDR2 kabat	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
SEQ ID NO:21 HCDR3 kabat	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:22 HCDR1_IL-2 clothia	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
SEQ ID NO:23 HCDR2 clothia	WWDDK 5
SEQ ID NO:24 HCDR3 clothia	SMITNWYFDV 10
SEQ ID NO:25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143
SEQ ID NO:26 HCDR2 IMGT	IWWDDKK 7
SEQ ID NO:27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12
SEQ ID NO:28 V_H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSS 253
SEQ ID NO:29 重鏈	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300

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

【0393】術語「IL-4」(在本文中亦稱「IL4」)係指被稱為介白素4之細胞介素，其由Th2 T細胞及嗜酸性球、嗜鹼性球及肥大細胞產生。IL-4調節初始輔助T細胞(Th0細胞)分化成Th2 T細胞。Steinke及Borish，《呼吸研究(*Respir. Res.*)》2001, 2, 66-70。在由IL-4活化後，Th2 T細胞隨後以正回饋迴路產生另外IL-4。IL-4亦刺激B細胞增殖及II類MHC表現，且誘導來自B細胞之類別轉換至IgE及IgG1表現。適用於本發明之重組人類IL-4可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-211)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(ThermoFisher Scientific,

Inc.)(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco CTP0043)。適用於本發明之重組人類IL-4之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:9)。

【0394】術「IL-7」(在本文中亦稱為「IL7」)係指稱為介白素7的糖基化的組織衍生性細胞介素，其可獲自基質及上皮細胞以及樹突狀細胞。Fry及Mackall，《血液(*Blood*)》2002，*99*，3892-904。IL-7可刺激T細胞的發育。IL-7與IL-7受體(一種由IL-7受體α及共同γ鏈受體組成之異二聚體)結合，其屬於對於T細胞在胸腺內之發育及在周邊內之存活而言重要之一系列信號。適用於本發明之重組人類IL-7可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-254)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco PHC0071)。適用於本發明之重組人類IL-7之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:10)。

【0395】術語「IL-15」(在本文中亦稱為「IL15」)係指稱為介白素-15之T細胞生長因子，且包括所有形式之IL-2，包括人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖型、生物類似物及其變異體。IL-15描述於例如Fehniger及Caligiuri的《血液》2001, 97, 14-32中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-15與IL-2共用β及γ傳訊受體次單位。重組人類IL-15為 分子質量為12.8 kDa的含有114個胺基酸(及N端甲硫胺酸)的單一非糖基化多肽鏈。重組人類IL-15可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克

的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-230-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號34-8159-82)。適用於本發明之重組人類IL-15之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:11)。

【0396】術語「IL-21」(在本文中亦稱為「IL21」)係指稱為介白素-21之多效性細胞介素蛋白，且包括所有形式之IL-21，包括人類及哺乳動物形式、保守胺基酸取代、糖型、生物類似物及其變異體。IL-21描述於例如Spolski及Leonard，《自然綜述：藥物發現(*Nat. Rev. Drug. Disc.*)》2014, *13*, 379-95，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-21主要藉由自然殺手T細胞及經活化之人類$CD4^+$ T細胞產生。重組人類IL-21為分子質量為15.4 kDa之含有132個胺基酸的單一非糖基化多肽鏈。重組人類IL-21可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-408-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-21重組蛋白，目錄號14-8219-80)。適用於本發明之重組人類IL-21之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:12)。

【0397】當指示「抗腫瘤有效量」、「腫瘤抑制有效量」或「治療量」時，本發明之組合物待投與的精確量可由醫師考慮患者(個體)之年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移程度及病狀的個別差異來確定。通常說明本文所描述之包含腫瘤浸潤性淋巴球(例如繼代TIL或遺傳修飾之細胞毒性淋巴球)的醫藥組合物可以10^4至10^{11} 個細胞/公斤體

重(例如，10^5至10^6、10^5至10^{10}、10^5至10^{11}、10^6至10^{10}、10^6至10^{11}、10^7至10^{11}、10^7至10^{10}、10^8至10^{11}、10^8至10^{10}、10^9至10^{11}或10^9至10^{10}個細胞/公斤體重)的劑量投與，包括在彼等範圍內之所有整數值。TIL(在一些情況下包括經遺傳修飾之細胞毒性淋巴球)組合物亦可以此等劑量多次投與。TIL(在一些情況下包括經基因工程改造之TIL)可藉由使用免疫療法中通常已知之輸注技術進行投與(參見例如Rosenberg等人，《新英格蘭醫學雜誌》*1988*, 319, 1676)。特定患者之最佳劑量及治療方案可容易由所屬醫藥領域中具有通常知識者藉由監測患者之疾病病徵且相應地調整治療來確定。

【0398】術語「血液惡性病(hematological malignancy/ hematologic malignancy)」或有相關意義之術語係指哺乳動物造血及淋巴組織(包括但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統之組織)的癌症及腫瘤。血液惡性病亦稱為「液體腫瘤」。血液惡性病包括(但不限於)急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性淋巴瘤(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤。術語「B細胞惡性血液病」係指影響B細胞之血液惡性病。

【0399】術語「液體腫瘤」係指性質上為流體的異常細胞團塊。液體腫瘤癌症包括(但不限於)白血病、骨髓瘤及淋巴瘤，以及其他血液惡性病。獲自液體腫瘤之TIL在

本文中亦可稱為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。獲自液體腫瘤(包括在周邊血液中循環之液體腫瘤)之TIL在本文中亦可稱為PBL。術語MIL、TIL及PBL在本文中可互換使用且僅基於衍生細胞之組織類型而有所不同。

【0400】如本文所用，術語「微環境」可指作為整體之實體或血液腫瘤微環境或可指在微環境內之個別細胞子集。如本文所用，腫瘤微環境係指以下之複雜混合物：「促進贅生性轉化、支援腫瘤生長及侵襲、保護腫瘤不受宿主免疫力影響、鼓勵治療抗性且提供顯性轉移茁壯成長之生態棲位(niche)之細胞、可溶因子、傳訊分子、細胞外基質及機械信號」，如Swartz等人，《癌症研究(*Cancer Res.*)》, 2012, *72*, 2473中所描述。儘管腫瘤表現應由T細胞識別之抗原，但由於微環境之免疫抑制，免疫系統清除腫瘤的情況係罕見的。

【0401】在一些實施例中，本發明包括一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，可提供TIL群體，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，在根據本發明之非骨髓清除式化療及TIL輸注之後(第0天)，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2的靜脈內輸注以達到生理耐受。

【0402】實驗發現表明，在授受性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗盡藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(「細胞介素庫」)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【0403】術語「有效量」或「治療有效量」係指如本文所描述之化合物或化合物組合之量，其足以實現所預期應用，包括但不限於疾病治療。治療有效量可視預期應用(活體外或活體內)或所治療之個體及疾病病狀(例如，個體之體重、年齡及性別)、疾病病狀之嚴重程度或投與方式而變化。該術語亦適用於將誘發目標細胞中之特定反應(例如血小板黏附及/或細胞遷移減少)之劑量。特定劑量將視以下而變化：所選特定化合物、所依循之給藥方案、化合物是否與其他化合物組合投與、投與時序、其所投與之組織及其中攜帶化合物之物理遞送系統。

【0404】術語「治療(treatment/treating/treat)」及其類似術語係指獲得所要的藥理學及/或生理學效應。該效應就完全或部分預防疾病或其症狀而言可具預防性，及/或就部分或完全治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不良影響而言可具治療性。如本文所用，「治療」涵蓋哺乳動物、尤其人類之疾病之任何治療，且包括：(a)預防可能易患疾病但尚未診斷出患有該疾病之個體中出現該疾病；(b)抑制疾病，亦即遏制其發展或進展；及(c)緩解疾病，

亦即促使疾病消退及/或緩解一或多種疾病症狀。「治療」亦意欲涵蓋遞送試劑以便提供藥理學效應，即使在不存在疾病或病狀之情況下亦如此。舉例而言，「治療」涵蓋可在不存在疾病病狀之情況下(例如在疫苗之情況下)引發免疫反應或賦予免疫性的組合物之遞送。

【0405】當參考核酸或蛋白質之部分使用時，術語「異源」指示核酸或蛋白質包含兩個或更多個在自然界中發現彼此之間沒有相同關係的子序列。舉例而言，通常以重組方式產生核酸，其具有兩個或更多個來自無關基因的經佈置以製造新的功能性核酸序列的序列，例如來自一個來源之啟動子及來自另一來源之編碼區或來自不同來源之編碼區。類似地，異源蛋白指示蛋白質包含兩個或更多個在自然界中未發現彼此呈相同關係之子序列(例如融合蛋白)。

【0406】在兩個或更多個核酸或多肽之上下文中，術語「序列一致性(sequence identity)」、「一致性百分比(percent identity)」及「序列一致性百分比(sequence percent identity)」(或其同義詞，例如「99%一致」)係指兩個或更多個序列或子序列在進行比較及排比(需要時引入間隔)以達到最大對應性且不將任何保守胺基酸取代視為序列一致性之部分時，該兩個或更多個序列或子序列係相同的或具有相同的特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可使用序列比較軟體或演算法或藉由目視檢查來量測。所屬領域中已知可用於獲得胺基酸或核苷酸序

列之排比的各種演算法及軟體。用以判測序列一致性百分比之適合的程式包括例如可購自美國政府的國家生物技術資訊中心(U.S. Government's National Center for Biotechnology Information)BLAST網站之BLAST套裝程式。兩個序列之間的比較可使用BLASTN或BLASTP演算法進行。BLASTN用於比較核酸序列，而BLASTP用於比較胺基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(美國加利福尼亞州南舊金山的基因泰克(Genentech))或MegAlign(可購自DNASTAR)係另外的可用於排比序列之可供大眾使用的軟體程式。本領域技術人員可以藉由特定的比對軟體來判定用於最大比對的適當參數。在某些實施例中，使用排比軟體的預設參數。

【0407】如本文所用，術語「變異體」涵蓋(但不限於)包含與參考抗體之胺基酸序列不同之胺基酸序列的抗體或融合蛋白，不同之處在於在參考抗體之胺基酸序列之內或相鄰的某些位置有一或多個取代、缺失及/或添加。與參考抗體之胺基酸序列相比，變異體可以在其胺基酸序列中包含一或多個保守取代。保守取代可涉及例如類似帶電或不帶電胺基酸之取代。變異體保留與參考抗體之抗原特異性結合的能力。術語變異體亦包括聚乙二醇化抗體或蛋白質。

【0408】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包括(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋

巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包括初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文所概述之獲自患者組織樣本的細胞(有時稱為「新鮮收集」),且「繼代TIL」係任何如本文所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體,包括(但不限於)主體TIL及經擴增之TIL(「REP TIL」)以及「reREP TIL」)。reREP TIL可包括例如第二擴增TIL或第二另外的擴增TIL(諸如例如於圖8之步驟D中描述的TIL,包括稱為reREP TIL之TIL)。

【0409】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標記物)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標記物中之一或多者分類:CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地,TIL可藉由其重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。TIL可進一步藉由效力表徵-例如若例如干擾素(IFN)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL,則TIL可視為強效的。若例如干擾素(IFN γ)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL、大於約300 pg/mL、大於約400 pg/mL、大於約500 pg/mL、大於約600 pg/mL、大於約700 pg/mL、大於約800 pg/mL、大於約900 pg/mL、大於約1000 pg/mL,則TIL可視為強效的。

【0410】術語「去氧核糖核苷酸」包涵天然的及合成

的、未經修飾的及經修飾的去氧核糖核苷酸。修飾包括改變糖部分、鹼基部分及/或寡核苷酸中去氧核糖核苷酸之間的連接。

【0411】術語「RNA」定義包含至少一個核糖核苷酸殘基的分子。「核糖核苷酸」定義在b-D-呋喃核糖部分之2'位置具有羥基的核苷酸。術語RNA包括雙股RNA、單股RNA、分離之RNA(諸如部分純化之RNA、基本上純RNA、合成RNA、以重組方式產生之RNA)以及藉由添加、缺失、取代及/或改變一或多種核苷酸而不同於天然存在之RNA的經改變之RNA。本文所描述之RNA分子中之核苷酸亦可包含非標準核苷酸，諸如非天然存在之核苷酸或化學合成之核苷酸或去氧核苷酸。此等改變之RNA可稱為類似物或天然存在之RNA的類似物。

【0412】術語「醫藥學上可接受之載劑」或「醫藥學上可接受之賦形劑」意欲包括任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑，以及惰性成分。此類醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑用於活性醫藥成分之用途為本領域中所熟知的。除非任何習知醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑與活性醫藥成分不相容，否則考慮其在本發明之治療組合物中之用途。諸如其他藥物之額外活性醫藥成分亦可併入所描述之組合物及方法中。

【0413】術語「約」或「大約」意指在值之統計學上有意義的範圍內。此範圍可在既定值或範圍之一數量級

內，較佳地50%內，更佳地20%內，再更佳地10%內，且甚至更佳地5%內。由術語「約」或「大約」涵蓋之允許差異取決於研究下之特定系統，且可由所屬領域中具有通常知識者容易地理解。此外，如本文所用，術語「約」及「大約」意指尺寸、大小、調配物、參數、形狀及其他數量(quantity)及特徵並不精確且不需要精確，而係可以視需要為近似值及/或較大或較小的，反映出公差、轉換因子、四捨五入、量測誤差等，以及本領域的技術人員已知的其他因素。一般而言，無論是否如此明確說明，尺寸、大小、調配物、參數、形狀或其他數量或特徵皆為「約」或「大約」的。應注意，大小、形狀及尺寸非常不同之實施例可採用所描述之佈置。

【0414】當以原始及修改形式用於所附申請專利範圍中時，過渡術語「包含(comprising)」、「基本上由...組成(consisting essentially of)」及「由...組成(consisting of)」相對於哪些未敍述之另外的請求項要素或步驟(若存在)被排除在申請專利範圍之範疇之外來定義請求項範疇。術語「包含」意欲為包括性的或開放性的，且不排除任何另外的、未敍述之要素、方法、步驟或材料。術語「由...組成」不包括除申請專利範圍中指定之要素、步驟或材料以外的任何要素、步驟或材料，且在後一情況中排除與指定材料一般相關之雜質。術語「基本上由...組成」將請求項之範疇限於所指定要素、步驟或材料及實質上不影響所主張發明之基礎及新穎特徵的要素、步驟或材料。

在替代實施例中，本文所描述之體現本發明之所有組合物、方法及套組可由任何過渡術語「包含」、「基本上由...組成」及「由...組成」更具體地定義。

【0415】術語「抗體(antibody)」及其複數形式「抗體(antibodies)」係指完整的免疫球蛋白及任何抗原結合片段(「抗原結合部分」)或其單鏈。「抗體」進一步係指包含藉由二硫鍵連接之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈之糖蛋白，或其抗原結合部分。各重鏈由重鏈可變區(在本文中縮寫為V_H)及重鏈恆定區構成。重鏈恆定區由三個域(CH1、CH2及CH3)構成。各輕鏈由輕鏈可變區(在本文中縮寫為V_L)及輕鏈恆定區構成。輕鏈恆定區由一個域C_L構成。抗體之V_H及V_L區可進一步細分成高變區，其稱為互補決定區(CDR)或高變區(HVR)，且其可穿插有更保守之區，稱為構架區(FR)。各V_H及V_L由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與一或多個抗原抗原決定基相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白結合於宿主組織或因子，包括免疫系統之多種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)。

【0416】術語「抗原」係指誘導免疫反應之物質。在一些實施例中，若藉由主要組織相容複合體(MHC)分子呈遞，則抗原為能夠與抗體或TCR結合之分子。如本文所用，術語「抗原」亦包涵T細胞抗原決定基。抗原另外能

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

【0417】術語「單株抗體」、「mAb」、「單株抗體組合物」或其複數形式係指單分子組合物的抗體分子的製劑。單株抗體組合物顯示針對特定抗原決定基之單一結合特異性及親和力。對某些受體具有特異性之單株抗體可使用以下技術中之知識及技術製得，即向測試個體注射適合抗原，且接著分離表現具有所需序列或功能特徵之抗體的融合瘤。編碼單株抗體之DNA容易使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合至編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及測序。融合瘤細胞充當此類DNA之較佳來源。DNA一經分離，則可置放於表現載體中，接著轉染至原本不產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組宿主細胞中達成單株抗體之合成。抗體之重組產生將在下文更詳細地描述。

【0418】如本文所用，術語抗體(或簡言之「抗體部分」或「片段」)之「抗原結合部分」或「抗原結合片

段」係指保持特異性結合至抗原之能力的抗體之一或多個片段。已顯示抗體之抗原結合功能可藉由全長抗體之片段執行。包涵在術語抗體之「抗原結合部分」內的結合片段的實例包括(i)Fab片段，由V_L、V_H、C_L及CH1域組成的單價片段；(ii)F(ab')2片段，一個二價片段，其包含在鉸鏈區藉由二硫橋鍵連接的兩個Fab片段；(iii)由V_H及CH1域組成的Fd片段；(iv)由抗體單組之V_L及V_H域組成的Fv片段；(v)域抗體(dAb)片段(Ward等人，《自然(*Nature*)》,1989, *341*, 544-546),其可能由一個V_H或一個V_L域組成；及(vi)分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域(V_L及V_H)經獨立基因編碼，但其可使用重組方法藉由合成連接子接合，該合成連接子能夠將其製造成V_L與V_H區配對以形成單價分子之單一蛋白鏈(被稱為單鏈Fv(scFv))；參見例如Bird等人，《科學(*Science*)》1988, *242*, 423-426；及Huston等人，《美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)》1988, *85*, 5879-5883)。此類scFv抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」內。此等抗體片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得，且以與完整抗體相同之方式來篩選供使用的片段。在一些實施例中，scFv蛋白域包含V_H部分及V_L部分。若V_L域係scFv分子之N端部分，則scFv分子表示為V_L-L-V_H，或若V_H域係scFv分子之N端部分，則表示為V_H-L-V_L.用於製得scFv分子及設計適合之肽連接子之方法描述於美國專利第4,704,692號；美國專利第4,946,778號；R. Raag及M.

Whitlow，「單鏈Fv(Single Chain Fvs.)」《美國實驗生物學學會聯合會(FASEB)》，第9卷:73-80 (1995)；及R. E. Bird及B. W. Walker，「單鏈抗體可變區(Single Chain Antibody Variable Regions)」，《生物技術趨勢(TIBTECH)》，第9卷: 132-137 (1991)中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0419】如本文中所使用，術語「人類抗體」意欲包括具有其中構架區及CDR區皆來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區的抗體。另外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列。本發明之人類抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。如本文中所使用，術語「人類抗體」並不意欲包括其中衍生自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上之抗體。

【0420】術語「人類單株抗體」係指具有可變區之呈現單一結合特異性之抗體，在可變區中構架與CDR區均源自人類生殖系免疫球蛋白序列。在一些實施例中，人類單株抗體係由融合瘤產生，該融合瘤包括與永生化細胞融合的自轉殖基因非人類動物(例如轉殖基因小鼠)獲得之B細胞，其具有包含人類重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因之基因體。

【0421】如本文中所使用，術語「重組人類抗體」包

括藉由重組手段製備、表現、產生或分離之全部人類抗體，該等人類抗體諸如(a)自對於人類免疫球蛋白基因而言轉殖基因或轉染色體之動物(諸如小鼠)或由其製備之融合瘤(在下文進一步描述)分離的抗體；(b)自經轉型以表現人類抗體之宿主細胞，例如自轉染瘤分離的抗體；(c)自重組、組合人類抗體庫分離的抗體；及(d)藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列之任何其他手段製備、表現、產生或分離的抗體。此類重組人類抗體具有構架區及CDR區來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，此類重組人類抗體可進行活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時，為活體內體細胞突變誘發)，且因此重組抗體之V_H及V_L區之胺基酸序列為雖然來源於人類生殖系V_H及V_L序列且與其相關，但活體內可不天然存在於人類抗體生殖系譜系內之序列。

【0422】如本文所用，「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類別(例如IgM或IgG1)。

【0423】片語「識別抗原之抗體」及「對抗原具有特異性之抗體」在本文中可與術語「與抗原特異性結合之抗體」互換使用。

【0424】術語「人類抗體衍生物」係指人類抗體之任何經修飾形式，包括抗體與另一活性醫藥成分或抗體之結合物。術語「結合物」、「抗體-藥物結合物」、「ADC」或「免疫結合物」係指與另一治療部分結合之抗

體或其片段，該治療部分可使用此項技術中可用之方法與本文所描述之抗體結合。

【0425】術語「人類化抗體(humanized antibody/humanized antibodies)」及「人類化」意欲指其中源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上的抗體。在人類構架序列中可作出其他構架區修飾。非人類(例如鼠類)抗體之人類化形式為含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體係人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體的高變區之殘基經來自諸如具有所需特異性、親和力及能力之小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)的15個高變區之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基置換為相應非人類殘基。此外，人類化抗體可包含在受體抗體或供體抗體中未發現之殘基。進行此等修飾以進一步優化抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上全部至少一個且通常兩個可變域，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環且全部或實質上全部FR區為人類免疫球蛋白序列之FR區。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常，人類免疫球蛋白之恆定區的至少一部分。關於其他細節，參見Jones等人，《自然》1986, *321*, 522-525；Riechmann等人，《自然》1988, *332*, 323-329；及Presta, 《結構生物學新見(*Curr. Op. Struct. Biol.*)》1992, *2*, 593-596。本文所描述之抗體亦可

經修飾以採用已知賦予效應功能及/或FcR結合改良(例如降低)之任何Fc變異體。Fc變異體可包括例如以下所揭示之胺基酸取代中之任一者：國際專利申請公開案第WO 1988/07089 A1號、第WO 1996/14339 A1、第WO 1998/05787 A1、第WO 1998/23289 A1、第WO 1999/51642 A1、第WO 99/58572 A1、第WO 2000/09560 A2、第WO 2000/32767 A1、第WO 2000/42072 A2、第WO 2002/44215 A2、第WO 2002/060919 A2、第WO 2003/074569 A2、第WO 2004/016750 A2、第WO 2004/029207 A2、第WO 2004/035752 A2、第WO 2004/063351 A2、第WO 2004/074455 A2、第WO 2004/099249 A2、第WO 2005/040217 A2、第WO 2005/070963 A1、第WO 2005/077981 A2、第WO 2005/092925 A2、第WO 2005/123780 A2、第WO 2006/019447 A1、第WO 2006/047350 A2及第WO 2006/085967 A2；及美國專利第5,648,260號；第5,739,277號；第5,834,250號；第5,869,046號；第6,096,871號；第6,121,022號；第6,194,551號；第6,242,195號；第6,277,375號；第6,528,624號；第6,538,124號；第6,737,056號；第6,821,505號；第6,998,253號；及第7,083,784號；其揭露內容以引用之方式併入本文中。

【0426】術語「嵌合抗體」意指可變區序列來源於一個物種且恆定區序列來源於另一物種之抗體，諸如可變區序列來源於小鼠抗體且恆定區序列來源於人類抗體之抗

體。

【0427】「雙功能抗體」為具有兩個抗原結合位點之小抗體片段。片段包含重鏈可變域(V_H)，其連接至相同多肽鏈(V_H-V_L或V_L-V_H)中之輕鏈可變域(V_L)。藉由使用過短以使得同一鏈上之兩個域之間不能配對的連接子，迫使域與另一條鏈之互補域配對，且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更充分地描述於例如歐洲專利第EP 404,097號，國際專利公開案第WO 93/11161號；及Bolliger等人，《美國國家科學院院刊》1993, *90*, 6444-6448。

【0428】術語「糖基化」係指抗體之經修飾之衍生物。非糖基化抗體缺乏糖基化。糖基化可經改變以例如提高抗體對抗原之親和力。此類碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來完成。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，以消除一或多個可變區構架糖基化位點，藉此消除該位點之糖基化。去糖基化可增加抗體對抗原之親和力，如美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中所描述。另外地或替代地，可產生糖基化類型改變之抗體，諸如岩藻糖基殘基量降低之低岩藻糖基化抗體或等分GlcNac結構增加之抗體。此類經改變之糖基化模式已證明會提高抗體之能力。此類碳水化合物修飾可藉由例如在具有改變之糖基化機構之宿主細胞中表現抗體來實現。糖基化機制改變之細胞在此項技術中已有描述且可用作表現本發明之重組抗體以藉此產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，細胞株Ms704、Ms705及Ms709缺

乏岩藻糖基轉移酶基因、FUT8(α (1,6)岩藻糖基轉移酶)，使得表現於Ms704、Ms705及Ms709細胞株中之抗體缺乏在其碳水化合物上之岩藻糖。Ms704、Ms705及Ms709 FUT8−/−細胞株係藉由使用兩種置換載體對CHO/DG44細胞中之FUT8基因的靶向斷裂而形成(參見美國專利公開案第2004/0110704號或Yamane-Ohnuki等人，《生物技術與生物工程(*Biotechnol. Bioeng.*)》，2004, *87*, 614-622)。作為另一實例，歐洲專利第EP 1,176,195描述一種具有功能性破壞之FUT8基因之細胞株，該FUT8基因編碼岩藻糖基轉移酶，使得此類細胞株中表現之抗體藉由減少或消除α1,6鍵相關酶而展現出低岩藻糖基化，且亦描述如下細胞株，該等細胞株具有用於將岩藻糖添加至結合至抗體Fc區之N-乙醯基葡糖胺的低酶活性或不具有酶活性，例如細胞株為大鼠骨髓瘤細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)。國際專利公開案WO 03/035835描述變異體CHO細胞株，即Lec 13細胞，其具有將岩藻糖附接至Asn(297)-連接之碳水化合物的降低能力，亦導致表現於彼宿主細胞中之抗體之低岩藻糖基化(亦參見Shields等人，《生物化學雜誌(*J. Biol. Chem.*)》2002, *277*, 26733-26740。國際專利公開案WO 99/54342描述經工程改造以表現醣蛋白修飾型醣基轉移酶(例如β(1,4)-N-乙醯基葡糖胺轉移酶III(GnTIII))之細胞株，使得經工程改造之細胞株內所表現之抗體展現增加之二分GlcNac結構，從而提高抗體之ADCC活性(亦參見Umana等人，《自然·生物技術(*Nat. Biotech.*)》1999, *17*,

176-180)。可替代地，抗體之岩藻糖殘基可使用岩藻糖苷酶裂解開。例如，岩藻糖苷酶α-L-岩藻糖苷酶自抗體中移除岩藻糖基殘基，如描述於Tarentino等人，《生物化學(*Biochem.*)》1975, *14*, 5516-5523中。

【0429】「聚乙二醇化」係指經修飾之抗體或其片段，其通常在一或多個PEG基團連接至抗體或抗體片段之條件下與聚乙二醇(PEG)，諸如PEG的反應性酯或醛衍生物反應。例如，聚乙二醇化可增加抗體之生物學(例如血清)半衰期。較佳地，聚乙二醇化經由與反應性PEG分子(或類似之反應性水溶聚合物)之醯化反應或烷基化反應來進行。如本文所用，術語「聚乙二醇」意欲涵蓋已用於衍生其他蛋白質之PEG形式中之任一者，諸如單(C_1-C_{10})烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。待聚乙二醇化之抗體為去糖基化抗體。聚乙二醇化方法係此項技術中已知的且可應用於本發明之抗體，如在歐洲專利第EP 0154316號及歐洲專利第EP 0401384號及美國專利第5,824,778號中描述的，其各自之揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0430】術語「生物類似物」係指一種生物產品，包括單株抗體或蛋白質，與美國許可參考生物產品高度相似，儘管臨床非活性組分的差異很小，且就產品之安全性、純度及效能而言，生物產品及參考產品之間無臨床意義的差異。此外，類似生物或「生物類似物」係一種與已被歐洲藥物管理局授權使用的另一生物藥物相似的生物藥

物。術語「生物類似物」亦藉由其他國家及地區監管機構同義地使用。生物產品或生物藥物係由生物來源(諸如細菌或酵母)製成或衍生的藥物。其可由相對較小分子(諸如人類胰島素或紅血球生成素)或複雜分子(諸如單株抗體)組成。舉例而言，若參考IL-2蛋白為阿地介白素(PROLEUKIN)，則由藥物監管機構批准之參考阿地介白素的蛋白質為阿地介白素之「生物類似物」或為阿地介白素「其生物類似物」。在歐洲，類似生物或「生物類似物」係一種與已被歐洲藥物管理局(EMA)授權使用的另一生物藥物相似的生物藥物。歐洲類似生物應用之相關法律依據係法規(EC)第726/2004號第6條及指令2001/83/EC第10(4)條，經修訂且因此在歐洲，生物類似物可根據法規(EC)第726/2004號第6條及指令2001/83/EC第10(4)條進行授權、批准的授權或授權申請的對象。經授權之原始生物醫藥產品在歐洲可被稱為」參考藥品」。CHMP關於類似生物醫藥產品之指南中概述了產品被視為係生物類似物的一些要求。此外，產品特定指南，包括與單株抗體生物類似物相關的指南，由EMA逐項產品提供，且發佈在其網站上。如本文所描述之生物類似物可藉助於品質特性、生物活性、作用機制、安全概況及/或功效與參考藥品類似。另外，生物類似物可使用或意欲用於治療與參考藥品相同之病況。因此，可認為如本文所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之品質特徵。替代地或另外，可認為如本文中所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度

類似之生物活性。替代地或另外，可認為如本文所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之品安全概況。替代地或另外，可認為如本文所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或高度類似之功效。如本文所描述，歐洲生物類似物與已由EMA授權之參考藥品相比較。然而，在一些情況下，生物類似物可與在某些研究中在歐洲經濟區以外獲得授權之生物學醫藥產品(非EEA授權之「比較物」)相比較。此類研究包括例如某些臨床及活體內非臨床研究。如本文所用，術語「生物類似物」亦關於已經授權或可與非經EEA授權之比較物比較之生物醫藥產品。某些生物類似物係蛋白質，例如抗體、抗體片段(例如，抗原結合部分)及融合蛋白。蛋白質生物類似物可具有胺基酸序列，該胺基酸序列在胺基酸結構中具有少量修飾(包括例如胺基酸之缺失、添加及/或取代)，其不顯著影響多肽之功能。生物類似物可包含與其參考藥品之胺基酸序列具有97%或更高序列一致性之胺基酸序列，例如97%、98%、99%或100%。生物類似物可包含一或多個轉譯後修飾，例如但不限於糖基化、氧化、去醯胺及/或截短，其不同於參考藥品之轉譯後修飾，其限制條件為差異不會引起醫藥產品之安全性及/或功效變化。生物類似物可具有與參考藥品相同或不同的糖基化模式。特定言之，雖然不排他性地，但若差異解決或意欲解決與參考藥品相關之安全問題，則生物類似物可具有不同糖基化模式。另外，生物類似物可在例如其強度、醫藥形式、調配物、賦形劑及

/或呈現方式等方面偏離參考藥品，前提係醫藥產品之安全性及功效不受影響。相比於參考藥品，生物類似物可包含例如藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)概況之差異，但仍視為與參考藥品充分類似，從而待授權或視為適合於授權。在某些情況下，生物類似物展現出與參考藥品相比不同之結合特徵，其中不同結合特徵藉由監管機構(諸如EMA)認為不係作為類似生物產品獲得授權的障礙。術語「生物類似物」亦藉由其他國家及地區監管機構同義地使用。

II. Gen 2 TIL製造過程

【0431】圖1及圖2中描繪一個例示性TIL程序系列，稱為Gen 2(亦被稱作過程2A)，其含有此等特徵中之一些。Gen 2之實施例如圖2所示。

【0432】如本文所論述，本發明可包括與冷凍保存之TIL的再刺激以增加其代謝活性且因此在移植至患者中之前相對健康相關的步驟，及測試該代謝健康之方法。如本文大體上概述，TIL一般獲自患者樣本且在移植至患者體內之前進行操作以擴增它們的數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。

【0433】在一些實施例中，TIL可經冷凍保存。解凍後，其亦可經再刺激以在輸注至患者中之前增加其代謝。

【0434】在一些實施例中，將第一擴增(包括稱為預REP之過程以及圖1中所示之作為步驟A之過程)縮短至3至

14天，且將第二擴增(包括稱為REP之過程以及圖1中所示之作為步驟B之過程)縮短至7至14天，如下文以及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，第一擴增(例如圖1中步驟B描述之擴增)縮短為11天，第二擴增(例如圖1中步驟D中描述之擴增)縮短為11天。在一些實施例中，第一擴增及第二擴增之組合(例如，在圖1中描述為步驟B及步驟D之擴增)縮短至22天，如下文及實施例之圖式中所詳細討論。

【0435】下文「步驟」標示A、B、C等參考圖1且參考本文描述之某些實施例。以下步驟及圖1中之步驟次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及另外的步驟、步驟重複及/或步驟省略。

A.步驟A：獲得患者腫瘤樣本

【0436】一般而言，TIL最初獲自患者腫瘤樣本且隨後擴增成用於如本文所描述之進一步操縱、視情況如本文所概述之低溫保存、再刺激，且視情況評估作為TIL健康之指標的表型及代謝參數的更大群體。

【0437】患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，一般經由手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得。在一些實施例中，使用多病灶取樣。在一些實施例中，手術切除、針吸活體組織

切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式包括多病灶取樣(亦即，自患者中之一或多個腫瘤部位及/或位置以及在相同位置或緊密相鄰的一或多個腫瘤處獲得樣本)。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包括原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可以係肺組織。在一些實施例中，適用之TIL獲自非小細胞肺癌(NSCLC)。實體腫瘤可以係皮膚組織。在一些實施例中，適用之TIL獲自黑色素瘤。

【0438】一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷成1 mm^3至約8 mm^3之間的小片，其中約2 mm^3至3 mm^3為尤其適用的。在一些實施例中，使用酶素性腫瘤碎解物自此等碎片培養TIL。此類腫瘤碎解物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素(gentamicine)、30單位/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，接著進行機械解離(例如使用組織解離器)來產生。腫瘤碎解物可藉由以下產生：將腫瘤置放於酶素性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及培育循環，直至僅存在小組織片。在此過程結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用FICOLL分支鏈親水性多醣之密度梯度分離以移除此等細

胞。可使用本領域中已知之替代方法，諸如美國專利申請公開案第2012/0244133 A1號中所描述之方法，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所描述之任何實施例中擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【0439】腫瘤解離酶混合物可包括一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包括任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶(hyaluronidase)、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)、胰蛋白酶(trypsin)、酪蛋白酶(caseinase)、彈性蛋白酶(elastase)、木瓜酶(papain)、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶(pronase))、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0440】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如HBSS)中重構。

【0441】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 mL至15 mL緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL，例如，約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約350 PZ U/mL、約100

PZ U/mL至約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL或約400 PZ U/mL。

【0442】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/mL至約400 DMC/mL，例如，約100 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL至約350 DMC/mL、約100 DMC/mL至約300 DMC/mL、約150 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL或約400 DMC/mL。

【0443】在一些實施例中，DNA酶I係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/mL至10 KU/mL，例如約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6

KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL或約10 KU/mL。

【0444】在一些實施例中，酶之儲備液係可變的且可能需要確定濃度。在一些實施例中，可檢驗凍乾儲備液之濃度。在一些實施例中，添加至消化混合物中之酶之最終量係基於所確定之儲備液濃度調節。

【0445】在一些實施例中，酶混合物包括約4.7 mL無菌HBSS中的約10.2 ul中性蛋白酶(0.36 DMC U/mL)、21.3 μL膠原蛋白酶(1.2 PZ/mL)及250 ul DNA酶I(200 U/mL)。

【0446】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷且以全腫瘤進行酶素性碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤碎解反應混合物。

【0447】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶

重構腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【0448】在一些實施例中，酶混合物包含膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備液為100 mg/mL 10×工作儲備液。

【0449】在一些實施例中，酶混合物包含DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備液為10,000 IU/mL 10×工作儲備液。

【0450】在一些實施例中，酶混合物包含玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備液為10 mg/mL 10×工作儲備液。

【0451】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL膠原蛋白酶、1000 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0452】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL膠原蛋白酶、500 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0453】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【0454】在一些實施例中，碎斷包括物理碎斷，包括例如分割以及碎解。在一些實施例中，碎斷為物理碎斷。在一些實施例中，碎斷為分割。在一些實施例中，碎斷係藉由碎解。在一些實施例中，TIL最初可自酶素性腫瘤碎解物培養且腫瘤碎片自碎解或碎斷獲自患者之腫瘤樣本獲得。

【0455】在一些實施例中，在腫瘤係實體腫瘤時，腫

瘤在例如步驟A(如圖1中所提供)中獲得腫瘤樣本之後經歷物理碎段。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，碎斷在獲得腫瘤之後且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將10、20、30、40或更多個碎片或片置於各容器中以進行第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將30或40個碎片或片置於各容器中以進行第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將40個碎片或片置於各容器中以進行第一擴增。在一些實施例中，多個碎片包含約4個至約50個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包含約30個至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包含約50個碎片，其總體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包含約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個碎片包含約4個碎片。

【0456】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎片。在一些實施例中，腫瘤碎片係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約6 mm^3。

在一些實施例中，腫瘤碎片為約7 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤為1-4 mm×1-4 mm×1-4 mm。在一些實施例中，腫瘤為1 mm×1 mm×1 mm。在一些實施例中，腫瘤為2 mm×2 mm×2 mm。在一些實施例中，腫瘤為3 mm×3 mm×3 mm。在一些實施例中，腫瘤為4 mm×4 mm×4 mm。

【0457】在一些實施例中，腫瘤經切除以使各片上出血性、壞死及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經切除以使各片上出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經切除以使各片上壞死組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經切除以使各片上脂肪組織之量減至最小。

【0458】在一些實施例中，進行腫瘤碎斷以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切動作的情況下進行腫瘤碎斷。在一些實施例中，TIL獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術有限公司的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且其接著再次機械破壞大致1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分

鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，若在第三次機械破壞後大片組織仍存在，則可施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，若在最終培育結束時細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用菲科爾(Ficoll)之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0459】在一些實施例中，將第一擴增步驟之前收集的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【0460】在一些實施例中，細胞可視情況在樣本收集之後冷凍且在進入步驟B(其在下文進一步詳細描述以及圖1以及圖8中所例示)中所描述之擴增之前冷凍儲存。

1. 胸膜滲出液T細胞及TIL

【0461】在一些實施例中，樣本為胸膜液樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之T細胞或TIL的來源為胸膜液樣本。在一些實施例中，樣本為源於胸膜滲出液之樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之T細胞或TIL的來源為源於胸膜滲出液之樣本。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

【0462】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸膜滲出液。此類樣本可來源於原發

性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，樣本可衍生自來源於另一器官(例如乳房、卵巢、結腸或前列腺)之繼發轉移性癌細胞。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜滲出物(pleural exudate)。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜溢出物(pleural transudate)。其他生物樣本可包括含有TIL之其他漿液，包括例如來自腹部之腹水液或胰囊腫液。腹水液及胸膜液涉及非常類似的化學系統；腹部及肺兩者在相同的惡性腫瘤事件中於胸腔及腹腔中皆具有間皮細胞株及流體形式，且在一些實施例中，此類流體含有TIL。在所揭示之方法利用胸膜液的一些實施例中，可使用含有TIL之腹水或其他囊腫液進行相同的方法以得到類似結果。

【0463】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在進一步處理步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在進一步處理步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施例中，在自患者收集之後立即將樣本置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降低。在一些實施例中，樣本係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣本係在4℃下自患者移

除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。

【0464】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣本。在一些實施例中，稀釋度為1:10胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:9胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:5胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:2胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:1胸膜液比稀釋劑。在一些實施例中，稀釋劑包括鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、另一緩衝液或生理學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，樣本係在自患者收集及稀釋之後立即置於CellSave管中，以避免活TIL減少，若保留在未經處理之胸膜液中，則即使在4℃下，活TIL可能在24至48小時內顯著減少。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且在4℃下稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。

【0465】在另其他實施例中，在進一步處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜

液樣本自個體中取出後將其離心並將離心液或離心塊再懸浮於緩衝液中來製備胸膜液樣本。在一些實施例中，對胸膜液樣本進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【0466】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在進一步處理中使用之胸膜液樣本係藉由將流體經由含有已知且基本均勻的孔徑的過濾器過濾而製備的，該孔徑允許胸膜液通過膜但保留腫瘤細胞。在一些實施例中，膜中的孔之直徑可為至少4 μM。在其他實施例中，孔徑可為5 μM或更大，且在其他實施例中，可為6 μM、7 μM、8 μM、9 μM或10 μM中之任一者。過濾之後，可將被膜保留之細胞(包括TIL)自膜上衝出至適合的生理學上可接受之緩衝液中。然後可以將以此方式濃縮之細胞(包括TIL)用於該方法之進一步處理步驟中。

【0467】在一些實施例中，使胸膜液樣本(包括例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞離心塊與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣本中存在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包括單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包括BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包括Versalyse™系

統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統或Erythrolyse II系統(貝克曼庫爾特公司(Beckman Coulter, Inc.))或氯化銨系統。在一些實施例中，溶解試劑可隨主要需求而變化，該等需求為紅血球之有效溶解及TIL之保守性及胸膜液中TIL之表型特性。除採用單一試劑用於溶解之外，適用於本文所描述之方法的溶解系統可包括第二試劑，例如在該方法之剩餘步驟期間淬滅或延遲溶解試劑之效應的第二試劑，例如Stabilyse™試劑(貝克曼庫爾特公司)。視溶解試劑之選擇或該方法之較佳實施而定，亦可採用習知固定試劑。

【0468】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣本，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴增。

B. 步驟B：第一擴增

【0469】在一些實施例中，本發明方法提供獲得年輕TIL，其能夠在向個體/患者投與時提供增加之複製循環且因此可提供優於更老TIL(亦即在向個體/患者投與之前進一步經歷更多輪複製之TIL)之額外治療益處。年輕TIL之特徵已描述於文獻中，例如於Donia等人,《斯堪的納維亞免疫學雜誌(*Scand. J. Immunol.*)》2012, *75*, 157-167；Dudley等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》**2010,** *16*, 6122-6131；Huang等人，《免疫學雜誌》**2005,** *28*,

258-267；Besser等人，《臨床癌症研究》**2013,** *19*, OF1-OF9；Besser等人，《免疫學雜誌》**2009**, *32*:415-423；Robbins等人，《免疫學雜誌》**2004**, *173*, 7125-7130；Shen等人，《免疫學雜誌》**2007,** *30*, 123-129；Zhou等人，《免疫學雜誌》**2005,** *28*, 53-62；及Tran等人，《免疫學雜誌》**2008**, *31*, 742-751，其中之每一者以引用的方式併入本文中。

【0470】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文中提供之方法以外之其他方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性，該等其他方法包括例如除圖1中實施之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖5及/或圖6中例示之稱為過程1C之方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第一擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白

重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組之T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。

【0471】在例如圖1之步驟A中所描述的腫瘤碎片之解剖或碎解之後，所得細胞在含有IL-2之血清中在促進TIL生長超過腫瘤及其他細胞之條件下培養。在一些實施例中，在2 mL孔中在包含具有6000 IU/mL IL-2之不活化人類AB血清之培養基中培育腫瘤碎解物。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常3至14天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養7至14天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養10至14天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養約11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【0472】在一些實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文所描述之初始主體TIL擴增步驟(諸如圖1之步驟B中所描述之彼等者，其可包括稱為預REP之過程)進行，接著

進行如下文步驟D及本文所描述之第二擴增(步驟D，包括稱為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況選用之冷凍保存，且接著進行如下文及本文所描述之第二步驟D(包括稱為再刺激REP步驟之過程)。獲自此過程之TIL可視情況針對如本文所描述之表型特徵及代謝參數進行表徵。

【0473】在TIL培養在24孔盤中起始之實施例中，例如，使用Costar 24孔細胞培養簇，平底(Corning Incorporated，Corning，NY，各孔可接種有1×10^6個腫瘤碎解物細胞或一個含有IL-2(6000 IU/mL；Chiron Corp., Emeryville, CA)的2 mL完全培養基(CM)中的腫瘤碎片。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【0474】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在具有40 mL容量及10 cm^2透氣矽底的透氣性培養瓶(例如，G-REX10；Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)中起始培養之實施例中，各培養瓶裝載有用10-40×10^6個活腫瘤碎解物細胞或在10-40 mL含IL-2的CM中之5-30個腫瘤碎片。G-REX10及24孔盤均在37℃於5%CO_2的濕氣培育箱中培養，培養起始後5天，移除一半培養基且替換為新鮮的CM及IL-2，且在之後第5天，每2-3天更換一半培養基。

【0475】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使

用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【0476】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium，DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(Basal Medium Eagle，BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(Glasgow's Minimal Essential Medium，G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)。

【0477】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括但不限於以下中之一或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋

白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0478】在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0479】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、

10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0480】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0481】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養

基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，

CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0482】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0483】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、

15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0484】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群組之成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群組之成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物及一或多種選自由以下組成之群組之成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多

種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0485】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血

酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【0486】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以下文表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含下文表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

表4：非微量元素部分成分之濃度

成分	補充劑之較佳實施例 (mg/L) (約)	1X 培養基中之濃度範圍(mg/L) (約)	1X 培養基之較佳實施例(mg/L) (約)
甘胺酸	150	5-200	53
L-組胺酸	940	5-250	183
L-異白胺酸	3400	5-300	615
L-甲硫胺酸	90	5-200	44
L-苯丙胺酸	1800	5-400	336
L-脯胺酸	4000	1-1000	600
L-羥基脯胺酸	100	1-45	15
L-絲胺酸	800	1-250	162
L-蘇胺酸	2200	10-500	425
L-色胺酸	440	2-110	82
L-酪胺酸	77	3-175	84
L-纈胺酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
還原麩胱甘肽	10	1-20	1.5
抗壞血酸-2-PO_4 (Mg 鹽)	330	1-200	50
運鐵蛋白 (鐵飽和)	55	1-50	8
胰島素	100	1-100	10
亞硒酸鈉	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83,000	5000-50,000	12,500

【0487】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0488】在一些實施例中，於Smith等人，《臨床與轉化免疫學(*Clin Transl Immunology.*)》4(1)2015(doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發

明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【0489】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0490】製備腫瘤碎片之後，所得細胞(亦即碎片)在含有IL-2之血清中在促進TIL生長至腫瘤及其他細胞的條件下培養。在一些實施例中，將腫瘤碎解物在包含去活化人AB血清(或在一些情況下，如本文所描述，在APC細胞群體的存在下)與6000 IU/mL的IL-2的培養基中之2 mL孔中培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常10至14天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，生長培養基在第一擴增期間包含IL-2或其變異體。在一些實施例中，IL為重組人類IL-2(rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有25×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有5至7×10^6

IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有6×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備溶液如實例5中所描述製備。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約10,000 IU/mL IL-2、約9,000 IU/mL IL-2、約8,000 IU/mL IL-2、約7,000 IU/mL IL-2、約6000 IU/mL IL-2或約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約9,000 IU/mL IL-2至約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約8,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約7,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含1000與2000 IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或約8000 IU/mL的IL-2。

【0491】在一些實施例中，第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【0492】在一些實施例中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1

IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【0493】在一些實施例中，細胞培養基包含抗CD3促效劑抗體，例如OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基不包含OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。參見例如表1。

【0494】在一些實施例中，細胞培養基包含一或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，

TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL與100 μg/mL之間之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL與40 μg/mL之間之濃度。

【0495】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0496】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在具有40 mL容量及10 cm^2透氣矽底的透氣性培養瓶(例如，G-REX10；Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)中起始培養之實施例中，各培養瓶裝載有用10-40×10^6個活腫瘤碎解物細胞或在10-40 mL含IL-2的CM中之5-30個腫瘤碎片。G-REX10及24孔盤均在37℃於5%CO_2的濕氣培育箱中培養，培養起始後5天，移除一半培養基且替換為新鮮的CM及IL-2，且在之後第5天，每2-3天更換一半培養基。在一些實施例中，CM為實例中所描

述之CM1，參見實例1。在一些實施例中，第一擴增發生於初始細胞培養基或第一細胞培養基中。在一些實施例中，初始細胞培養基或第一細胞培養基包含IL-2。

【0497】在一些實施例中，第一擴增(包括諸如描述於圖1之步驟B中之彼等過程的過程，其可包括有時被稱作預REP之彼等過程)縮短至3-14天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第一擴增(包括諸如圖1之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP之彼等過程)縮短至7至14天，如實例中所論述及圖4及5中所展示，以及包括例如圖1之步驟B中所描述之擴增。在一些實施例中，步驟B之第一擴增縮短至10-14天。在一些實施例中，第一擴增縮短至11天，如例如如圖1之步驟B中所描述之擴增中所論述。

【0498】在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行9天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可

進行10天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行11天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行12天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行13天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行9天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行10天至11天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行11天。

【0499】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包括在第一擴增期間，包括例如在根據圖1以及本文所描述之步驟B過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包括在根據圖1以及如本文所描述之步驟B過程期間。

【0500】在一些實施例中，如實例及圖式中所論述，第一擴增(包括被稱為預REP之過程；例如，根據圖1之步

驟B)過程被縮短至3至14天。在一些實施例中，步驟B之第一擴增縮短至7至14天。在一些實施例中，步驟B之第一擴增縮短至10至14天。在一些實施例中，第一擴增縮短至11天。

【0501】在一些實施例中，第一擴增，例如根據圖1之步驟B，在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

1. 細胞介素及其他添加劑

【0502】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別係IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0503】或者，使用細胞介素之組合來快速擴增及/或第二擴增TIL亦係可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述，使用兩種或更多種IL-2、IL-15及IL-21之組合，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2或IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且特別係如其中所描述之T細胞。

【0504】在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基添加OKT-3抗體或莫羅單抗，如本文別處所描述。在一些

實施例中，步驟B亦可包括向培養基添加4-1BB促效劑，如本文別處所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基添加OX-40促效劑，如本文別處所描述。在其他實施例中，可在步驟B期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧物酶體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

C. 步驟C：第一擴增至第二擴增之轉變

【0505】在一些情況下，自第一擴增獲得之主體TIL群體，包括例如自例如圖1中所示之步驟B獲得的TIL群體，可使用下文所論述之方案立即冷凍保存。或者，獲自第一擴增(稱為第二TIL群體)之TIL群體可經歷第二擴增(其可包括有時稱為REP之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在經遺傳修飾之TIL將用於療法的情況下，第一TIL群體(有時稱為本體TIL群體)或第二TIL群體(其在一些實施例中可包括稱為REP TIL群體之群體)可在擴增之前或在第一擴增之後及在第二擴增之前進行遺傳修飾以用於適合治療。

【0506】在一些實施例中，儲存獲自第一擴增(例如，來自如圖1中所指示之步驟B)之TIL直至經表型分型以供選擇。在一些實施例中，獲自第一擴增(例如，來自如圖1中所指示之步驟B)之TIL未經儲存且直接繼續進行至第

二擴增。在一些實施例中，獲自第一擴增之TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後約3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後約3天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後約4天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後約4天至約10天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後約7天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後約14天發生。

【0507】在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後1天至14天發生。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後3天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後4天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後5天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後6天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後7

天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後8天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後9天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後10天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後11天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後12天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後13天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後1天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後2天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後3天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後4天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後5天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後6天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後7天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後8天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後9天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後10天至11天發生。在

一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在當碎斷發生後11天發生。

【0508】在一些實施例中，TIL在第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經儲存，且TIL直接進行第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖1中所示之步驟B至步驟D之轉變期間不經儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行第二擴增而無轉變期。

【0509】在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變(例如根據圖1之步驟C)在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100生物反應器。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

D. 步驟D：第二擴增

【0510】在一些實施例中，TIL細胞群體在收集及初始批量處理之後的數目擴增，例如在步驟A及步驟B之後，且轉變稱為步驟C，如圖1中所指示。此進一步擴增在本文中稱為第二擴增，其可包括在本領域中通常稱為快速擴增過程(REP)之擴增過程；以及如圖1之步驟D中所指示之過程。第二擴增通常使用包含多種組分(包括飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完

成。

【0511】在一些實施例中，第二擴增或第二TIL擴增(其可包括有時稱為REP之擴增；以及如圖1之步驟D中所指示之過程)可使用本領域中熟習此項技術者已知之任何TIL培養瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約7天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約8天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約9天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約10天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約11天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約12天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約13天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約14天。

【0512】在一些實施例中，第二擴增可在透氣容器中使用本揭示案之方法(包括例如稱為REP之擴增；以及如圖1之步驟D中所指示之過程)進行。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包括例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/ml OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥市的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包括一或多種癌症之抗原(包括其抗原部分，

諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表現，該載體諸如人類白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1 :26-35(27L)或gpl 00:209-217(210M)。其他適合抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【0513】在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含1000與2000 IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或8000 IU/mL之

間的IL-2。

【0514】在一些實施例中，細胞培養基包含OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基不包含OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【0515】在一些實施例中，細胞培養基包含一或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL與100 μg/mL之間之濃度。在一些

實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL與40 μg/mL之間之濃度。

【0516】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0517】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包括在第二擴增期間，包括例如在根據圖1以及本文所描述之步驟D過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包括在根據圖1及如本文所描述之步驟D過程期間。

【0518】在一些實施例中，第二擴增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包含TNFRSF促效劑之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原呈現細胞)之細胞培養基中發生。

【0519】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約

500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【0520】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約2

IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【0521】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【0522】在一些實施例中，REP及/或第二擴增在培養瓶中進行，其中主體TIL與100倍或200倍過量之去活化飼養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2混合於150 mL培養基中。進行培養基替換(通常經由抽吸用新鮮培養基進行2/3培養基替換)直至細胞轉移至替代生長箱室。替代生長箱室包括G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0523】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP過程之過程)縮短至7至14天，如實例及圖式中所論

述。在一些實施例中，第二擴增縮短至11天。

【0524】在一些實施例中，REP及/或第二擴增可以使用先前描述的T-175培養瓶及透氣袋(Tran等人，《免疫療法雜誌(*J. Immunother.*)》2008, 31, 742-51；Dudley等人，《免疫療法雜誌》2003, 26, 332-42)或透氣性培養器皿(G-REX培養瓶)進行。在一些實施例中，第二擴增(包括稱為快速擴增之擴增)在T-175培養瓶中進行，且可將懸浮於150 mL培養基中約1×10^6個TIL添加至各T-175培養瓶中。TIL可在補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3的CM與AIM-V培養基之1:1混合物中培養。T-175培養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。可在第5天使用具有3000 IU/mL IL-2的50/50培養基更換一半培養基。在一些實施例中，在第7天，可以將來自兩個T-175培養瓶之細胞組合在3 L袋中，且將300 mL AIM V與5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2添加至300 mL TIL懸浮液中。每日或每兩天計數各袋中之細胞數目，且添加新鮮培養基以使細胞計數保持在0.5與2.0×10^6個細胞/毫升之間。

【0525】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP之擴增，以及在圖1之步驟D中提及之彼等擴增)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣培養瓶(G-REX-100，可購自美國明尼蘇達州新布賴頓市的威爾遜狼製造公司(Wilson Wolf Manufacturing Corporation))中進行，5×10^6或10×10^6個TIL可與PBMC在400 mL的補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3(OKT3)之50/50培

養基中培養。G-REX-100培養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。在第5天，可將250 mL上清液移除且放入離心瓶中且以1500 rpm(491×g)離心10分鐘。TIL離心塊可用150 mL具有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2之新鮮培養基再懸浮，且添加回原始G-REX-100培養瓶中。當TIL在G-REX-100培養瓶中連續擴增時，在第7天各G-REX-100中之TIL可懸浮於各培養瓶中存在之300 mL培養基中，且細胞懸浮液可分成可用於接種3個G-REX-100培養瓶之3個100 mL等分試樣。隨後可將150 mL具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至各培養瓶中。G-REX-100培養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育且在4天之後，可將具有3000 IU/mL IL-2之150 mL AIM-V添加至各G-REX-100培養瓶中。可在培養第14天收集細胞。

【0526】在一些實施例中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)在培養瓶中進行，其中將主體TIL與100倍或200倍過量之去活化飼養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2混合於150 mL培養基中。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，2/3的介質被新鮮介質的呼吸替換。在一些實施例中，替代生長箱室包括G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0527】在一些實施例中，進行第二擴增(包括被稱為REP之擴增)，且其進一步包含其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL之步驟。可使用本領域中已知之任何選擇方

法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【0528】視情況，細胞存活率分析可在第二擴增(包括稱為REP擴增之擴增)之後使用此項技術中已知之標準分析進行。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活性評定。在一些實施例中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活性。在一些實施例中，存活性係根據標準Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判定。

【0529】在一些實施例中，TIL之第二擴增(包括稱為REP之擴增)可使用如先前所描述之T-175培養瓶及透氣袋(Tran等人，2008, 《免疫療法雜誌》, 31, 742-751，及Dudley等人，2003, 《免疫療法雜誌》, 26, 332-342)或透氣G-REX培養瓶進行。在一些實施例中，使用培養瓶進行第二擴增。在一些實施例中，使用透氣G-REX培養瓶進行第二擴增。在一些實施例中，第二擴增在T-175培養瓶中進行，且將約1×10^6個TIL懸浮於約150 mL培養基中且將其添加至各T-175培養瓶中。TIL與作為「餵養」細胞的經照射(50 Gy)同種異體PBMC以1:100之比率一起培養且細胞在補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3的CM與AIM-V培養基之1:1混合物(50/50培養基)中培養。T-175培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育。在一些實施例中，在第5天使用具

有3000 IU/mL IL-2的50/50培養基更換一半培養基。在一些實施例中，在第7天，來自2個T-175培養瓶之細胞在3 L袋中合併且將具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之300 mL AIM-V添加至300 mL TIL懸浮液中。可每日或每兩天計數各袋中之細胞數目，且可添加新鮮培養基以使細胞計數保持在約0.5與約2.0×10^6個細胞/mL之間。

【0530】在一些實施例中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)在500 mL培養瓶中進行，該培養瓶具有100 cm^2透氣矽底(G-REX-100，Wilson Wolf)的約5×10^6或10×10^6個TIL與經照射之同種異體PBMC以1:100的比率在400 mL 50/50培養基中培養，其中補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3。G-REX-100培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育。在一些實施例中，在第5天，將250 mL上清液移除且放入離心瓶中且以1500 rpm(491 g)離心10分鐘。TIL離心塊可隨後用具有3000 IU/mL IL-2之150 mL新鮮50/50培養基再懸浮且添加回原始G-REX-100培養瓶中。在TIL在G-REX-100培養瓶中連續擴增之實施例中，在第7天將各G-REX-100中之TIL懸浮於各培養瓶中存在之300 mL培養基中，且將細胞懸浮液分成可用於接種3個G-REX-100培養瓶之三個100 mL等分試樣。隨後將150 mL具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至各培養瓶中。G-REX-100培養瓶在37℃下在5% CO_2中培育且在4天之後，將具有3000 IU/mL IL-2之150 mL AIM-V添加至各G-REX-100培養瓶中。在培養之第14天收集細胞。

【0531】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第二擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組之T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。

【0532】在一些實施例中，第二擴增培養基(例如有時被稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。

【0533】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充

劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【0534】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0535】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括但不限於以下中之一或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲

胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0536】在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0537】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約

5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0538】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0539】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些

實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有

約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0540】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0541】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巰基乙醇。在

一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0542】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群組之成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群組之成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物及一或多種選自由以下組成之群組之成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、

L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0543】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【0544】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

【0545】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0546】在一些實施例中，於Smith等人，《臨床與轉化免疫學(*Clin Transl Immunology.*)》4(1)2015(doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【0547】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養

基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0548】在一些實施例中，第二擴增，例如根據圖1之步驟D，在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

【0549】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大(scaling up)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的TIL轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500-MCS容器)且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的TIL約4天至7天之時段。

【0550】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大(scaling out)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的第一小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與

第一容器相等的第二容器之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的TIL部分於第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。

【0551】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個TIL亞群中。

【0552】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分於較大規模培養中培養約4天至7天之時段。

【0553】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約5天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的TIL轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500 MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分於較大規模培養中培養約6天之時段。

【0554】在一些實施例中，在分種快速或第二擴增時，各第二容器包含至少10^8個TIL。在一些實施例中，在分種快速或第二擴增時，各第二容器包含至少10^8個TIL、至少10^9個TIL或至少10^{10}個TIL。在一個例示性實施例中，各第二容器包含至少10^{10}個TIL。

【0555】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2、3、4或5個亞群中。

【0556】在一些實施例中，在完成快速或第二擴增後，複數個亞群包含治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速或第二擴增後，將一或多個TIL亞群合併在一起以產生治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，各TIL亞群包含治療有效量之TIL。

【0557】在一些實施例中，在分成複數個步驟之前將快速或第二擴增進行約3至7天之時段。在一些實施例中，快速或第二擴增之分種發生在快速或第二擴增開始後約第3天、第4天、第5天、第6天或第7天。

【0558】在一些實施例中，快速或第二擴增之分種發生在第一擴增(亦即預REP擴增)開始後約第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天或第16天、第17天或第18天。在一個例示性實施例中，快速或第二擴增之分種發生在第一擴增開始後約第16

天。

【0559】在一些實施例中，在分種之後，快速或第二擴增進一步進行約7至11天之時段。在一些實施例中，在分種之後，快速或第二擴增進一步進行約5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段。

【0560】在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含與分種後用於快速或第二擴增之細胞培養基相同的組分。在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含與分種後用於快速或第二擴增之細胞培養基不同的組分。

【0561】在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC。在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及進一步視情況APC。在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及APC。

【0562】在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC之新鮮

細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生的。

【0563】在一些實施例中，分種後用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2及視情況OKT-3。在一些實施例中，分種後用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2及OKT-3。在一些實施例中，分種後用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及視情況OKT-3之新鮮培養基來替換分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種後用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及OKT-3之新鮮培養基來替換分種前用於快速或第二擴增之細胞培養基而產生的。

【0564】在一些實施例中，快速擴增之分種發生在密閉系統中。

【0565】在一些實施例中，在快速或第二擴增期間規模縱向擴大TIL培養物包含向TIL培養物添加新鮮細胞培養基(亦稱為饋送TIL)。在一些實施例中，饋送包含頻繁地向TIL培養物中添加新鮮細胞培養基。在一些實施例中，饋送包含以規則時間間隔將新鮮細胞培養基添加至TIL培養物中。在一些實施例中，新鮮細胞培養基經由恆定流動供應至TIL。在一些實施例中，諸如Xuri W25之自動細胞擴增系統用於快速擴增及饋送。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【0566】在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序(例如包括諸如圖1之步驟D中所描述之擴增以及稱為REP之彼等擴增)在REP TIL擴增期間及/或在第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【0567】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【0568】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【0569】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。

【0570】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二

擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。

【0571】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【0572】在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞:約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞:約50×10^6個TIL之比率。在又其他實施例中，

本文所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞:約25×10^6個TIL之比率。

【0573】在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序在第二擴增期間需要過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【0574】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包括圖式及實例中所描述之例示性程序。

【0575】在一些實施例中，在第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

2. 細胞介素及其他添加劑

【0576】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別係IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0577】或者，使用細胞介素之組合來快速擴增及/或第二擴增TIL亦係可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述，使用兩種或更多種IL-2、IL-15及IL-21之組合，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生

淋巴球，且特別係如其中所描述之T細胞。

【0578】在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基添加OKT-3抗體或莫羅單抗，如本文別處所描述。在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基添加4-1BB促效劑，如本文別處所描述。在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基添加OX-40促效劑，如本文別處所描述。此外，可在步驟D期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧物酶體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

E. 步驟E：收集TIL

【0579】在第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如圖1中所提供之一、二、三、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在兩個擴增步驟之後收集TIL，例如如圖1中所提供。

【0580】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包括例如離心。收集TIL之方法為此項技術中熟知的且任何此類已知方法均可與本發明過程一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【0581】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包括例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec Life Science、珀金埃爾默(Perkin Elmer)及Inotech

Biosystems International, Inc.。本發明方法可採用任何基於細胞之收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統為基於膜之細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集係經由細胞處理系統，諸如LOVO系統(由費森尤斯卡比製造)進行。術語「LOVO細胞處理系統」亦係指由任何供應商製造之任何可在無菌及/或密閉系統環境中將包含細胞之溶液泵送通過膜或過濾器(諸如旋轉膜或旋轉過濾器)的儀器或裝置，從而允許連續流動及細胞處理以移除上清液或細胞培養基而不發生團塊化。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中進行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【0582】在一些實施例中，收集，例如根據圖1之步驟E，在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

【0583】在一些實施例中，根據圖1之步驟E根據本文所描述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例中所描述之密閉系統。

【0584】在一些實施例中，根據實例中所描述之方法收集TIL。在一些實施例中，第1天及第11天之間的TIL使

用如本文提及之步驟中所描述之方法收集，例如在實例中之第11天收集TIL。在一些實施例中，第12及第24天之間的TIL使用如本文提及之步驟中所描述之方法收集，例如在實例中之第22天收集TIL。在一些實施例中，第12及第22天之間的TIL使用如本文提及之步驟中所描述之方法收集，例如在實例中之第22天收集TIL。

F. 步驟F：最終調配及轉移至輸注容器

【0585】在如圖1中以例示性次序提供且如上文及本文中所詳細概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器中以用於向患者投與，諸如輸注袋或無菌小瓶。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療足夠數目之TIL後，將其轉移至容器以用於向患者投與。

【0586】在一些實施例中，使用本揭示案之APC擴增之TIL以醫藥組合物之形式向患者投與。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投與。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

III. Gen 3 TIL製造過程

【0587】在不受任何特定理論限制的情況下，咸信如本發明方法中所描述之起動T細胞活化的初始第一擴增及

隨後的加強T細胞活化的快速第二擴增，允許製備保留「較年輕」表型之經擴增T細胞，且因此預期本發明之經擴增T細胞相較於藉由其他方法擴增之T細胞可對癌細胞展現較高細胞毒性。特定言之，咸信如本發明方法所教示之藉由暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)、IL-2及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)來起動T細胞之活化且接著藉由後續暴露於另外的抗CD-3抗體(例如OKT-3)、IL-2及APC來加強，其限制或避免培養基中之T細胞的成熟，從而產生具有較不成熟表型之T細胞群體，該等T細胞因培養擴增而耗竭較少且對癌細胞展現較高細胞毒性。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下達成培養規模縱向擴大(scaling up)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的T細胞轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500 MCS容器)且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的T細胞約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大(scaling out)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的第一小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)將來自第一小規模培養中的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與第一容器相同的第二容器之中，

其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的T細胞部分於第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)將來自小規模培養中的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的T細胞部分於較大規模培養中培養約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)將來自小規模培養中的T細胞轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500 MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的T細胞部分於較大規模培養中培養約5天之時段。

【0588】在一些實施例中，在分種快速擴增時，各第二容器包含至少10^8個TIL。在一些實施例中，在分種快速擴增時，各第二容器包含至少10^8個TIL、至少10^9個TIL或至少10^{10}個TIL。在一個例示性實施例中，各第二容器包

含至少10^{10}個TIL。

【0589】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2、3、4或5個亞群中。

【0590】在一些實施例中，在完成快速擴增後，複數個亞群包含治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，將一或多個TIL亞群合併在一起以產生治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，各TIL亞群包含治療有效量之TIL。

【0591】在一些實施例中，在分成複數個步驟之前將快速擴增進行約1至5天之時段。在一些實施例中，快速擴增之分種發生在快速擴增開始後約第1天、第2天、第3天、第4天或第5天。

【0592】在一些實施例中，快速擴增之分種發生在第一擴增(亦即預REP擴增)開始後約第8天、第9天、第10天、第11天、第12天或第13天。在一個例示性實施例中，快速擴增之分種發生在第一擴增開始後約第10天。在另一例示性實施例中，快速擴增之分種發生在第一擴增開始後約第11天。

【0593】在一些實施例中，在分種之後，快速二擴增進一步進行約4至11天之時段。在一些實施例中，在分種之後，快速擴增進一步進行約3天、4天、5天、6天、7

天、8天、9天、10天或11天之時段。

【0594】在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基包含與分種後用於快速擴增之細胞培養基相同的組分。在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基包含與分種後用於快速擴增之細胞培養基不同的組分。

【0595】在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC。在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及進一步視情況APC。在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及APC。

【0596】在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生的。

【0597】在一些實施例中，分種後用於快速擴增之細

胞培養基包含IL-2及視情況OKT-3。在一些實施例中，分種後用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2及OKT-3。在一些實施例中，分種後用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及視情況OKT-3之新鮮培養基來替換分種前用於快速擴增之細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種後用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及OKT-3之新鮮培養基來替換分種前用於快速擴增之細胞培養基而產生的。

【0598】在一些實施例中，快速擴增之分種發生在密閉系統中。

【0599】在一些實施例中，在快速擴增期間規模縱向擴大TIL培養物包含向TIL培養物添加新鮮細胞培養基(亦稱為饋送TIL)。在一些實施例中，饋送包含頻繁地向TIL培養物中添加新鮮細胞培養基。在一些實施例中，饋送包含以規則時間間隔將新鮮細胞培養基添加至TIL培養物中。在一些實施例中，新鮮細胞培養基經由恆定流動供應至TIL。在一些實施例中，諸如Xuri W25之自動細胞擴增系統用於快速擴增及饋送。

【0600】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增所實現之T細胞活化開始降低、趨緩、衰退或消退之後進行。

【0601】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約(at or about)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%之後進行。

【0602】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增所實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至100%之範圍中的百分比之後進行。

【0603】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至10%、10%至20%、20%至30%、30%至40%、40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%或90%至100%之範圍中之百分比之後進行。

【0604】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低在至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、

78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%之後進行。

【0605】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由初始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%之後進行。

【0606】在一些實施例中，藉由初始第一擴增實現之T細胞活化之降低係藉由T細胞回應於抗原刺激而釋放之干擾素γ之量的減少來判定。

【0607】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約7天或大約8天之時段內進行。

【0608】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【0609】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【0610】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約11天之時段內進行。

【0611】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0612】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0613】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約11天之時段內進行。

【0614】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【0615】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約9天之時段內進行。

【0616】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0617】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係於在剛好或大約1天至處於或約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在處於或約1天至處於或約9天之時段內進行。

【0618】在一些實施例中，T細胞之初始第一擴增係在7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【0619】在一些實施例中，T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【0620】在一些實施例中，T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【0621】在一些實施例中，T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【0622】在一些實施例中，T細胞獲自罹患癌症之供體。

【0623】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患癌症之患者所切除之腫瘤的TIL。

【0624】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患血液惡性病之患者之骨髓的MIL。

【0625】在一些實施例中，T細胞為獲自供體之周邊血液單核細胞(PBMC)的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳

頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，供體罹患腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為實體腫瘤。在一些實施例中，供體罹患血液惡性病。

【0626】在本揭示案之某些態樣中，免疫效應細胞(例如T細胞)可使用本領域技術人員已知之任何數目之技術(諸如FICOLL分離)自收集自個體之血液單元獲得。在一個較佳態樣中，藉由血球分離術獲得來自個體之循環血液的細胞。血球分離術產物通常含有淋巴球，包括T細胞、單核球、顆粒球、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一個態樣中，藉由血球分離術收集之細胞可經洗滌以移除血漿部分且視情況將細胞置於適當緩衝液或培養基中以用於後續處理步驟。在一些實施例中，細胞係用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌。在一替代實施例中，洗滌溶液缺乏鈣，且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。在一個態樣中，藉由溶解紅血球及例如藉由經由PERCOLL梯度離心或藉由逆流離心淘析耗盡單核球，自周邊血液淋巴球分離T細胞。

【0627】在一些實施例中，T細胞為自供體之全血或富含淋巴球之血球分離術產物分離的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，供體罹患腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為實體腫瘤。在一些實施例中，供體罹患血液惡性病。在一些實施例中，PBL係藉由使用正向或負向選擇方法而自全血或富含淋巴球之血球分離術產物分離，亦即使用T細胞表型標誌(例如CD3+CD45+)移除PBL，或移除非T細胞表型細胞而留下PBL。在其他實施例中，PBL係藉由梯度離心分離。在自供體組織分離PBL後，PBL之初始第一擴增可根據本文所描述之任何方法之初始第一擴增步驟，藉由將適合數目之經分離PBL(在一些實施例中，約1×10^7個PBL)接種於初始第一擴增培養物中來起始。

【0628】含有一些此等特徵的稱為過程3(在本文中亦

稱作Gen 3)之例示性TIL過程描繪於圖8(特別係例如圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中，且本發明之此實施例在Gen 2中的一些優勢描述於圖1、圖2、圖8、圖30及圖31(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中。Gen 3之實施例顯示於圖1、圖8及圖30(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中。過程2A或Gen 2或Gen 2A亦描述於美國專利公開案第2018/0280436號中，其以全文引用之方式併入本文中。Gen 3過程亦描述於國際專利公開案第2020/096988號中。

【0629】如本文中所論述及大體上概述，TIL係取自患者樣本，且使用本文所描述且稱為Gen 3之TIL擴增過程操作以在移植至患者中之前擴增其數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。在一些實施例中，TIL可在擴增之前或之後冷凍保存。解凍後，其亦可經再刺激以在輸注至患者中之前增加其代謝。

【0630】在一些實施例中，初始第一擴增(包括本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟B之過程)縮短為1至8天，且快速第二擴增(包括在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟D的過程)縮短為1至9天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例

中，初始第一擴增(包括本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟B之過程)縮短為1至8天，且快速第二擴增(包括在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟D的過程)縮短為1至8天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包括本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟B之過程)縮短為1至7天，且快速第二擴增(包括在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟D的過程)縮短為1至9天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(包括本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8(特別係例如圖1B及/或圖8C)中示為步驟B之過程)為1至7天，且快速第二擴增(包括在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中示為步驟D的過程)為1至10天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)縮短為8

天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為7至9天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為8至9天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)縮短為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為7至8天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)縮短為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為8天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之

擴增)為9天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為7至10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為8至10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為9至10天。在一些實施例中，初始第一擴增(例如，圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中描述為步驟B之

擴增)縮短為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟D中所描述之擴增)為7至9天。在一些實施例中，初始第一擴增及快速第二擴增(例如，在圖8(特別係例如圖1B及/或圖8C)中描述為步驟B及步驟D之擴增)之組合為14至16天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。特定言之，認為本發明之某些實施例包含初始第一擴增步驟，其中TIL藉由在IL-2存在下暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)或在至少IL-2及抗CD3抗體(例如OKT-3)存在下暴露於抗原而活化。在某些實施例中，在如上文所描述之初始第一擴增步驟中活化之TIL為第一TIL群體，亦即，其為初代細胞群體。

【0631】以下的「步驟」標識A、B、C等參考圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中之非限制性實例且參考本文所描述之某些非限制性實施例。以下及圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中的步驟次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及另外的步驟、步驟重複及/或步驟省略。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣本

【0632】一般而言，TIL最初係獲自患者腫瘤樣本(「初代TIL」)或獲自循環淋巴球(諸如周邊血液淋巴球，

包括具有TIL樣特徵之周邊血液淋巴球)，且接著擴增成較大群體以進行如本文所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表型及代謝參數作為TIL保健的指標。

【0633】患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，一般經由手術切除、針吸活體組織切片或用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包括原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可為任何癌症類型，包括但不限於乳癌、胰臟癌、前列腺癌、大腸直腸癌、肺癌、腦癌、腎癌、胃癌及皮膚癌(包括但不限於鱗狀細胞癌、基底細胞癌及黑色素瘤)。在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包括例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(GBM)、胃腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰臟癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，適用的TIL係獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為報告指出此等腫瘤具有特別高含量之TIL。

【0634】一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷成1 mm^3至約8 mm^3之間的小片，其中約2 mm^3至3 mm^3為尤其適用的。TIL係自此等碎片使用酶素性腫瘤碎解物培養。此類腫瘤碎解物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素

(gentamicine)、30單位/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，接著進行機械解離(例如使用組織解離器)來產生。腫瘤碎解物可藉由以下產生：將腫瘤置放於酶素性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及培育循環，直至僅存在小組織片。在此過程結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用FICOLL分支鏈親水性多醣之密度梯度分離以移除此等細胞。可使用本領域中已知之替代方法，諸如美國專利申請公開案第2012/0244133 A1號中所描述之方法，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所描述之任何實施例中擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【0635】腫瘤解離酶混合物可包括一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包括任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、酪蛋白酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶)、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0636】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如HBSS)中重構。

【0637】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。

凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 ml至15 ml緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/ml至約400 PZ U/ml，例如，約100 PZ U/ml至約400 PZ U/ml、約100 PZ U/ml至約350 PZ U/ml、約100 PZ U/ml至約300 PZ U/ml、約150 PZ U/ml至約400 PZ U/ml、約100 PZ U/ml、約150 PZ U/ml、約200 PZ U/ml、約210 PZ U/ml、約220 PZ U/ml、約230 PZ U/ml、約240 PZ U/ml、約250 PZ U/ml、約260 PZ U/ml、約270 PZ U/ml、約280 PZ U/ml、約289.2 PZ U/ml、約300 PZ U/ml、約350 PZ U/ml或約400 PZ U/ml。

【0638】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1-ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。凍乾儲備酶之濃度可為175 DMC/mL。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/ml至約400 DMC/ml，例如，約100 DMC/ml至約400 DMC/ml、約100 DMC/ml至約350 DMC/ml、約100 DMC/ml至約300 DMC/ml、約150 DMC/ml至約400 DMC/ml、約100 DMC/ml、約110 DMC/ml、約120 DMC/ml、約130 DMC/ml、約140 DMC/ml、約150 DMC/ml、約160 DMC/ml、約170 DMC/ml、約175 DMC/ml、約180 DMC/ml、約190 DMC/ml、約200 DMC/ml、約250 DMC/ml、約300 DMC/ml、約350 DMC/ml或約400 DMC/ml。

【0639】在一些實施例中，DNA酶I係在1-ml無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/ml至10 KU/ml，例如約1 KU/ml、約2 KU/ml、約3 KU/ml、約4 KU/ml、約5 KU/ml、約6 KU/ml、約7 KU/ml、約8 KU/ml、約9 KU/ml或約10 KU/ml。

【0640】在一些實施例中，酶儲備液會發生變化，因此請驗證凍乾儲備液之濃度，並相應地修改添加至碎解混合物中的酶之最終量。

【0641】在一些實施例中，酶混合物包括約4.7 ml無菌HBSS中的約10.2 ul中性蛋白酶(0.36 DMC U/ml)、21.3 ul膠原蛋白酶(1.2 PZ/ml)及250 ul DNA酶I(200 U/ml)。

【0642】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷。在一些實施例中，實體腫瘤未經碎斷且以全腫瘤進行酶素性碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中碎解1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定

旋轉下碎解隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤碎解反應混合物。

【0643】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶重構腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【0644】在一些實施例中，酶混合物包含膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備液為100 mg/mL 10×工作儲備液。

【0645】在一些實施例中，酶混合物包含DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備液為10,000 IU/mL 10×工作儲備液。

【0646】在一些實施例中，酶混合物包含玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備液為10 mg/mL 10×工作儲備液。

【0647】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL膠原蛋白酶、1000 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0648】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL膠原蛋白酶、500 IU/mL DNA酶及1 mg/mL玻尿酸酶。

【0649】一般而言，獲自腫瘤之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包含抗原呈現細胞、IL-12及OKT-3之細胞培養基。

【0650】在一些實施例中，碎斷包括物理碎斷，包括例如分割以及碎解。在一些實施例中，碎斷為物理碎斷。

在一些實施例中，碎斷為分割。在一些實施例中，碎斷係藉由碎解。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤碎解物及腫瘤碎片培養。

【0651】在一些實施例中，當腫瘤為實體腫瘤時，在例如步驟A(如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所提供)中獲得腫瘤樣本之後，腫瘤進行物理碎段。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，碎斷在獲得腫瘤之後且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，碎斷步驟係活體外或離體過程。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將10、20、30、40或更多個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將30或40個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷且將40個碎片或塊置於各容器中進行初始第一擴增。在一些實施例中，多個碎片包含約4個至約50個碎片，其中各碎片之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包含約30個至約60個碎片，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包含約50個碎片，其總體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個碎片包含約50個碎片，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個碎片包含約4個碎片。

【0652】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤碎片。在

一些實施例中，腫瘤碎片係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤碎片為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約6 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約7 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤碎片為1至4 mm×1至4 mm×1至4 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為1 mm×1 mm×1 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為2 mm×2 mm×2 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為3 mm×3 mm×3 mm。在一些實施例中，腫瘤碎片為4 mm×4 mm×4 mm。

【0653】在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上出血性、壞死及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上壞死組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經碎斷以使各塊上脂肪組織之量減至最小。在某些實施例中，腫瘤碎斷步驟係活體外或離體方法。

【0654】在一些實施例中，進行腫瘤碎斷以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切

動作的情況下進行腫瘤碎斷。在一些實施例中，TIL獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術有限公司的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且其接著再次機械破壞大致1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，若在第三次機械破壞後大片組織仍存在，則可施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，若在最終培育結束時細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用菲科爾(Ficoll)之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0655】在一些實施例中，將初始第一擴增步驟之前的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。

【0656】在一些實施例中，細胞可視情況在樣本分離之後(例如在獲得腫瘤樣本後及/或在自腫瘤樣本獲得細胞懸浮液後)冷凍，且在進入步驟B中所描述之擴增之前冷凍儲存，該步驟B進一步詳細描述於下文且例示於圖8(特別係例如圖8B)中。

1. 粗針/小活體組織切片衍生之TIL

【0657】在一些實施例中，TIL最初係獲自藉由粗針活體組織切片或類似程序獲得之患者腫瘤樣本(「初代TIL」)且隨後擴增成較大群體以進行如本文所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表型及代謝參數。

【0658】在一些實施例中，患者腫瘤樣本可使用本領域中已知之方法獲得，一般經由小活體組織切片、粗針活體組織切片、針吸活體組織切片或用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得。一般而言，腫瘤樣本可來自任何實體腫瘤，包括原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。在一些實施例中，樣本可來自多個小腫瘤樣本或活體組織切片。在一些實施例中，樣本可包含來自同一患者之單一腫瘤的多個腫瘤樣本。在一些實施例中，樣本可包含來自同一患者之一個、兩個、三個或四個腫瘤的多個腫瘤樣本。在一些實施例中，樣本可包含來自同一患者之多個腫瘤的多個腫瘤樣本。實體腫瘤可係肺癌及/或非小細胞肺癌(NSCLC)。

【0659】一般而言，獲自腫瘤核心或碎片之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包含抗原呈現細胞、IL-2及OKT-3之細胞培養基。

【0660】在一些實施例中，若腫瘤為轉移性腫瘤且在過去已有效治療/移除原發性病灶，則可能需要移除一個轉移性病灶。在一些實施例中，若可用，微創方法係移除皮膚病灶或頸部或腋窩區域上的淋巴結。在一些實施例中，移除皮膚病灶或移除其小活體組織切片。在一些實施例中，移除淋巴結或其小活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤為黑色素瘤。在一些實施例中，黑色素瘤之小活體組織切片包含黑痣或其一部分。

【0661】在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片。在一些實施例中，穿孔活體組織切片係以圓形刀片壓入皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔活體組織切片係以圓形刀片壓入可疑黑痣周圍的皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔活體組織切片係以圓形刀片壓入皮膚中獲得，且移除一塊圓形皮膚。在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片且移除圓形部分的腫瘤。

【0662】在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片且移除整個黑痣或生長物。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片且連同小邊緣之正常外觀皮膚移除整個黑痣或生長物。

【0663】在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片且僅採集最不規則部分之黑痣或生長物。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切

片，且該切開式活體組織切片係在其他技術無法完成時使用，諸如當可疑黑痣非常大時使用。

【0664】在一些實施例中，小活體組織切片為肺活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片係藉由支氣管鏡檢獲得。一般而言，支氣管鏡檢係在患者麻醉下使小工具通過鼻或口、下至咽喉且進入支氣管通道，其中小工具係用於移除一些組織。在一些實施例中，在無法經由支氣管鏡檢達到腫瘤或生長物的情況下，可以採用經胸針吸活體組織切片。一般而言，對於經胸針吸活體組織切片，患者亦處於麻醉下且將針穿過皮膚直接插入可疑位點以移除小樣本的組織。在一些實施例中，經胸針吸活體組織切片可能需要介入性放射線學(例如使用x射線或CT掃描引導針頭)。在一些實施例中，小活體組織切片係藉由針吸活體組織切片獲得。在一些實施例中，小活體組織切片係經內視鏡超音波獲得(例如，內視鏡附燈且經口置於食道中)。在一些實施例中，小活體組織切片係經手術獲得。

【0665】在一些實施例中，小活體組織切片為頭頸活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為切開式活體組織切片，其中自外觀異常區域切除一小塊組織。在一些實施例中，若容易接近異常區，則無需住院即可採集樣本。在一些實施例中，若腫瘤在口腔或咽喉內部較深處，則活體組織切片可能需要在手術室全身麻醉進行。在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片。

在一些實施例中，小活體組織切片為切除式活體組織切片，其中移除整個區域。在一些實施例中，小活體組織切片為細針抽吸(FNA)。在一些實施例中，小活體組織切片為細針抽吸(FNA)，其中使用附接至注射器之非常細的針頭自腫瘤或腫塊抽取(抽吸)細胞。在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為穿孔活體組織切片，其中使用穿孔鑷移除一塊可疑區域。

【0666】在一些實施例中，小活體組織切片為子宮頸活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片係經由陰道鏡獲得。通常，陰道鏡方法採用附接至雙目放大鏡的附燈放大儀器(陰道鏡)，接著用於對一小部分之子宮頸進行活體組織切片檢查。在一些實施例中，小活體組織切片為子宮頸錐狀切除/錐狀活體組織切片。在一些實施例中，小活體組織切片為子宮頸錐狀切除/錐狀活體組織切片，其中可能需要門診手術以自子宮頸移除較大塊組織。在一些實施例中，錐狀活體組織切片除了有助於確診之外，錐狀活體組織切片亦可以用作初始治療。

【0667】術語「實體腫瘤」係指通常不含囊腫或液體區域的異常組織團塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。術語「實體腫瘤癌症」係指惡性、贅生性或癌性實體腫瘤。實體腫瘤癌症包括肺癌。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，癌症係非小細胞肺癌(NSCLC)。實體腫瘤之組織結構包括相互相依組織隔室，包括實質(癌

細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支援性微環境之支援性基質細胞。

【0668】在一些實施例中，來自腫瘤之樣本係以細針抽吸物(FNA)、粗針活體組織切片、小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)形式獲得。在一些實施例中，首先將樣本置於G-REX-10中。在一些實施例中，當有1個或2個粗針活體組織切片及/或小活體組織切片樣本時，首先將樣本置於G-REX-10中。在一些實施例中，當有3個、4個、5個、6個、8個、9個或10個或更多個粗針活體組織切片及/或小活體組織切片樣本時，首先將樣本置於G-REX-100中。在一些實施例中，當有3個、4個、5個、6個、8個、9個或10個或更多個粗針活體組織切片及/或小活體組織切片樣本時，首先將樣本置於G-REX-500中。

【0669】FNA可獲自皮膚腫瘤，包括例如黑色素瘤。在一些實施例中，FNA獲自皮膚腫瘤，諸如來自患有轉移性黑色素瘤之患者的皮膚腫瘤。在一些情況下，患有黑色素瘤之患者先前已經受手術治療。

【0670】FNA可獲自肺腫瘤，包括例如NSCLC。在一些實施例中，FNA係獲自肺腫瘤，諸如來自非小細胞肺癌(NSCLC)患者的肺腫瘤。在一些情況下，NSCLC患者先前已經受手術治療。

【0671】本文所描述之TIL可獲自FNA樣本。在一些情況下，FNA樣本係使用在18號針頭至25號針頭範圍中的細號規針頭自患者獲得或分離。細號規針頭可為18號、19

號、20號、21號、22號、23號、24號或25號。在一些實施例中，來自患者之FNA樣本可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【0672】在一些情況下，本文所描述之TIL係獲自粗針活體組織切片樣本。在一些情況下，粗針活體組織切片樣本係使用在11號針頭至16號針頭範圍中的外科或醫用針頭自患者獲得或分離。針頭可為11號、12號、13號、14號、15號或16號。在一些實施例中，來自患者之粗針活體組織切片樣本可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【0673】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【0674】在一些實施例中，TIL並非獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，實體腫瘤核心未經碎斷。

【0675】在一些實施例中，TIL獲自腫瘤碎解物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解

離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術有限公司的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且其接著再次機械破壞大致1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，若在第三次機械破壞後大片組織仍存在，則可施加1或2次另外機械解離至樣本，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，若在最終培育結束時細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用菲科爾(Ficoll)之密度梯度分離以移除此等細胞。

【0676】在一些實施例中，獲得第一TIL群體包含多病灶取樣方法。

【0677】腫瘤解離酶混合物可包括一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包括任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、酪蛋白酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶)、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【0678】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶重構。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液，諸如漢克氏平衡鹽溶液(Hank's balance salt solution，HBSS)中重構。

【0679】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 mL至15 mL緩衝液中重構。在一些實施例中，在重構後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL，例如，約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL或約400 PZ U/mL。

【0680】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。在一些實施例中，在重構後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/mL至約400 DMC/mL，例如，約100 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL至約350 DMC/mL、約100 DMC/mL至約300 DMC/mL、約150 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190

DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL或約400 DMC/mL。

【0681】在一些實施例中，DNA酶I係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中重構。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在重構後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/mL至10 KU/mL，例如約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6 KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL或約10 KU/mL。

【0682】在一些實施例中，酶儲備液會發生變化，因此請驗證凍乾儲備液之濃度，並相應地修改添加至碎解混合物中的酶之最終量。

【0683】在一些實施例中，酶混合物包括約4.7 mL無菌HBSS中的約10.2 ul中性蛋白酶(0.36 DMC U/mL)、21.3 ul膠原蛋白酶(1.2 PZ/mL)及250 ul DNA酶I(200 U/mL)。

2. 胸膜滲出液T細胞及TIL

【0684】在一些實施例中，樣本為胸膜液樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之T細胞或TIL的來源為胸膜液樣本。在一些實施例中，樣本為源於胸膜滲出液之樣本。在一些實施例中，根據本文所描述之過程的用於擴增之T細胞或TIL的來源為源於胸膜滲出液之樣本。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文

中。

【0685】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸膜滲出液。此類樣本可來源於原發性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，樣本可為來源於另一器官(例如乳房、卵巢、結腸或前列腺)之繼發轉移性癌細胞。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜滲出物(pleural exudate)。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣本為胸膜溢出物(pleural transudate)。其他生物樣本可包括含有TIL之其他漿液，包括例如來自腹部之腹水液或胰囊腫液。腹水液及胸膜液涉及非常類似的化學系統；腹部及肺兩者在相同的惡性腫瘤事件中於胸腔及腹腔中皆具有間皮細胞株及流體形式，且在一些實施例中，此類流體含有TIL。在本發明例示胸膜液之一些實施例中，可使用含有TIL之腹水或其他囊腫液進行相同的方法以得到類似結果。

【0686】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施例中，在自患者收集之後立即將樣本置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降

低。在一些實施例中，樣本係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣本係在4℃下自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。

【0687】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣本。在一些實施例中，稀釋度為1:10胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:9胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:5胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:2胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:1胸膜液比稀釋劑。在一些實施例中，稀釋劑包括鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、另一緩衝液或生理學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，樣本係在自患者收集及稀釋之後立即置於CellSave管中，以避免活TIL減少，若保留在未經處理之胸膜液中，則即使在4℃下，活TIL可能在24至48小時內顯著減少。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，胸膜液樣本係在自患者移除且在4℃下稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。

【0688】在另其他實施例中，在進一步處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在

胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜液樣本自個體中取出後將其離心並將離心液或離心塊再懸浮於緩衝液中來製備胸膜液樣本。在一些實施例中，對胸膜液樣本進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【0689】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣本。在一些實施例中，在接觸步驟中使用之胸膜液樣本係藉由將流體經由含有已知且基本均勻的孔徑的過濾器過濾而製備的，該孔徑允許胸膜液通過膜但保留腫瘤細胞。在一些實施例中，膜中的孔之直徑可為至少4 μM。在其他實施例中，孔徑可為5 μM或更大，且在其他實施例中，可為6 μM、7 μM、8 μM、9 μM或10 μM中之任一者。過濾之後，可將被膜保留之細胞(包括TIL)自膜上衝出至適合的生理學上可接受之緩衝液中。然後可以將以此方式濃縮之細胞(包括TIL)用於該方法之接觸步驟中。

【0690】在一些實施例中，使胸膜液樣本(包括例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞離心塊與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣本中存在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包括單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試

劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包括BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包括Versalyse™系統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統或Erythrolyse II系統(貝克曼庫爾特公司(Beckman Coulter, Inc.))或氯化銨系統。在一些實施例中，溶解試劑可隨主要需求而變化，該等需求為紅血球之有效溶解及TIL之保守性及胸膜液中TIL之表型特性。除採用單一試劑用於溶解之外，適用於本文所描述之方法的溶解系統可包括第二試劑，例如在該方法之剩餘步驟期間淬滅或延遲溶解試劑之效應的第二試劑，例如Stabilyse™試劑(貝克曼庫爾特公司)。視溶解試劑之選擇或該方法之較佳實施而定，亦可採用習知固定試劑。

【0691】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣本，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴增。

3. 擴增來自周邊血液之周邊血液淋巴球(PBL)之方法

【0692】PBL方法1。在本發明之一些實施例中，PBL係使用本文所描述之方法擴增。在本發明之一些實施例中，該方法包含獲得來自全血之PBMC樣本。在一些實施例中，該方法包含藉由使用非CD19+級份之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。在一些實施例中，該

方法包含藉由使用非CD19+級份之基於磁珠之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。

【0693】在本發明之一些實施例中，PBL方法1如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣本解凍且計算PBMC之數目。使用人類泛T細胞分離套組與LS管柱(美天旎生物技術)分離T細胞。

【0694】PBL方法2。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法2擴增，該方法包含獲得來自全血之PBMC樣本。藉由在37℃下培育PBMC至少三小時且接著分離非附著細胞來富集來自PBMC之T細胞。

【0695】在本發明之一些實施例中，PBL方法2如下進行：在第0天，將經冷凍保存之PMBC樣本解凍，且將PBMC細胞以每孔6百萬個細胞接種於CM-2培養基中之6孔盤中且在37℃下培育3小時。3小時後，移除非附著細胞(其係PBL)且計算其數目。

【0696】PBL方法3。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法3擴增，該方法包含獲得來自周邊血液之PBMC樣本。B細胞係使用CD19+選擇分離且T細胞係使用負向選擇PBMC樣本之非CD19+級份來選擇。

【0697】在本發明之一些實施例中，PBL方法3如下進行：在第0天，將來源於周邊血液的冷凍保存之PBMC解凍且計算其數目。使用CD19多分選人類套組(美天旎生物技術)分選CD19+ B細胞。在非CD19+細胞級份中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱(美天旎生物技術)純化T細

胞。

【0698】在一些實施例中，PBMC係自全血樣本分離。在一些實施例中，使用PBMC樣本作為擴增PBL之起始物質。在一些實施例中，樣本在擴增過程之前經冷凍保存。在其他實施例中，使用新鮮樣本作為擴增PBL之起始物質。在本發明之一些實施例中，使用本領域中已知之方法自PBMC分離T細胞。在一些實施例中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱分離T細胞。在本發明之一些實施例中，使用本領域中已知之抗體選擇方法(例如CD19負向選擇)自PBMC分離T細胞。

【0699】在本發明之一些實施例中，PBMC樣本係在有效鑑別非附著細胞之所需溫度下培育一段時間。在本發明之一些實施例中，培育時間為約3小時。在本發明之一些實施例中，溫度為約37℃。接著使用上述過程擴增非附著細胞。

【0700】在一些實施例中，PBMC樣本係來自視情況已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，腫瘤樣本係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者，其已進行治療至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或1年或更長。在其他實施例中，PBMC係來源於當前進行ITK抑制劑方案(諸如伊布替

尼(ibrutinib))之患者。

【0701】在一些實施例中，PBMC樣本係來自已用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療且難以用激酶抑制劑或ITK抑制劑(諸如伊布替尼)治療之個體或患者。

【0702】在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣本係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療且尚未進行治療達至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或至少1年或更長之個體或患者。在其他實施例中，PBMC來源於先前暴露於ITK抑制劑但在至少3個月、至少6個月、至少9個月或至少1年內尚未經治療之患者。

【0703】在本發明之一些實施例中，在第0天，針對CD19+選擇細胞且據此分選。在本發明之一些實施例中，使用抗體結合珠粒進行選擇。在本發明之一些實施例中，在第0天自PBMC分離純T細胞。

【0704】在本發明之一些實施例中，對於未經伊布替尼或其他ITK抑制劑預處理之患者，10至15 mL白血球層將產生約5×10^9個PBMC，其又將產生約5.5×10^7個PBL。

【0705】在本發明之一些實施例中，對於經伊布替尼或其他ITK抑制劑預治療之患者，擴增過程將產生約20×

10^9個PBL。在本發明之一些實施例中，40.3×10^6個PBMC將產生約4.7×10^5個PBL。

【0706】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣本，藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自本領域中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

【0707】在一些實施例中，PBL使用美國專利申請公開案第US 2020/0347350 A1號中所描述之方法製備，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

4. 擴增來自骨髓衍生之PBMC的骨髓浸潤性淋巴球(MIL)的方法

【0708】MIL方法3。在本發明之一些實施例中，該方法包含獲得來自骨髓之PBMC。在第0天，針對CD3+/CD33+/CD20+/CD14+選擇PBMC且分選，且將非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+細胞級份進行音波處理且將一部分經音波處理之細胞級份添加回至所選細胞級份中。

【0709】在本發明之一些實施例中，MIL方法3如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣本解凍且計算PBMC之數目。將細胞用CD3、CD33、CD20及CD14抗體染色且使用S3e細胞分選器(Bio-Rad)分選。將細胞分選成兩種級份：免疫細胞級份(MIL部分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)及AML胚細胞級份(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。

【0710】在本發明之一些實施例中，PBMC係獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC係經由血球分離術、抽吸、

針吸活體組織切片或本領域中已知之其他類似方式獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC為新鮮的。在其他實施例中，PBMC經冷凍保存。

【0711】在本發明之一些實施例中，MIL係自10至50 ml骨髓抽吸物擴增。在本發明之一些實施例中，自患者獲得10 mL骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得20 mL骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得30 mL骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得40 mL骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得50 mL骨髓抽吸物。

【0712】在本發明之一些實施例中，自約10至50 mL骨髓抽吸物產生之PBMC的數目為約5×10^7至約10×10^7個PBMC。在其他實施例中，產生之PMBC之數目為約7×10^7個PBMC。

【0713】在本發明之一些實施例中，約5×10^7至約10×10^7個PBMC產生約0.5×10^6至約1.5×10^6個MIL。在本發明之一些實施例中，產生約1×10^6個MIL。

【0714】在本發明之一些實施例中，來源於骨髓抽吸物之12×10^6個PBMC產生大約1.4×10^5個MIL。

【0715】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣本、骨髓、藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自本領域中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

【0716】在一些實施例中，使用美國專利申請公開案第US 2020/0347350 A1號中所描述之方法製備MIL，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

B. 步驟B：初始第一擴增

【0717】在一些實施例中，本發明方法提供較年輕TIL，該等較年輕TIL相較於較老TIL(亦即，在向個體/患者投與之前已進一步進行更多次複製的TIL)可能提供額外治療益處。年輕TIL之特徵已描述於文獻中，例如於Donia等人，《斯堪的納維亞免疫學雜誌(*Scand. J. Immunol.*)》**2012,** *75,* 157-167；Dudley等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》**2010,** *16,* 6122-6131；Huang等人，《免疫學雜誌》**2005,** *28,* 258-267；Besser等人，《臨床癌症研究》**2013,** *19,* OF1-OF9；Besser等人，《免疫學雜誌》**2009**, *32,* 415-423；Robbins等人，《免疫學雜誌》**2004**, *173,* 7125-7130；Shen等人，《免疫學雜誌》**2007,** *30,* 123-129；Zhou等人，《免疫學雜誌》**2005,** *28,* 53-62；及Tran等人，《免疫學雜誌》**2008**, *31,* 742-751，其中之每一者以引用的方式併入本文中。

【0718】在例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C)之步驟A中所描述的腫瘤碎片及/或腫瘤碎片之分割或碎解之後，將所得細胞在有利於TIL但不利於腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、OKT-3及飼養細胞(例如抗原呈現飼養細胞)的血清中。在一些實施例中，IL-2、OKT-3及飼養細胞在培養起始時(例如在第0天)與腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片一起添加。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片以每容器至多60個碎片且與

6000 IU/mL IL-2培育於容器中。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養通常1至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養通常1至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，初始第一擴增發生1至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生5至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生5至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約6至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此初始第一擴增發生約8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【0719】在一些實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文所描述之初始第一擴增步驟(例如圖8(特別係例如

圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等者，其可包括稱為預REP或初始REP之過程且其自第0天及/或自培養起始含有飼養細胞)進行，接著進行如下文步驟D及本文所描述之快速第二擴增(步驟D，包括稱為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況選用之冷凍保存，且接著進行如下文及本文所描述之第二步驟D(包括稱為再刺激REP步驟之過程)。獲自此過程之TIL可視情況針對如本文所描述之表型特徵及代謝參數進行表徵。在一些實施例中，腫瘤碎片在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【0720】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。

【0721】在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤碎片。在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤碎片被放入少於或等於4個容器中。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，少於或等於60個腫瘤碎片被放入1個容器中。在一些實施例中，各容器包含每容器少於或等於500 mL培養基。在一些實施例中，培養基包含IL-2。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，培養基包含抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在一些實施例中，培養基包含每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一

些實施例中，培養基包含OKT-3。在一些實施例中，培養基包含每容器30 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2、30 ng OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【0722】在製備腫瘤碎片之後，將所得細胞(亦即，為初代細胞群體之碎片)在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、抗原呈現飼養細胞及OKT-3之培養基中，且其允許自第0天培養起始開始TIL起動及加速生長。在一些實施例中，腫瘤碎解物及/或腫瘤碎片與6000 IU/mL IL-2以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3一起培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至8天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在初始第一擴增期間的生長培養基包含IL-2或其變異體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在初始第一擴增期間的生長培養基包含IL-2或其變異體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，IL-2為重組人類IL-2(rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有25

$\times 10^6$ IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有5至7×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有6×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液如實例C中所描述製備。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約10,000 IU/mL IL-2、約9,000 IU/mL IL-2、約8,000 IU/mL IL-2、約7,000 IU/mL IL-2、約6000 IU/mL IL-2或約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約9,000 IU/mL IL-2至約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約8,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約7,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、

約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含1000至2000 IU/mL、2000至3000 IU/mL、3000至4000 IU/mL、4000至5000 IU/mL、5000至6000 IU/mL、6000至7000 IU/mL、7000至8000 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。

【0723】在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【0724】在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培

養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【0725】在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含OKT-3抗體。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL

之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含15 ng/mL與30 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。參見例如表1。

【0726】在一些實施例中，初始第一擴增細胞培養基在細胞培養基中包含一或多種TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL與100 μg/mL之間之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL與40 μg/mL之間之濃度。

【0727】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，初始第一擴增細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，初始第一擴增細胞培養基進一步包含初始濃度約6000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一

或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0728】在一些實施例中，初始第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在一些實施例中，CM為實例中所描述之CM1。在一些實施例中，初始第一擴增發生於初始細胞培養基或第一細胞培養基中。在一些實施例中，初始第一擴增培養基或初始細胞培養基或第一細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為飼養細胞)。

【0729】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【0730】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基

(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0731】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括但不限於以下中之一或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0732】在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基

礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0733】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0734】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例

中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0735】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一

些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽

默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0736】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0737】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM，或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【0738】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群組之成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之

群組之成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物及一或多種選自由以下組成之群組之成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0739】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【0740】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

【0741】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於

約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0742】在一些實施例中，於Smith等人，《臨床與轉化免疫學》4(1)2015(doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【0743】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0744】在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為1至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始

REP之彼等過程)為2至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為5至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為6至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖1(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為7至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/

或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為1至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為2至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為3至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為4至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8B及/或圖8C)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為5至7天，如實例及圖式中所論述。在一些

實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為6至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，初始第一擴增過程(包括諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或初始REP之彼等過程)為7天，如實例及圖式中所論述。

【0745】在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎

斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7天。

【0746】在一些實施例中，TIL之初始第一擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴

增可進行6天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天。

【0747】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在初始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包括在初始第一擴增期間，包括例如在根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)以及本文所描述之步驟B過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在初始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包括在根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)以及如本文所描述之步驟B過程期間。

【0748】在一些實施例中，初始第一擴增(例如根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-10。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【0749】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在初始第一擴增期間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在初始第一擴增期間第4至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在初始第一擴增期間第4至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之

彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第5至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第5至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第6至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第6至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖

8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第7或8天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第7天期間的任何時間添加。在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」),而係在初始第一擴增期間第8天期間的任何時間添加。

【0750】在一些實施例中,本文所描述之初始第一擴增程序(例如包括如下擴增,諸如圖8(特別係例如圖8B)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或初始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時及初始第一擴增期間需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在許多實施例中,飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單

位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每容器2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-10 2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增期間使用每GREX-100 2.5×10^8個飼養細胞。

【0751】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【0752】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【0753】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【0754】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在初始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非

勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/ml OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【0755】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【0756】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比

率。在其他實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在又其他實施例中，本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又其他實施例中，本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞。在又其他實施例中，初始第一擴增需要四分之一、三分之一、十二分之五或二分之一的用於快速第二擴增之飼養細胞數目。

【0757】在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包含IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包含抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包含每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基包含OKT-3。在一些實施例中，培養基包含每容器30 ng OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器每2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，培養基包含每容器500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包含500 mL培養基、6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈

現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器500 mL培養基、6000 IU/mL IL-2、15 μg OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器每2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。

【0758】在一些實施例中，本文所描述之初始第一擴增程序在第二擴增期間需要多於TIL的過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【0759】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包括圖式及實例中所描述之例示性程序。

【0760】在一些實施例中，在初始第一擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

2. 細胞介素及其他添加劑

【0761】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別係IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0762】或者，使用細胞介素與以下之組合進行TIL之初始第一擴增亦為可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述的IL-2、IL-15及IL-21中之兩種或更多種的組合，其揭示內容以引用之方式併入本文

中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且特別係如其中所描述之T細胞。參見例如表2。

【0763】在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基添加OKT-3抗體或莫羅單抗，如本文別處所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基添加4-1BB促效劑，如本文別處所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基添加OX-40促效劑，如本文別處所描述。此外，可在步驟B期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧物酶體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

C. 步驟C：初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

【0764】在一些情況下，獲自初始第一擴增(其可包括有時稱為預REP之擴增)之主體TIL群體，包括例如獲自例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所指示之步驟B的TIL群體，可經歷快速第二擴增(其可包括有時稱為快速擴增方案(REP)之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在經遺傳修飾之TIL將用於療法的情況下，來自初始第一擴增之經擴增TIL群體或來自快速第二擴增之經擴增TIL群

體可在擴增步驟之前或在初始第一擴增之後且在快速第二擴增之前進行遺傳修飾以用於合適治療。

【0765】在一些實施例中，獲自初始第一擴增(例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所指示之步驟B)之TIL經儲存直至為了選擇而測定表型。在一些實施例中，獲自初始第一擴增(例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所指示之步驟B)之TIL不經儲存且直接進行快速第二擴增。在一些實施例中，獲自初始第一擴增之TIL在初始第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在腫瘤碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約3天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約3天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二

擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約8天發生。

【0766】在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後

及/或第一初始擴增步驟起始後3天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至7天發生在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天至8天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天發生。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變在碎斷發生後及/或第一初始擴增步驟起始後8天發生。

【0767】在一些實施例中，TIL在初級第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經儲存，且TIL直接進行快速第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖8(特別係例如圖8A

及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所顯示的步驟B至步驟D之轉變期間不經儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自初始第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行快速第二擴增而無轉變期。

【0768】在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變(例如根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟C)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如GREX-10或GREX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。在一些實施例中，初始第一擴增至快速第二擴增之轉變涉及容器大小之規模縱向擴大。在一些實施例中，初始第一擴增與快速第二擴增相比係在較小容器中進行。在一些實施例中，初始第一擴增在GREX-100中進行且快速第二擴增在GREX-500中進行。

D. 步驟D：快速第二擴增

【0769】在一些實施例中，TIL細胞群體在如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所指示之收集及初始第一擴增(步驟A及步驟B)及稱為步驟C之轉變之後進一步擴增數目。此

進一步擴增在本文中稱為快速第二擴增或快速擴增，其可包括在本領域中通常稱為快速擴增過程(快速擴增方案或REP)之擴增過程；以及如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中所指示之過程。快速第二擴增通常使用包含多種組分(包括飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完成。在一些實施例中，在快速第二擴增起始後1天、2天、3天或4天(亦即，在整體Gen 3過程之第8、9、10或11天)，將TIL轉移至較大體積容器。

【0770】在一些實施例中，TIL之快速第二擴增(其可包括有時稱為REP之擴增；以及如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中所指示之過程)可使用本領域中熟習此項技術者已知之任何TIL培養瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至

約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天。在一些實施

例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約10天。

【0771】在一些實施例中，快速第二擴增可在透氣容器中使用本揭示案之方法(包括例如稱為REP之擴增；以及如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中所指示之過程)進行。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)存在下擴增。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞存在下擴增，其中將飼養細胞添加至最終濃度，該最終濃度為存在於初始第一擴增中之飼養細胞濃度的兩倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包括例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/mL OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥市的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包括一或多種癌症之抗原(包括其抗原部分，諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表

現，該載體諸如人類白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1: 26-35(27 L)或gp1 00:209-217(210M)。其他適合抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【0772】在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含1000與2000 IU/mL之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或8000 IU/mL之間的IL-2。

【0773】在一些實施例中，細胞培養基包含OKT-3抗

體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、1 ng/mL與5 ng/mL之間、5 ng/mL與10 ng/mL之間、10 ng/mL與20 ng/mL之間、20 ng/mL與30 ng/mL之間、30 ng/mL與40 ng/mL之間、40 ng/mL與50 ng/mL之間及50 ng/mL與100 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含15 ng/mL與30 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含30 ng/mL與60 ng/mL之間的OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，細胞培養基包含約60 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【0774】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含IL-2。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含每容器7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含OKT-3。在一些實施例

中，快速第二擴增中之培養基包含每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-REX-100 MCS培養瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【0775】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含IL-2。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-REX-100 MCS培養瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【0776】在一些實施例中，細胞培養基包含一或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由

以下組成之群組：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL與100 μg/mL之間之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL與40 μg/mL之間之濃度。

【0777】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0778】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合可包括在第二擴增期間，包括例如在根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)以及本文所描述之步驟D過程期間。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合可包括在根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)及如本文所描述之步驟D過程期間。

【0779】在一些實施例中，第二擴增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包含TNFRSF促效劑之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在

補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原呈現細胞)之細胞培養基中發生。

【0780】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【0781】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約

20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【0782】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比10、約1比15、約1比20、約1比25、約1比30、約1比35、約1比40、約1比45、約1比50、約1比75、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400、或約1比500。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【0783】在一些實施例中，REP及/或快速第二擴增在

培養瓶中進行，其中主體TIL與100倍或200倍過量的去活化飼養細胞、30 ng/mL OKT3抗CD3抗體及6000 IU/mL IL-2混合於150 mL培養基中，其中飼養細胞濃度係初始第一擴增中之飼養細胞濃度的至少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。替換培養基(通常經由抽取2/3消耗之培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基)直至細胞轉移至替代生長箱室。替代生長箱室包括G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0784】在一些實施例中，快速第二擴增(其可包括稱為REP過程之過程)為7至9天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第二擴增為7天。在一些實施例中，第二擴增為8天。在一些實施例中，第二擴增為9天。

【0785】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP之擴增，以及在圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中提及之彼等者)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣培養瓶(G-REX-100，可購自美國明尼蘇達州新布賴頓市的威爾遜狼製造公司(Wilson Wolf Manufacturing Corporation))中進行，5×10^6或10×10^6個TIL可與PBMC在400 mL的補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/ml 抗CD3(OKT3)之50/50培養基中培養。G-REX-100培

養瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。在第5天，可將250 mL上清液移除且放入離心瓶中且以1500 rpm(491×g)離心10分鐘。TIL離心塊可用150 mL具有5%人類AB血清、6000 IU/mL IL-2之新鮮培養基再懸浮，且添加回原始GREX-100培養瓶中。當TIL在GREX-100培養瓶中連續擴增時，在第10或11天可將TIL移至較大培養瓶，諸如GREX-500。可在培養第14天收集細胞。細胞可在培養的第15天收集。細胞可在培養的第16天收集。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，藉由抽取消耗之培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基。在一些實施例中，替代生長箱室包括GREX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【0786】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【0787】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克

氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0788】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括但不限於以下中之一或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【0789】在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基使用，該生長培養

基包括但不限於CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0790】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0791】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫

細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巯基乙醇。

【0792】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巯基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巯基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巯基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巯基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巯基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞

擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及55 mM 2-巰基乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)及約2 mM麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL IL-2。

【0793】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約2 mM之麩

醯胺酸(亦即GlutaMAX®)。

【0794】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM，或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55 mM之2-巰基乙醇。

【0795】在一些實施例中，國際專利申請公開案第WO1998/030679號及美國專利申請公開案第US 2002/0076747 A1號中所描述之確定培養基(其以引用之方式併入本文中)適用於本發明中。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群組之成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群組之成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物

及一或多種選自由以下組成之群組之成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群組之成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群組：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【0796】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250

mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【0797】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列出之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表4中標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列出之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含表4中的類型及標題「補充劑之較佳實施例」欄中列出之濃度的非微量部分成分。

【0798】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【0799】在一些實施例中，於Smith等人，《臨床與轉化免疫學》4(1)2015(doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【0800】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【0801】在一些實施例中，進行快速第二擴增(包括稱為REP之擴增)，且其進一步包含其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL之步驟。可使用本領域中已知之任何選擇方法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【0802】視情況，可在快速第二擴增(包括稱為REP擴增之擴增)之後使用本領域中已知之標準分析來進行細胞存活率分析。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活性評定。在一些實施例中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活性。在一些實施例中，存活性係根據標準Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判

定。

【0803】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第二擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組之T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。

【0804】在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含6000 IU/mL IL-2、30 ug/培養瓶OKT-3以

及如下文更詳細論述之7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含6000 IU/mL IL-2、30 ug/培養瓶OKT-3以及如下文更詳細論述之5×10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)。

【0805】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-100或G-REX-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-500。

【0806】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大(scaling up)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的TIL轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500-MCS容器)且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的TIL

約4天至7天之時段。

【0807】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大(scaling out)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的第一小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與第一容器相等的第二容器之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的TIL部分於第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。

【0808】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個TIL亞群中。

【0809】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分於較大規模培養中培養約4天至7天之時段。

【0810】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為

複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約5天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的TIL轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500 MCS容器)之中，其中在各第二容器中，經轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分於較大規模培養中培養約6天之時段。

【0811】在一些實施例中，在分種快速第二擴增時，各第二容器包含至少10^8個TIL。在一些實施例中，在分種快速或第二擴增時，各第二容器包含至少10^8個TIL、至少10^9個TIL或至少10^{10}個TIL。在一個例示性實施例中，各第二容器包含至少10^{10}個TIL。

【0812】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2、3、4或5個亞群中。

【0813】在一些實施例中，在完成快速第二擴增後，複數個亞群包含治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速或第二擴增後，將一或多個TIL亞群合併在一起以產生治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，各TIL亞群包含治療有效量之TIL。

【0814】在一些實施例中，在分成複數個步驟之前將

快速第二擴增進行約3至7天之時段。在一些實施例中，快速第二擴增之分種發生在快速或第二擴增開始後約第3天、第4天、第5天、第6天或第7天。

【0815】在一些實施例中，快速第二擴增之分種發生在第一擴增(亦即預REP擴增)開始後約第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天或第16天、第17天或第18天。在一個例示性實施例中，快速或第二擴增之分種發生在第一擴增開始後約第16天。

【0816】在一些實施例中，在分種之後，快速第二擴增進一步進行約7至11天之時段。在一些實施例中，在分種之後，快速第二擴增進一步進行約5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段。

【0817】在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基包含與分種後用於快速第二擴增之細胞培養基相同的組分。在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基包含與分種後用於快速第二擴增之細胞培養基不同的組分。

【0818】在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC。在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及進一步視情況APC。在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及APC。

【0819】在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增

之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況OKT-3及進一步視情況APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種前用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生的。

【0820】在一些實施例中，分種後用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2及視情況OKT-3。在一些實施例中，分種後用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2及OKT-3。在一些實施例中，分種後用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及視情況OKT-3之新鮮培養基來替換分種前用於快速第二擴增之細胞培養基而產生的。在一些實施例中，分種後用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及OKT-3之新鮮培養基來替換分種前用於快速第二擴增之細胞培養基而產生的。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【0821】在一些實施例中，本文所描述之快速第二擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(特別係例如圖8A及/

或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中所描述之彼等擴增以及稱為REP之彼等擴增)在REP TIL擴增期間及/或在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【0822】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射同種異體PBMC之複製非勝任之例示性方案。

【0823】在一些實施例中，若第7或14天活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【0824】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在60 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在60 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【0825】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP第0天及/或第二擴增第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係複製非勝任的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【0826】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比10、約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【0827】在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程

序需要約5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在又其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在又其他實施例中，快速第二擴增需要快速第二擴增的兩倍數目的飼養細胞。在又其他實施例中，當本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約5×10^8個飼養細胞。在又其他實施例中，當本文所描述之初始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約7.5×10^8個飼養細胞。在又其他實施例中，快速第二擴增需要初始第一擴增的兩倍(2.0X)、2.5X、3.0X、3.5X或4.0X數目的飼養細胞。

【0828】在一些實施例中，本文所描述之快速第二擴增程序在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。在一些實施例中，PBMC以添加至初始第一擴增之PBMC濃度的兩

倍添加至快速第二擴增。

【0829】一般而言，同種異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且用於本文所描述之TIL擴增程序，包括圖式及實例中所描述之例示性程序。

【0830】在一些實施例中，在快速第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

2. 細胞介素及其他添加劑

【0831】本文所描述之快速第二擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別係IL-2)之培養基，如本領域中所已知。

【0832】或者，使用細胞介素之組合來快速第二擴增TIL亦係可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述，使用兩種或更多種IL-2、IL-15及IL-21之組合，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且特別係如其中所描述之T細胞。

【0833】在一些實施例中，步驟D(特別係來自例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)亦可包括將OKT-3抗體或莫羅單抗添加至培養基中，如本文別處所描述。在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基添加4-1BB促效劑，如本文別處所描述。在一

些實施例中，步驟D(特別係來自例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)亦可包括將OX-40促效劑添加至培養基中，如本文別處所描述。此外，可在步驟D(特別係來自例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧物酶體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

E. 步驟E：收集TIL

【0834】在快速第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所提供之一、二、三、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所提供之兩個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所提供之兩個擴增步驟(一個初始第一擴增及一個快速第二擴增)之後收集TIL。

【0835】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包括例如離心。收集TIL之方法為此項技術中熟知的且任何此

類已知方法均可與本發明過程一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【0836】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包括例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec Life Science、珀金埃爾默(Perkin Elmer)及Inotech Biosystems International, Inc.。本發明方法可採用任何基於細胞之收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統為基於膜之細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集係經由細胞處理系統，諸如LOVO系統(由費森尤斯卡比製造)進行。術語「LOVO細胞處理系統」亦係指由任何供應商製造之任何可在無菌及/或密閉系統環境中將包含細胞之溶液泵送通過膜或過濾器(諸如旋轉膜或旋轉過濾器)的儀器或裝置，從而允許連續流動及細胞處理以移除上清液或細胞培養基而不發生團塊化。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中進行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【0837】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-100或G-REX-

500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-500。

【0838】在一些實施例中，根據圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟E係根據本文所描述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如本文所描述之密閉系統。

【0839】在一些實施例中，根據本文所描述之方法收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法收集第14與16天之間的TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第14天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第15天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所描述之方法在第16天收集TIL。

F. 步驟F：最終調配及轉移至輸注容器

【0840】在如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中以例示性次序提供且如上文及本文中所概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器中以用於向患者投與，諸如輸注袋或無菌小瓶。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療足夠數目之TIL後，將其轉移至容器以用於向患者投與。

【0841】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組合物之形式向患者投與。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。如本文所揭示擴增之TIL可藉由如本領域中已知之任何合適途徑投與。在一些實施例中，TIL係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

IV. 進一步的Gen 2、Gen 3及其他TIL製造過程實施例

A. PBMC飼養細胞比率

【0842】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(參見例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D))的培養基包括抗CD3抗體，例如OKT-3。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》1985, 135, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【0843】在一些實施例中，PBMC飼養細胞層之數目如下計算：

A. T細胞體積(直徑10 μm)：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 523.6\ \mu m^3$

B. 具有40 μm(4個細胞)高度之G-REX-100(M)體積：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 4 \times 10^{12}\ \mu m^3$

C. 填滿體積B所需之細胞數目：$4 \times 10^{12}\ \mu m^3 / 523.6\ \mu m^3 = 7.6 \times 10^8\ \mu m^3 * 0.64 = 4.86 \times 10^8$

D. 可在4D空間中經最佳活化之細胞數目：$4.86\times10^8/24 = 20.25\times10^6$

E. 外推至G-REX-500之飼養細胞及TIL數目：TIL：100×10^6及飼養細胞：2.5×10^9

【0844】在此計算中，使用在具有100 cm^2基底的圓柱體中提供TIL活化之二十面體幾何學所需的單核細胞近似數目。計算導出的T細胞臨界值活化的實驗結果為約5×10^8，其與NCI實驗資料密切相關，如Jin等人，《免疫療法雜誌》2012, *35*, 283-292中所描述。在(C)中，乘數(0.64)係等效球體的隨機填充密度，由Jaeger及Nagel，《科學》, 1992, *255*, 1523-3計算得出。在(D)中，除數24係4維空間中可接觸類似物體的等效球體的數目或「牛頓數」，如Musin,《俄羅斯數學評論(*Russ. Math. Surv.*)》**2003**, *58*, 794-795中所描述。

【0845】在一些實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞數目大約為在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞數目的一半。在某些實施例中，方法包含在相較於快速第二擴增之細胞培養基包含大約50%較少抗原呈現細胞的細胞培養基中進行初始第一擴增。

【0846】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞(APC)數目大於在初始第一擴增期間外源供應的APC數目。

【0847】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【0848】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【0849】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【0850】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【0851】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【0852】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【0853】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍。

【0854】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【0855】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【0856】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【0857】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【0858】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【0859】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【0860】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【0861】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【0862】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【0863】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【0864】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【0865】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【0866】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【0867】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【0868】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【0869】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【0870】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【0871】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【0872】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【0873】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【0874】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【0875】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【0876】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【0877】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【0878】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源

供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【0879】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約2:1。

【0880】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在初始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【0881】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、$5.3\times$

10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC。

【0882】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍。

【0883】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC的範圍。

【0884】在其他實施例中，在初始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約2.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約5×10^8個APC。

【0885】在一些實施例中，在初始第一擴增第0天添

加的APC(包括例如PBMC)數目係在初始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加的PBMC數目的大約一半。在某些實施例中，方法包含在初始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞的數目係在初始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加之抗原呈現細胞數目的大約50%。

【0886】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目大於在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目。

【0887】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0888】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0889】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0890】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【0891】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×

10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【0892】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0893】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0894】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0895】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0896】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、$4.2\times$

10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【0897】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、

6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【0898】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0899】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0900】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約4×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【0901】在其他實施例中，在初始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約4×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【0902】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【0903】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【0904】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【0905】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【0906】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【0907】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【0908】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍。

【0909】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【0910】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【0911】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【0912】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【0913】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【0914】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【0915】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【0916】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【0917】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【0918】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【0919】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【0920】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【0921】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【0922】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【0923】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【0924】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【0925】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【0926】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【0927】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【0928】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【0929】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【0930】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【0931】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【0932】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【0933】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【0934】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係剛好或大約2:1。

【0935】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【0936】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、

1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC(包括例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC(包括例如PBMC)。

【0937】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約1×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約3.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約3.5×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約1×10^9個APC(包括例如PBMC)的範圍。

【0938】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約4×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約7.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍。

【0939】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約2×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約2.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約5.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍。

【0940】在其他實施例中，在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約2.5×10^8個APC(包括例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約5×10^8個APC(包括例如PBMC)。

【0941】在一些實施例中，在初始第一擴增第0天添加的APC(包括例如PBMC)層數係在快速第二擴增第7天添加的APC(包括例如PBMC)層數的大約一半。在某些實施例中，方法包含在初始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞層至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞層至第二TIL

群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞層的數目係在第7天添加之抗原呈現細胞層的數目的大約50%。

【0942】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)層數大於在初始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)層數。

【0943】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0944】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0945】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0946】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下

發生。

【0947】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0948】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1個細胞層至剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0949】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層至剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0950】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如

PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0951】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、2或3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【0952】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍。

【0953】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範圍。

【0954】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍。

【0955】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍。

【0956】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範圍。

【0957】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍。

【0958】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍。

【0959】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範圍。

【0960】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍。

【0961】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍。

【0962】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範圍。

【0963】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍。

【0964】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍。

【0965】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範圍。

【0966】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍。

【0967】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍。

【0968】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係剛好或大約1:2。

【0969】在其他實施例中，初始第一擴增的第0天在

具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

【0970】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係選自約1.0×10^6個APC/cm^2至約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約2.5×10^6個APC/cm^2至約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

【0971】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係選自約1.5×10^6個APC/cm^2至約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約3.5×10^6個

APC/cm^{2}至約6.0×10^{6}個APC/cm^{2}的範圍。

【0972】在一些實施例中，初始第一擴增中之APC數目係選自約2.0×10^{6}個APC/cm^{2}至約3.0×10^{6}個APC/cm^{2}的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約4.0×10^{6}個APC/cm^{2}至約5.5×10^{6}個APC/cm^{2}的範圍。

A. 視情況選用的細胞培養基組分

1. 抗CD3抗體

【0973】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(參見例如圖1及圖8(特別係例如圖8B))的培養基包括抗CD3抗體。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》**1985,** *135*, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【0974】如本領域中熟習此項技術者將瞭解，一些合適的抗人類CD3抗體可用於本發明，包括來自各種哺乳動物之抗人類CD3多株及單株抗體，包括但不限於鼠類、人類、靈長類動物、大鼠及犬科動物抗體。在一些實施例中，使用OKT3抗CD3抗體莫羅單抗(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil公司或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)。參見表1。

【0975】如本領域中熟習此項技術者將瞭解，一些合適的抗人類CD3抗體可用於本發明，包括來自各種哺乳動

物之抗人類CD3多株及單株抗體，包括但不限於鼠類、人類、靈長類動物、大鼠及犬科動物抗體。在一些實施例中，使用OKT3抗CD3抗體莫羅單抗(可購自新澤西州拉里坦市的Ortho-McNeil公司或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)。

2. 4-1BB(CD137)促效劑

【0976】在一些實施例中，初始第一擴增及/或快速第二擴增之細胞培養基包含TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB(CD137)促效劑。4-1BB促效劑可為本領域中已知之任何4-1BB結合分子。4-1BB結合分子可為能夠與人類或哺乳動物4-1BB結合之單株抗體或融合蛋白。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可包含免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所使用，術語結合分子亦包括抗體(包括全長抗體)；單株抗體(包括全長單株抗體)；多株抗體；多特異性抗體(例如雙特異性抗體)；人類、人源化或嵌合抗體；以及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生的片段、任何上述者之抗原決定基結合片段，以及與4-1BB結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一些實施例中，4-1BB促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，4-

1BB促效劑為一種人源化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本發明所揭示之方法及組合物中之4-1BB促效劑包括抗4-1BB抗體、人類抗4-1BB抗體、小鼠抗4-1BB抗體、哺乳動物抗4-1BB抗體、單株抗4-1BB抗體、多株抗4-1BB抗體、嵌合抗4-1BB抗體、抗4-1BB阿德奈汀(adnectin)、抗4-1BB域抗體、單鏈抗4-1BB片段、重鏈抗4-1BB片段、輕鏈抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白，及其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。已知促效性抗4-1BB抗體誘導強烈免疫反應。Lee等人，《公共科學圖書館·綜合(*PLOS One*)》**2013**, *8*, e69677。在一些實施例中，4-1BB促效劑為促效性抗4-1BB人源化或完全人類單株抗體(亦即，衍生自單一細胞株之抗體)。在一些實施例中，4-1BB促效劑為EU-101(Eutilex Co. Ltd.)、烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。在一些實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。

【0977】在一些實施例中，4-1BB促效劑或4-1BB結合分子亦可為融合蛋白。在一些實施例中，相較於通常具有兩個配體結合域之促效性單株抗體，多聚4-1BB促效劑，諸如三聚或六聚4-1BB促效劑(具有三個或六個配體結合域)可誘導優良受體(4-1BBL)聚類及內部細胞傳訊複合物形成。包含三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白之三聚(三價)或六聚(或

六價)或更大融合蛋白描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學》**2013,** *12*, 2735-47中。

【0978】已知促效性4-1BB抗體及融合蛋白誘導強烈免疫反應。在一些實施例中，4-1BB促效劑係以足以減少毒性之方式與4-1BB抗原特異性結合的單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)(例如NK細胞細胞毒性)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除Fc區功能性之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白。

【0979】在一些實施例中，4-1BB促效劑之特徵為以高親和力及促效活性與人類4-1BB(SEQ ID NO:40)結合。在一些實施例中，4-1BB促效劑為與人類4-1BB(SEQ ID NO:40)結合之結合分子。在一些實施例中，4-1BB促效劑為與鼠類4-1BB(SEQ ID NO:41)結合之結合分子。4-1BB促效劑或結合分子所結合之4-1BB抗原的胺基酸序列概述於表5中。

表 5. 4-1BB 抗原之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:40 人類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員 9 (智人)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:41 鼠類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員 9 (家鼷鼠)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【0980】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB。

【0981】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合的4-1BB促效劑。

【0982】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及

方法包括以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合的4-1BB促效劑。

【0983】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合。

【0984】在一些實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單

抗(亦稱為PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、變異體或生物類似物。烏圖木單抗可購自輝瑞公司(Pfizer, Inc.)。烏圖木單抗為免疫球蛋白G2-λ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏圖木單抗之胺基酸序列闡述於表6中。烏圖木單抗包含位於Asn59及Asn292之糖基化位點；位於位置22-96(V_H-V_L)、143-199(C_H1-CL)、256-316(C_H2)及362-420(C_H3)之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置22'-87'(V_H-V_L)及136'-195'(C_H1-CL)之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於IgG2A異型體位置218-218、219-219、222-222及225-225、位於IgG2A/B異型體位置218-130、219-219、222-222及225-225及位於IgG2B異型體位置219-130(2)、222-222及225-225之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；以及位於IgG2A異型體位置130-213'(2)、IgG2A/B異型體位置218-213'及130-213'及位於IgG2B異型體位置218-213'(2)之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏圖木單抗及其變異體及片段之製備及性質描述於美國專利第8,821,867、8,337,850及9,468,678號及國際專利申請公開案第WO 2012/032433 A1號中，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。烏圖木單抗之臨床前特徵描述於Fisher等人，《癌症免疫學及免疫治療(*Cancer Immunolog. & Immunother.*)》 **2012,** *61,* 1721-33中。目前烏圖木單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院(U.S. National Institutes of Health)

clinicaltrials.gov識別符NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066及NCT02554812。

【0985】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含SEQ ID NO:42所載之重鏈及SEQ ID NO:43所載之輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【0986】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含烏圖木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:44中所示序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:45中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及

SEQ ID NO:45中所示序列至少99%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少98%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少97%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少96%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少95%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含含有V_H及V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少99%一致。

【0987】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:48中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:51中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【0988】在一些實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏圖木單抗批准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含4-1BB抗體，該4-1BB抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其與該參考藥品或

參考生物產品相比包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。

表 6. 與烏圖木單抗相關之 4-1BB 促效劑抗體的胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:42 烏圖木單抗之重鏈	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
SEQ ID NO:43 烏圖木單抗之輕鏈	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
SEQ ID NO:44 烏圖木單抗之重鏈可變區	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:45 烏圖木單抗之輕鏈可變區	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO:46 烏圖木單抗之重鏈 CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:47 烏圖木單抗之重鏈 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:48 烏圖木單抗之重鏈 CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:49 烏圖木單抗之輕鏈 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:50 烏圖木單抗之輕鏈 CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:51 烏圖木單抗之輕鏈 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【0989】在一些實施例中，4-1BB促效劑為單株抗體烏瑞魯單抗(亦稱為BMS-663513及20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、變異體或生物類似物。烏瑞魯單抗可購自百時美施貴寶公司及Creative Biolabs, Inc.。烏瑞魯單抗為免疫球蛋白G4-κ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏瑞魯單抗之胺基酸序列闡述於表7中。烏瑞魯單抗包含位於位置298(及298'')之N-糖基化位點；位於位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-CL)、262-322(C_H2)及368-426(C_H3)(及位於位置22''-95''、148''-204''、262''-322''及368''-426'')之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置23'-88'(V_H-V_L)及136'-196'(C_H1-CL)(及位於位置23'''-88'''及136'''-196''')之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置227-227''及230-230''之鏈間重

鏈-重鏈雙硫鍵；及位於135-216'及135''-216'''之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏瑞魯單抗及其變異體及片段之製備及性質描述於美國專利第7,288,638及8,962,804號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。烏瑞魯單抗之臨床前及臨床特徵描述於Segal等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》**2016**, 請訪問http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272。目前烏瑞魯單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別符NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992及NCT01471210。

【0990】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含SEQ ID NO:52所載之重鏈及SEQ ID NO:53所載之輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與

SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【0991】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含烏瑞魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:54中所示序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:55中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少99%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少98%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少97%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少96%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少95%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含含有V_H及V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少99%一致。

【0992】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57及SEQ ID NO:58中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60及SEQ ID

NO:61中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【0993】在一些實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏瑞魯單抗核准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含4-1BB抗體，該4-1BB抗體包含與參考藥品或參考生物學產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。

表 7. 與烏瑞魯單抗相關之 4-1BB 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:52 烏瑞魯單抗之重鏈	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:53 烏瑞魯單抗之輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
SEQ ID NO:54 烏瑞魯單抗之可變重鏈	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
SEQ ID NO:55 烏瑞魯單抗之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
SEQ ID NO:56 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR1	GYYWS	5
SEQ ID NO:57 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:58 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
SEQ ID NO:59 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:60 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:61 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【0994】在一些實施例中，4-1BB促效劑係選自由以下組成之群組：1D8、3Elor、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(賽默飛世爾(Thermo Fisher)MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、藉由寄存為ATCC第HB-11248號之細胞株產生且美國專利第6,974,863號中揭示之抗體、5F4(BioLegend 31 1503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、美國專利申請公開案第US 2005/0095244號中揭示之抗體、美國專利第7,288,638號中揭示之抗體(諸如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、美國專利第6,887,673號中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利第7,214,493號中揭示之抗體、美國專利第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利第6,569,997號中揭示之抗體、美國專利第6,905,685號

中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利第6,362,325號中揭示之抗體(諸如1D8或BMS-469492；3H3或BMS-469497；或3E1)、美國專利第6,974,863號中揭示之抗體(諸如53A2)；美國專利第6,210,669號中揭示之抗體(諸如1D8、3B8或3E1)、美國專利第5,928,893號中描述之抗體、美國專利第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利第6,569,997號中揭示之抗體、國際專利申請公開案第WO 2012/177788、WO 2015/119923及WO 2010/042433號中揭示之抗體，及其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物，其中前述專利或專利申請公開案中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0995】在一些實施例中，4-1BB促效劑為以下中描述之4-1BB促效融合蛋白：國際專利申請公開案第WO 2008/025516 A1號、第WO 2009/007120 A1號、第WO 2010/003766 A1號、第WO 2010/010051 A1號及第WO 2010/078966 A1號；美國專利申請公開案第US 2011/0027218 A1號、第US 2015/0126709 A1號、第US 2011/0111494 A1號、第US 2015/0110734 A1號及第US 2015/0126710 A1號；及美國專利第9,359,420號、第9,340,599, 8,921,519號及第8,450,460號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0996】在一些實施例中，4-1BB促效劑為如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白)中所描繪之4-1BB促效融合蛋白，或其片段、衍生

物、結合物、變異體或生物類似物(參見圖18)。在結構I-A及I-B中，圓柱係指個體多肽結合域。結構I-A及I-B包含三個線性連接的TNFRSF結合域，該等TNFRSF結合域衍生自例如4-1BBL(4-1BB配體、CD137配體(CD137L)或腫瘤壞死因子超家族成員9(tumor necrosis factor superfamily member 9；TNFSF9)或結合4-1BB之抗體，該等TNFRSF結合域折迭以形成三價蛋白質，接著該三價蛋白質經由IgG1-Fc(包括C_H3及C_H2域)與第二三價蛋白質連接，隨後該IgG1-Fc用於經由二硫鍵(細長小橢圓)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而使結構穩定且提供能夠將六個受體之細胞內傳訊域放在一起且傳訊蛋白質以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包含例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包含親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。可使用任何scFv域設計，諸如以下中描述之彼等scFv域：de Marco, 《微生物細胞工廠(Microbial Cell Factories)》, **2011,** *10*, 44；Ahmad等人, 《臨床及發育免疫學(Clin. & Dev. Immunol.)》**2012,** 980250；Monnier等人, 《抗體(Antibodies)》, **2013,** *2*, 193-208；或本文中別處併入之參考文獻。此形式之融合蛋白結構描述於美國專利第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0997】圖18中給出之結構I-A之其他多肽域之胺基酸序列見於表8。Fc域較佳包含完整恆定域(SEQ ID NO:62

之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:62之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:62之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc-抗體之較佳的連接子可選自SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:72中所載之實施例，包括適合於融合其他多肽之連接子。

表8. 具有C端Fc-抗體片段融合蛋白設計(結構I-A)之TNFRSF促效劑融合蛋白(包括4-1BB促效劑融合蛋白)之胺基酸序列。

識別符	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:62 Fc域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
SEQ ID NO:63 連接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:64 連接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:65 連接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:66 連接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:67 連接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:68 連接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:69 連接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO:70 連接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO:71 連接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO:72 連接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【0998】圖18中給出之結構I-B之其他多肽域之胺基酸序列見於表9。若Fc抗體片段如在結構I-B中與TNRFSF融合蛋白之N端融合，則Fc模組之序列較佳地為SEQ ID NO:73中所示之彼序列，且連接子序列較佳地係選自SED ID NO:74至SEQ ID NO:76中所闡述之彼等實施例。

表 9. 具有 N 端 Fc-抗體片段融合蛋白設計 (結構 I-B)之 TNFRSF 促效劑融合蛋白 (包括 4-1BB 促效劑融合蛋白)之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:73 Fc 域	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID NO:74 連接子	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID NO:75 連接子	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID NO:76 連接子	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【0999】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個選自由以下組成之群組之4-1BB結合域：烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏瑞魯單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、選自表10中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述可變重鏈及可變輕鏈之任何組合，及其片段、衍生物、結合物、變異體及生物類似物。

【1000】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個包含4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個包含根據SEQ ID NO:77之序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個包含可溶性4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個包含根據SEQ ID NO:78之序列的4-1BB結合域。

【1001】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個4-1BB結合域，該4-1BB

結合域為包含各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包含各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白包含一或多個4-1BB結合域，該4-1BB結合域為包含各自與表10中給出之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表 10. 適用作融合蛋白中之 4-1BB 結合域或適用作 scFv 4-1BB 促效劑抗體之其他多肽域。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:77 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
SEQ ID NO:78 4-1BBL 可溶性域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
SEQ ID NO:79 4B4-1-1 型式 1 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
SEQ ID NO:80 4B4-1-1 型式 1 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:81 4B4-1-1 型式 2 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
SEQ ID NO:82 4B4-1-1 型式 2 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:83 H39E3-2 之可變重鏈	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
SEQ ID NO:84 H39E3-2 之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【1002】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性4-1BB結合域，(iv)第二肽

連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包含在N端及/或C端之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域。在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性4-1BB結合域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包含在N端及/或C端之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域，其中可溶性4-1BB域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某一距離，但不為4-1BB結合域之一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1003】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中各TNF超家族細胞介素域為4-1BB結合域。

【1004】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效scFv抗體，其包含與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1005】在一些實施例中，4-1BB促效劑為BPS Bioscience 4-1BB促效劑抗體，目錄號79097-2，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BPS Bioscience (BPS

Bioscience, San Diego, CA, USA)。在一些實施例中，4-1BB促效劑為Creative Biolabs 4-1BB促效劑抗體，目錄號MOM-18179，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs (Creative Biolabs, Shirley, NY, USA)。

3. OX40(CD134)促效劑

【1006】在一些實施例中，TNFRSF促效劑為OX40(CD134)促效劑。OX40促效劑可為本領域已知的任何OX40結合分子。OX40結合分子可以為能夠與人類或哺乳動物OX40結合之單株抗體或融合蛋白。OX40促效劑或OX40結合分子可包含免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。OX40促效劑或OX40結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所用，術語結合分子亦包括抗體(包括全長抗體)、單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人類抗體、人源化或嵌合抗體及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生之片段、任一上述者之抗原決定基-結合片段及與OX40結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一些實施例中，OX40促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為一種人源化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本揭示方法及組合物中之OX40促效劑包括抗OX40抗體、人類抗OX40抗體、小鼠

抗OX40抗體、哺乳動物抗OX40抗體、單株抗OX40抗體、多株抗OX40抗體、嵌合抗OX40抗體、抗OX40阿德奈汀(adnectin)、抗OX40域抗體、單鏈抗OX40片段、重鏈抗OX40片段、輕鏈抗OX40片段、抗OX40融合蛋白，及其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。在一些實施例中，OX40促效劑為促效性抗OX40人源化或完全人類單株抗體(亦即，源自單個細胞株的抗體)。

【1007】在一些實施例中，OX40促效劑或OX40結合分子亦可為融合蛋白。包含與OX40L融合之Fc域之OX40融合蛋白描述於例如Sadun等人，《免疫療法雜誌》**2009,** *182*, 1481-89。在一些實施例中，相較於通常具有兩個配體結合域之促效性單株抗體，多聚OX40促效劑，諸如三聚或六聚OX40促效劑(具有三個或六個配體結合域)可誘導優良受體(OX40L)聚類及內部細胞傳訊複合物形成。包含三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白之三聚(三價)或六聚(或六價)或更大融合蛋白描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學》**2013,** *12*, 2735-47中。

【1008】已知促效性OX40抗體及融合蛋白可誘導強烈免疫反應。Curti等人，《癌症研究》**2013,** *73*, 7189-98。在一些實施例中，OX40促效劑為以足夠減少毒性之方式與OX40抗原特異性結合之單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，例如NK細胞細胞毒性之促效性OX40單株抗體或

融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為消除Fc區功能之促效性OX40單株抗體或融合蛋白。

【1009】在一些實施例中，OX40促效劑之特徵為以高親及力及促效性活性與人類OX40(SEQ ID NO:85)結合。在一些實施例中，OX40促效劑為與人類OX40(SEQ ID NO:85)結合之結合分子。在一些實施例中，OX40促效劑為與鼠類OX40(SEQ ID NO:86)結合之結合分子。表11中概述與OX40促效劑或結合分子結合之OX40抗原之胺基酸序列。

表11. OX40抗原之胺基酸序列。

識別符	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:85 人類OX40(智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 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:86 鼠類OX40(家鼷鼠)	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

【1010】在一些實施例中，所描述組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約50 pM

或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40。

【1011】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1012】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合或以約3×10^{-5} 1/s或

更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1013】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合或以約1 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合。

【1014】在一些實施例中，OX40促效劑為塔沃西單抗，亦稱為MEDI0562或MEDI-0562。塔沃西單抗可獲自阿斯利康公司(AstraZeneca, Inc.)之醫學免疫子公司(MedImmune subsidiary)。塔沃西單抗為免疫球蛋白G1-κ抗[智人TNFRSF4(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員4，OX40，CD134)]人源化及嵌合單株抗體。塔沃西單抗之胺基酸序列闡述於表12中。塔沃西單抗包含在位置301及301''處之N-糖基化位點，具有岩藻糖基化複合物二觸角CHO型聚醣；在位置22-95(V_H-V_L)、148-204((C_H1-C_L)、265-325(C_H2)及371-429(C_H3)處(及在位置22''-95''、148''-204''、265''-325''及371''-429''處)之重鏈鏈內雙硫鍵；在位置23'-88'(V_H-V_L)及134'-194'(C_H1-C_L)處(及在位置23'''-88'''

及134'''-194'''處)之輕鏈鏈內雙硫鍵；在位置230-230''及233-233''處之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及在224-214'及224''-214'''處之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。塔沃西單抗在各種實體腫瘤適應症中之當前臨床試驗包括美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別符NCT02318394及NCT02705482。

【1015】在一些實施例中，OX40促效劑包含SEQ ID NO:87所載之重鏈及SEQ ID NO:88所載之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1016】在一些實施例中，OX40促效劑包含塔沃西單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:89中所示序

列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:90中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少99%一致的V_H及V_L區。

【1017】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95及SEQ ID NO:96中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1018】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考塔沃西單抗核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40

抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。

表 12. 與塔沃西單抗相關之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:87 塔沃西單抗之重鏈	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:88 塔沃西單抗之輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:89 塔沃西單抗之重鏈可變區	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
SEQ ID NO:90 塔沃西單抗之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:91 塔沃西單抗之重鏈 CDR1	GSFSSGYWN	9
SEQ ID NO:92 塔沃西單抗之重鏈 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID NO:93 塔沃西單抗之重鏈 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID NO:94 塔沃西單抗之輕鏈 CDR1	QDISNYLN	8
SEQ ID NO:95 塔沃西單抗之輕鏈 CDR2	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID NO:96 塔沃西單抗之輕鏈 CDR3	QQGSALPW	8

【1019】在一些實施例中，OX40促效劑為11D4，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。11D4之製備及特性描述於美國專利第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。11D4之胺基酸序列闡述於表13中。

【1020】在一些實施例中，OX40促效劑包含SEQ ID NO:97所載之重鏈及SEQ ID NO:98所載之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在

一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1021】在一些實施例中，OX40促效劑包含11D4之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:99中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:100中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1022】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102及SEQ ID NO:103中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105及SEQ ID NO:106中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1023】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考11D4核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，生

物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。

表13. 與11D4相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別符	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:97 11D4之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
SEQ ID NO:98 11D4之輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:99 11D4之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:100 11D4之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:101 11D4之重鏈CDR1	SYSMN	5
SEQ ID NO:102 11D4之重鏈CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO:103 11D4之重鏈CDR3	ESGWYLFDY	9
SEQ ID NO:104 11D4之輕鏈CDR1	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO:105 11D4之輕鏈CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO:106 11D4之輕鏈CDR3	QQYNSYPPT	9

【1024】在一些實施例中，OX40促效劑為18D8，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。18D8之製備及特性描述於美國專利第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。18D8之胺基酸序列闡述於表14中。

【1025】在一些實施例中，OX40促效劑包含SEQ ID NO:107所載之重鏈及SEQ ID NO:108所載之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:107及

SEQ ID NO:108中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1026】在一些實施例中，OX40促效劑包含18D8之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:109中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:110中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些

實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1027】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112及SEQ ID NO:113中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115及SEQ ID NO:116中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1028】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考18D8核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。OX40促

效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。

表 14. 與 18D8 相關之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:107 18D8 之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:108 18D8 之輕鏈	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:109 18D8 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO:110 18D8 之輕鏈可變區	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
SEQ ID NO:111 18D8 之重鏈 CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:112 18D8 之重鏈 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:113 18D8 之重鏈 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:114 18D8 之輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:115 18D8 之輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:116 18D8 之輕鏈 CDR3	QQRSNWPT	8

【1029】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu119-122，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司(GlaxoSmithKline plc)之人源化抗體。Hu119-122之製備及特性描述於美國專利第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第

WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu119-122之胺基酸序列闡述於表15中。

【1030】在一些實施例中，OX40促效劑包含Hu119-122之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:117中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:118中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1031】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120及SEQ ID NO:121中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123及SEQ ID NO:124中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1032】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu119-122核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。

表 15. 與 Hu119-122 相關之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:117 Hu119-122 之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:118 Hu119-122 之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:119 Hu119-122 之重鏈 CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO:120 Hu119-122 之重鏈 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID NO:121 Hu119-122 之重鏈 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID NO:122 Hu119-122 之輕鏈 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO:123 Hu119-122 之輕鏈 CDR2	LASNLES	7
SEQ ID NO:124 Hu119-122 之輕鏈 CDR3	QHSRELPLT	9

【1033】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu106-222，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司之人源化抗體。Hu106-222之製備及特性描述於美國專利第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu106-222之胺基酸序列闡述於表16中。

【1034】在一些實施例中，OX40促效劑包含Hu106-222之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:125中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:126中所示序列，及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ

ID NO:126中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1035】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128及SEQ ID NO:129中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:131及SEQ ID NO:132中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1036】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu106-222核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為

獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。

表16. 與Hu106-222相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別符	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:125 Hu106-222之重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:126 Hu106-222之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:127 Hu106-222之重鏈CDR1	DYSMH	5
SEQ ID NO:128 Hu106-222之重鏈CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID NO:129 Hu106-222之重鏈CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO:130 Hu106-222之輕鏈CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:131 Hu106-222之輕鏈CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO:132 Hu106-222之輕鏈CDR3	QQHYSTPRT	9

【1037】在一些實施例中，OX40促效劑抗體為MEDI6469(亦稱為9B12)。MEDI6469為鼠類單株抗體。

Weinberg等人,《免疫療法雜誌》**2006**, *29*, 575-585。在一些實施例中，OX40促效劑為由9B12雜交瘤產生，由Biovest Inc.(美國馬薩諸塞州馬爾文(Malvern, MA, USA))寄存的抗體，如Weinberg等人,《免疫療法雜誌》**2006**, *29*, 575-585中所描述，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體包含MEDI6469之CDR序列。在一些實施例中，抗體包含MEDI6469之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。

【1038】在一些實施例中，OX40促效劑為L106 BD(Pharmingen，產品號340420)。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一些實施例中，OX40促效劑為ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一些實施例中，OX40促效劑為鼠類單株抗體抗mCD134/mOX40(純系OX86)，可購自新罕布什爾州西黎巴嫩之BioXcell Inc之InVivoMAb。

【1039】在一些實施例中，OX40促效劑係選自以下中描述之OX40促效劑：國際專利申請公開案第WO

95/12673號、第WO 95/21925號、第WO 2006/121810號、第WO 2012/027328號、第WO 2013/028231號、第WO 2013/038191號及第WO 2014/148895號；歐洲專利申請案EP 0672141；美國專利申請公開案第US 2010/136030號、第US 2014/377284號、第US 2015/190506號及第US 2015/132288號(包括純系20E5及12H3)；及美國專利第7,504,101號、第7,550,140號、第7,622,444號、第7,696,175號、第7,960,515號、第7,961,515號、第8,133,983號、第9,006,399號及第9,163,085號，其中之每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

【1040】在一些實施例中，OX40促效劑為如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白)中所描繪之OX40促效性融合蛋白，或其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。結構I-A及I-B之特性已在上文及美國專利第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。圖18中給出之結構I-A之多肽域之胺基酸序列見於表9。Fc域較佳包含完整恆定域(SEQ ID NO:62之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:62之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:62之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc-抗體之較佳的連接子可選自SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:72中所載之實施例，包括適合於融合其他多肽之連接子。同樣，圖18中給出了結構I-B之多肽域之胺基酸序列見於表10。若Fc抗體片段如在結構I-B

中與TNRFSF融合蛋白之N端融合，則Fc模組之序列較佳地為SEQ ID NO:73中所示之彼序列，且連接子序列較佳地係選自SED ID NO:74至SEQ ID NO:76中所闡述之彼等實施例。

【1041】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個選自由以下組成之群組之OX40結合域：塔沃西單抗的可變重鏈及可變輕鏈、11D4的可變重鏈及可變輕鏈、18D8的可變重鏈及可變輕鏈、Hu119-122的可變重鏈及可變輕鏈、Hu106-222的可變重鏈及可變輕鏈、選自表17中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述之可變重鏈及可變輕鏈的任何組合，及其片段、衍生物、結合物、變異體及生物類似物。

【1042】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個包含OX40L序列之OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個包含根據SEQ ID NO:133之序列的OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個包含可溶性OX40L序列之OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個包含根據SEQ ID NO:134之序列的OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個包含根據SEQ ID NO:135之序列的OX40結合域。

【1043】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40

促效劑融合蛋白包含一或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白包含一或多個OX40結合域，該OX40結合域為scFv域，該scFv域包含各自與表17中給出之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及

V_L域由連接子連接。

表 17. 適用作融合蛋白(例如結構 I-A 及 I-B)中之 OX40 結合域或適用作 scFv OX40 促效劑抗體之另外多肽域。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:133 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:134 OX40L 可溶性域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
SEQ ID NO:135 OX40L 可溶性域 (替代)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
SEQ ID NO:136 008 之可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO:137 008 之可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:138 011 之可變重鏈	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
SEQ ID NO:139 011 之可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:140 021 之可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO:141 021 之可變輕鏈	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:142 023 之可變重鏈	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:143 023 之可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:144 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
SEQ ID NO:145 輕鏈可變區	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:146 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
SEQ ID NO:147 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:148 人類化抗體之 重鏈可變區	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:149 人類化抗體之 重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:150 人 類化抗體之輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:151 人 類化抗體之輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:152 人 類化抗體之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
SEQ ID NO:153 人 類化抗體之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:154 人 類化抗體之輕鏈可變區	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
SEQ ID NO:155 人 類化抗體之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:156 重鏈可變區	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
SEQ ID NO:157 輕鏈可變區	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【1044】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包含：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包含在N端及/或C端處之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域。在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包含：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包含在N端及/或C端處之另外域，其中該另外域為Fab或Fc片段域，其中可溶性OX40結合域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜之某一距離，但不為OX40結合域之一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1045】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包含：(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中TNF超家族細胞介素域為OX40結合域。

【1046】在一些實施例中，OX40促效劑為MEDI6383。MEDI6383為OX40促效性融合蛋白且可如美國專利第

6,312,700號中所描述來製備，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1047】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性scFv抗體，其包含與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1048】在一些實施例中，OX40促效劑為Creative Biolabs OX40促效劑單株抗體MOM-18455，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs，Inc.。

【1049】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性抗體純系Ber-ACT35，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BioLegend, Inc.。

B. 視情況選用之細胞存活率分析

【1050】視情況，在初始第一擴增(有時稱為初始主體擴增(initial bulk expansion))之後，可使用本領域已知之標準分析進行細胞存活率分析。因此，在某些實施例中，方法包含在初始第一擴增之後進行細胞存活率分析。舉例而言，可在主體TIL樣本上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活性評定。其他用於測試存活性之分析可包括但不限於阿爾瑪藍(Alamar blue)分析及MTT分析。

1. 細胞計數、存活性、流動式細胞測量術

【1051】在一些實施例中，量測細胞計數及/或存活

性。標誌(諸如但不限於CD3、CD4、CD8及CD56以及本文所揭示或描述之任何其他標誌)之表現可藉由流動式細胞量測術，使用FACSCantoTM流動式細胞儀(碧迪生物科學(BD Biosciences))，用抗體，例如但不限於可購自碧迪生物科學之彼等者(碧迪生物科學，加利福尼亞州聖荷西)量測。細胞可使用拋棄式c-晶片血球計(VWR，伊利諾伊州巴達維亞)手動計算，且存活性可使用本領域中已知之任何方法，包括但不限於台盼藍染色評定。亦可基於以全文引用的方式併入本文中之美國專利申請公開案第2018/0282694號分析細胞存活率。細胞存活率亦可基於美國專利公開案第2018/0280436號或國際專利公開案第WO/2018/081473號分析，兩者全文均出於所有目的併入本文中。

【1052】在一些情況下，主體TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。替代地，主體TIL群體可進行REP且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在其中遺傳修飾的TIL將用於療法中之情況下，主體或REP TIL群體可進行遺傳修飾以用於合適治療。

2. 細胞培養

【1053】在一些實施例中，用於擴增TIL之方法(包括上文所論述以及圖1及圖8，特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G中例示之彼等方法)可包括使用約5,000 mL至約25,000 mL之細胞培養基、約5,000 mL至約10,000 mL之細胞培養基或約5,800

mL至約8,700 mL之細胞培養基。在一些實施例中，培養基為不含血清培養基。在一些實施例中，初始第一擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，第二擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，初始第一擴增及第二擴增(亦稱為快速第二擴增)中之培養基均不含血清。在一些實施例中，擴增TIL數目使用不超過一種類型之細胞培養基。可使用任何合適的細胞培養基，例如AIM-V細胞培養基(L-麩醯胺酸、50 μM鏈黴素硫酸鹽及10 μM建它黴素硫酸鹽)細胞培養基(英傑公司(Invitrogen)，加利福尼亞州喀斯巴德(Carlsbad CA))。就此而言，本發明方法有利地減少擴增TIL數目所需之培養基的量及培養基類型的數目。在一些實施例中，擴增TIL數目可包含頻繁性不超過每三或四天一次地餵養細胞。在透氣容器中擴增細胞數目藉由減少擴增細胞所需之餵養頻率，簡化擴增細胞數目所需之程序。

【1054】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME)。

【1055】在一些實施例中，方法期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至8天之時段，例如約7天作為初始第一擴增，約8天作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包括

IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增數目TIL持續約7至9天(例如約7天、約8天或約9天)之時段，該第二透氣容器含有包括IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1056】在一些實施例中，方法期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至7天(例如約7天)之時段作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包括IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至14天或約7至9天(例如約7天、約8天、約9天、約10天或約11天)之時段，該第二透氣容器含有包括IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1057】在一些實施例中，方法期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣本持續約1至7天(例如約7天)之時段作為初始第一擴增，該第一透氣容器含有包括IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL數目持續約7至11天(例如約7天、約8天、約9天、約10天或約11天)之時段，該第二透氣容器含有包括IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1058】在一些實施例中，TIL係在透氣容器中擴

增。已使用透氣容器來擴增TIL，使用PBMC，使用本領域中已知之方法、組合物及裝置，包括美國專利申請案公開案第2005/0106717 A1號中描述之彼等，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，TIL係在透氣袋中擴增。在一些實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如Xuri細胞擴增系統W25(GE Healthcare))擴增。在一些實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5(GE Healthcare))擴增。在一些實施例中，細胞擴增系統包括透氣細胞袋，該透氣細胞袋之容積選自由以下組成之群組：約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L及約10 L。

【1059】在一些實施例中，TIL可在G-REX培養瓶(可購自威爾遜狼製造公司)中擴增。此類實施例允許細胞群體自約5×10^5個細胞/cm^2擴增至介於10×10^6與30×10^6個細胞/cm^2之間。在一些實施例中，此係未進行餵養。在一些實施例中，此係未進行餵養，只要G-REX培養瓶中之培養基位於約10 cm之高度。在一些實施例中，此係未進行餵養但添加一或多種細胞介素。在一些實施例中，細胞介素可作為推注添加，不需要將細胞介素與培養基混合。此類容器、裝置及方法為本領域中已知的且已用於擴增TIL，且包括以下中描述之彼等者：美國專利申請公開案第US

2014/0377739A1號、國際公開案第WO 2014/210036 A1號、美國專利申請公開案第us 2013/0115617 A1號、國際公開案第WO 2013/188427 A1號、美國專利申請公開案第US 2011/0136228 A1號、美國專利第US 8,809,050 B2號、國際公開案第WO 2011/072088 A2號、美國專利申請公開案第US 2016/0208216 A1號、美國專利申請公開案第US 2012/0244133 A1號、國際公開案第WO 2012/129201 A1號、美國專利申請公開案第US 2013/0102075 A1號、美國專利第US 8,956,860 B2號、國際公開案第WO 2013/173835 A1號、美國專利申請公開案第US 2015/0175966 A1號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。此類過程亦描述於Jin等人，《免疫療法雜誌》，**2012**, 35:283-292中。

C. TIL中基因的視情況選用之基因減弱或基因剔除

【1060】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL在擴增步驟之前、期間或之後，包括在密閉無菌製造過程期間(各者如本文所提供)經進一步操作，以用暫時性方式改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時性改變的蛋白質表現係因為暫時性基因編輯。在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL用轉錄因子(transcription factor；TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現的分子處理。在一些實施例中，TF及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現之分子提供TIL群體中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞之數目。

【1061】在某些實施例中，方法包含基因編輯TIL群體。在某些實施例中，方法包含基因編輯第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1062】在一些實施例中，本發明包括經由核苷酸插入，諸如經由核糖核酸(RNA)插入，包括插入信使RNA(mRNA)或小(或短)干擾RNA(siRNA)至TIL群體中進行基因編輯，以促進一或多種蛋白質之表現或抑制一或多種蛋白質之表現以及同時促進一組蛋白質與抑制另一組蛋白質之組合。

【1063】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL經歷暫時性改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增之前的主體TIL群體，包括例如獲自例如如圖8(尤其圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所指示之步驟A的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增期間，包括例如獲自例如如圖8(例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所指示之步驟B的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第一擴增之後，包括例如在第一與第二擴增之間轉變的TIL群體(例如如本文所描述之第二TIL群體)、獲自例如如圖8中所指示之步驟B且包括於步驟C中的TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增之前的主體TIL群體中，包括例如在獲自例如如圖8中所指示之步驟C且在步驟D中其擴增之前的

TIL群體中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增期間，包括例如在例如如圖8中所指示之步驟D中擴增之TIL群體(例如第三TIL群體)中。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現發生在第二擴增之後，包括例如在獲自例如如圖8中所指示之步驟D中之擴增的TIL群體中。

【1064】在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括電穿孔之步驟。電穿孔方法為本領域中已知的，且描述於例如以下中：Tsong,《生物物理學雜誌》1991, *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面包覆及胞吞作用)為本領域中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb,《病毒學(*Virology*)》1973, *52*, 456-467；Wigler等人,《美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci.*)》1979, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea,《分子細胞生物學(*Mol. Cell. Biol.*)》1987, *7*, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*,*n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:

1(w/w)脂質體調配物之方法為本領域中已知的且描述於以下中：Rose等人，《生物技術(*Biotechniques*)》 1991, *10*, 520-525及Felgner等人，《美國國家科學院院刊》，1987, *84*, 7413-7417以及美國專利第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時性改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括使用以下中描述之方法之轉染步驟：美國專利第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994號及第7,189,705號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1065】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致幹記憶T細胞(Stem Memory T cell；TSCM)增加。TSCM為抗原經歷中樞記憶T細胞之早期前驅細胞。TSCM一般呈現定義幹細胞之長期存活、自我更新及多效能能力，且一般為產生有效TIL產物所需的。在授受細胞轉移之小鼠模型中，TSCM與其他T細胞亞群相比已展示增強的抗腫瘤活性。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有包含高比例之TSCM之組成的TIL群體。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TSCM百分比增加至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些實施例中，暫時性改

變蛋白質表現導致TIL群體中之TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些實施例中，蛋白質表現之暫時性導致具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之TIL群體。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致具有至少至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之治療性TIL群體。

【1066】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致抗原經歷T細胞回春(rejuvenation)。在一些實施例中，回春包括例如增加增殖、增加T細胞活化及/或增加抗原識別。

【1067】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現改變一大部分T細胞之表現，以保留腫瘤衍生之TCR貯庫。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現不改變腫瘤衍生之TCR貯庫。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現維持腫瘤衍生之TCR貯庫。

【1068】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質導致改變特定基因之表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向包括但不限於以下之基因：PD-1(亦稱為PDCD1

或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(chimeric co-stimulatory receptor；CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、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、胸腺細胞選擇相關高遷移率群組(high mobility group；HMG)匣(TOX)、錨蛋白重複域11(ANKRD11)、BCL6共抑制子(BCOR)及/或cAMP蛋白激酶A(protein kinase A；PKA)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CTLA-4、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、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、胸腺細胞選擇相關高遷移率群組(HMG)匣(TOX)、錨蛋白重複域11(ANKRD11)、BCL6共抑制子(BCOR)及/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向PD-1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFBR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向

CCR4/5。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CTLA-4。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CBLB。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CISH。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR(嵌合共刺激受體)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-12。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-15。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-18。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向IL-21。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIM3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向LAG3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TIGIT。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TET2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向TGFβ。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR4。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCR5。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCR2。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CSCR3。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL2(MCP-1)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現

靶向CCL3(MIP-1α)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL4(MIP1-β)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL5(RANTES)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CXCL8。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL22。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CCL17。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向VHL。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向CD44。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向PIK3CD。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向SOCS1。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向胸腺細胞選擇相關之高遷移率群組(HMG)匣(TOX)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向錨蛋白重複域11(ANKRD11)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向BCL6輔抑制物(BCOR)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現靶向cAMP蛋白激酶A(PKA)。

【1069】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現。在一些實施例中，因暫時性蛋白質表現而過度表現之趨化激素受體包括具有配體之受體，該配體包括但不限於CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22及/或CCL17。

【1070】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1、CTLA-4、CBLB、CISH、TIM-3、LAG-3、

TIGIT、TET2、TGFβR2及/或TGFβ之表現降低及/或減少(包括導致例如TGFβ路徑阻斷)。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB(CBL-B)之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM-3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG-3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TGFβR2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TGFβ之表現降低及/或減少。

【1071】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致趨化激素受體增加及/或過度表現，以例如改善TIL運輸或運動至腫瘤部位。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致嵌合共刺激受體(CCR)增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之趨化激素受體增加及/或過度表現：CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2及/或CSCR3。

【1072】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致介白素增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之介白素增加

及/或過度表現：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及/或IL-21。

【1073】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致NOTCH 1/2 ICD增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致VHL增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CD44增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PIK3CD增加及/或過度表現。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致SOCS1增加及/或過度表現。

【1074】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致cAMP蛋白激酶A(PKA)之表現降低及/或減少。

【1075】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由以下組成之群組之兩種分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及選自由以下組成之群組之一種分子之表現降低及/或減少：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致以下之表現降低及/或減少：PD-1、CTLA-4、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT及其組合。在一些

實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及以下中之一者之表現降低及/或減少：CTLA-4、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT、TET2及其組合。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CTLA-4之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致PD-1及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CTLA-4及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CTLA-4及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CTLA-4及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CTLA-4及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CTLA-4及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CTLA-4及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改

變蛋白質表現導致LAG3及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致LAG3及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CISH及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致CBLB及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及PD-1之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致TIM3

及TET2之表現降低及/或減少。

【1076】在一些實施例中，選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合組成之群組之黏著分子藉由γ逆轉錄病毒或慢病毒方法插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集TIL群體中(例如黏著分子之表現增加)。

【1077】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合組成之群組之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現導致選自由PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、CISH、CBLB、TIGIT、TET2及其組合組成之群組之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。

【1078】在一些實施例中，表現減少約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一

些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1079】在一些實施例中，表現增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%。在一些實施例中，表現增加至少約85%。在一些實施例中，表現增加至少約90%。在一些實施例中，表現增加至少約95%。在一些實施例中，表現增加至少約99%。

【1080】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現藉由用轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變TIL中之蛋白質表現之分子處理TIL來誘導。在一些實施例中，採用無SQZ載體之微流體平台進行轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時性改變蛋白質表現之分子的細胞內遞送。此類方法證明了將包括轉錄因子在內的蛋白質遞送至包括T細胞在內的

多種初代人類細胞的能力，已描述於美國專利申請公開案第US 2019/0093073 A1號、第US 2018/0201889 A1號及第US 2019/0017072 A1號中，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。此類方法可用於本發明中，以將TIL群體暴露於轉錄因子(TF)及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子，其中該等TF及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子提供TIL群體中之腫瘤抗原之表現增加及/或腫瘤抗原特異性T細胞之數目增加，從而導致TIL群體重新程式化及重新程式化TIL群體之治療功效相較於非重新程式化TIL群體增加。在一些實施例中，重新程式化導致相對於開始或先前TIL群體(亦即，在重新程式化之前)，效應T細胞及/或中樞記憶T細胞亞群增加，如本文所描述。

【1081】在一些實施例中，轉錄因子(TF)包括但不限於TCF-1、NOTCH 1/2 ICD及/或MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為TCF-1。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與誘導性富潛能幹細胞培養物(iPSC)，諸如市售KNOCKOUT血清替代品(Gibco/賽默飛世爾)一起投與，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與iPSC混合物一起投與，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)不與iPSC混合物一起投與。在一些實施例中，重新程式化導致TSCM之百分比增加。在一些實施例中，重

新程式化導致TSCM之百分比增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%之TSCM。

【1082】在一些實施例中，如上文所描述之暫時性改變蛋白質表現之方法可與遺傳修飾TIL群體之方法組合，包括穩定併入基因以產生一或多種蛋白質之步驟。在某些實施例中，方法包含遺傳修飾TIL群體之步驟。在某些實施例中，方法包含遺傳修飾第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括逆轉錄病毒轉導之步驟。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如以下中：Levine等人，《美國國家科學院院刊》 2006, *103*, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學》 1997, *15*, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌》 1998, *72*, 8463-71及美國專利第6,627,442號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括γ-逆轉錄病毒轉導之步驟。γ-逆轉錄病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如Cepko及Pear, 《分子生物學中之當前方案(*Cur. Prot. Mol. Biol.*)》 1996, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為本領域中已知的，且包括其中轉

位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包含帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包括類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等人,《分子療法(*Mol. Therapy*)》2010, *18*, 674-83及美國專利第6,489,458號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1083】在一些實施例中，暫時性改變TIL中之蛋白質表現係由小干擾RNA(small interfering RNA；siRNA)誘導，該小干擾RNA有時稱為短干擾RNA或靜默RNA，其為雙股RNA分子，長度一般為19-25個鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNA interference；RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。

【1084】在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現為表現減少。在一些實施例中，暫時性改變蛋白質表現係由自我遞送RNA干擾(self-delivering RNA interference；sdRNA)誘導，該自我遞送RNA干擾為具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包含20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。小干擾RNA(siRNA)，有時稱為短干擾RNA或靜默RNA，為雙股RNA分子，長度一般為19-25個

鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。sdRNA為進入細胞不需要遞送媒介之共價及疏水性修飾之RNAi化合物。sdRNA一般為具有極小雙股區之不對稱化學修飾核酸分子。sdRNA分子通常含有單股區及雙股區，且可在分子之單股及雙股區內含有各種化學修飾。另外，如本文所描述，sdRNA分子可與疏水性結合物，諸如習知及高級固醇型分子連接。sdRNA及製備此類sdRNA之相關方法亦已廣泛描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2016/0304873 A1號、第US 2019/0211337 A1號、第US 2009/0131360 A1號及第US 2019/0048341 A1號，及美國專利第10,633,654號及第10,913,948B2號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。為了最佳化sdRNA結構、化學性質、靶向位置、序列偏好及其類似者，已開發一種演算法且將其用於sdRNA效能預測。基於此等分析，功能性sdRNA序列一般定義為在1 μM濃度下表現減少超過70%，其中概率超過40%。

【1085】雙股RNA(dsRNA)可通常用以定義包含一對互補RNA股，一般有義(乘客)及反義(引導)股之任何分子，且可包括單股懸垂組區。與siRNA不同，術語dsRNA一般係指包括siRNA分子之序列之前驅物分子，該siRNA分子藉由裂解酶系統(包括Dicer)之作用自較大dsRNA分子釋放。

【1086】在一些實施例中，方法包含暫時性改變TIL

群體(包括經修飾以表現CCR之TIL)中蛋白質表現，包含使用自我遞送RNA干擾(sdRNA)，其為例如具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包含20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。使用siRNA及sdRNA之方法已描述於以下中：Khvorova及Watts，《自然生物技術學(*Nat. Biotechnol.*)》 2017, *35*, 238-248；Byrne等人，《眼藥理學與治療學雜誌(*J. Ocul. Pharmacol. Ther.*)》 2013, *29*, 855-864；及Ligtenberg等人，《分子療法》 2018, *26*, 1482-93，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，siRNA之遞送係使用電穿孔或細胞膜破壞(諸如擠壓或SQZ法)來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體不需要使用電穿孔、SQZ或其他方法來完成，實際上使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為1 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA。在某些實施例中，方法包含遞送siRNA或sdRNA至TIL群體，其包含將TIL群體暴露於濃度為1 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA持續1至3天之間的時段。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為10 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為50 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL

群體暴露於濃度為介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL於培養基中之間的sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL於培養基中之間的sdRNA來完成，其中暴露於sdRNA藉由添加新鮮sdRNA至培養基來進行兩次、三次、四次或五次。其他合適過程描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0039914 A1號、第US 2013/0131141 A1號及第US 2013/0131142 A1號，及美國專利第9,080,171號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1087】在一些實施例中，在製造期間將siRNA或sdRNA插入TIL群體中。在一些實施例中，sdRNA編碼干擾以下之RNA：NOTCH 1/2 ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP蛋白激酶A(PKA)、BAFF BR3、CISH及/或CBLB。在一些實施例中，表現減少係基於例如如藉由流動式細胞測量術及/或qPCR評定之基因靜默之百分比而判定。在一些實施例中，表現減少約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約

85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1088】基於化學修飾siRNA之自我可遞送RNAi技術可用於本發明之方法中，以成功遞送sdRNAs至如本文所描述之TIL。主鏈修飾與不對稱siRNA結構及疏水配體的組合(參見例如，Ligtenberg等人，《分子療法》2018, *26*, 1482-93及美國專利申請公開案第2016/0304873 A1號，其揭示內容以引用的方式併入本文中)允許sdRNA藉由簡單地添加至培養基中，利用核酸酶穩定性或sdRNA而無需額外的調配物及方法即可滲透經培養的哺乳動物細胞。此穩定性允許僅藉由維持sdRNA於培養基中之有效濃度，支持恆定含量之RNAi介導之目標基因活性減少。儘管不受理論束縛，但sdRNA之主鏈穩定化提供延長減少基因表現效應，其在非分裂細胞中可持續數月。

【1089】在一些實施例中，超過95%之TIL轉染效率及目標之表現減少藉由各種特定siRNA或sdRNA發生。在一些實施例中，含有若干未經修飾之核糖殘基之siRNA或sdRNA經完全修飾的序列置換，以增加RNAi效應之效能及/或壽命。在一些實施例中，表現減少效應維持12小時、24小時、36小時、48小時、5天、6天、7天或8天或更久。

在一些實施例中，表現減少效應在siRNA或sdRNA處理TIL 10天或更久後降低。在一些實施例中，目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，TIL中之目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，PD-1/PD-L1路徑中之表現減少允許TIL展現更強效的活體內效應，此在一些實施例中係因為避免PD-1/PD-L1路徑之抑制效應。在一些實施例中，因siRNA或sdRNA之PD-1之表現減少導致增加TIL增殖。

【1090】在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現70%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現75%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現80%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現85%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現90%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現95%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現99%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.25 μM至約4 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序

列當以約0.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約4.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。

【1091】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸劑包含一或多種修飾以增加治療劑之穩定性及/或有效性及實現寡核苷酸至待治療之細胞或組織之有效遞送。此類修飾可包括2'-O-甲基修飾、2'-O-氟修飾、二硫代磷酸酯修飾、2' F修飾的核苷酸、2'-O-甲基修飾的及/或2'去氧核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸經修飾以包括一或多個疏水性修飾，包括例如固醇、膽固醇、維生素D、萘基、異丁基、苯甲基、吲哚、色胺酸及/或苯基。在一些實施例中，化學修飾的核苷酸為硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'去氧、疏水性修飾及硫代磷酸酯之組合。在一些實施例中，糖可經修飾且經修飾的糖可包括但不限於D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O-甲基及2'-0-乙基)，亦即2'-烷氧基、2'-胺基、2'-S-烷基、2'-鹵基(包括2'-氟)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基(-$OCH_2CH=CH_2$)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基及氰基及其類似者。在一些實施例中，糖部分可為己醣且併入寡核苷酸中，如Augustyns等人，《核酸研究(*Nucl. Acids. Res.*)》 1992, *18*, 4711，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1092】在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在其整個長度上為雙股，亦即在分子之任一端處無懸垂單股序列，亦即為鈍端。在一些實施例中，個別核酸分子可具有不同長度。換言之，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在其整個長度上不為雙股。舉例而言，當使用兩個分開的核酸分子時，分子中之一者，例

如包含反義序列之第一分子可比與其雜交之第二分子更長(留下一部分之分子為單股)。在一些實施例中，當使用單核酸分子時，在任一端處之一部分之分子可保持單股。

【1093】在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸含有錯配及/或環或凸起，但在至少約70%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在至少約80%之寡核苷酸長度上為雙股的。在其他實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在至少約90%-95%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在至少約96%-98%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸含有至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個錯配。

【1094】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸可例如藉由修飾3'或5'鍵聯而基本上保護其免受核酸酶的影響，如美國專利第5,849,902號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。舉例而言，寡核苷酸可藉由納入「阻斷基團」而具有抗性。如本文所用之術語「阻斷基團」係指可作為用於合成之保護基或偶合基團與寡核苷酸或核單體連接之取代基(例如除OH基團以外)(例如FITC、丙基(CH_2-CH_2-CH_3)、二醇(-0-CH_2-CH_2-O-)磷酸鹽($PO_3^{2"}$)、膦酸氫鹽或胺基亞磷酸酯)。「阻斷基團」亦可包括「末端阻斷基團」或「核酸外切酶阻斷基團」，其保護寡核苷酸之5'及3'端，其包括經修飾的核苷酸及非核苷

酸核酸外切酶抗性結構。

【1095】在一些實施例中，siRNA或sdRNA內之至少一部分連續多核苷酸藉由取代基鍵聯，例如硫代磷酸酯鍵聯連接。

【1096】在一些實施例中，化學修飾可導致至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500%的細胞攝取siRNA或sdRNA增強。在一些實施例中，C或U殘基中之至少一者包括疏水性修飾。在一些實施例中，複數個C及U含有疏水性修飾。在一些實施例中，至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%之C及U可含有疏水性修飾。在一些實施例中，所有C及U均含有疏水性修飾。

【1097】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子經由併入可質子化胺展現增強的胞內體釋放。在一些實施例中，將可質子化胺併入有義股中(在RISC裝載後被捨棄的分子部分中)。在一些實施例中，本發明之siRNA或sdRNA化合物包含不對稱化合物，該不對稱化合物包含雙螺旋區(有效RISC進入所需，10-15個鹼基長)及4-12個核苷酸長之單股區；具有13個核苷酸的雙螺旋。在一些實施例中，採

用6個核苷酸的單股區。在一些實施例中，siRNA或sdRNA之單股區包含2-12個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯(稱為硫代磷酸酯修飾)。在一些實施例中，採用6-8個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。在一些實施例中，本發明之siRNA或sdRNA化合物亦包括獨特的化學修飾模式，其提供穩定性且與RISC進入相容。舉例而言，引導股亦可藉由任何證實穩定性而不干擾RISC進入之化學修飾來修飾。在一些實施例中，引導股中之化學修飾模式包括大部分為2' F修飾且5'端經磷酸化之C及U核苷酸。

【1098】在一些實施例中，siRNA或sdRNA中至少30%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，siRNA或sdRNA中至少30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，siRNA或sdRNA中100%之核苷酸為經修飾的。

【1099】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子具有極少雙股區。在一些實施例中，分子之雙股區介於8-15個核苷酸長範圍內。在一些實施例中，分子之雙股區為8、

9、10、11、12、13、14或15個核苷酸長。在一些實施例中，雙股區為13個核苷酸長。引導股與乘客股之間可有100%互補性，或引導股與乘客股之間可存在一或多個錯配。在一些實施例中，在雙股分子之一端上，分子為鈍端或具有一個核苷酸之懸垂組。分子之單股區在一些實施例中係介於4-12個核苷酸長。在一些實施例中，單股區可為4、5、6、7、8、9、10、11或12個核苷酸長。在一些實施例中，單股區亦可小於4個核苷酸或大於12個核苷酸長。在某些實施例中，單股區為6或7個核苷酸長。

【1100】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子具有增加的穩定性。在一些情況下，化學修飾的siRNA或sdRNA分子在培養基中之半衰期長於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超過24小時，包括任何中間值。在一些實施例中，siRNA或sd-RNA在培養基中之半衰期長於12小時。

【1101】在一些實施例中，對siRNA或sdRNA進行最佳化以增加效能及/或減少毒性。在一些實施例中，引導股及/或乘客股之核苷酸長度及/或引導股及/或乘客股中硫代磷酸酯修飾之數目在一些態樣中可影響RNA分子之效能，而用2'-0-甲基(2'OMe)修飾置換2'-氟(2'F)修飾在一些態樣中可影響分子之毒性。在一些實施例中，預期減少分子之2'F含量將減少分子之毒性。在一些實施例中，RNA分子中硫代磷酸酯修飾之數目可影響攝取分子至細胞中，

例如被動攝取分子至細胞中之效率。在一些實施例中，siRNA或sdRNA不具有2'F修飾，但其特徵為細胞攝取與組織滲透方面之功效相等。

【1102】在一些實施例中，引導股之長度為大約18-19個核苷酸且具有大約2-14個磷酸酯修飾。舉例而言，引導股可含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或超過14個經磷酸酯修飾之核苷酸。引導股可含有一或多個賦予增加的穩定性而不干擾RISC進入之修飾。磷酸酯修飾的核苷酸，諸如硫代磷酸酯修飾的核苷酸，可在3'端、5'端或遍佈於整個引導股中。在一些實施例中，引導股之3'端10個核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯修飾的核苷酸。引導股亦可含有2'F及/或2'OMe修飾，其可位於整個分子中。在一些實施例中，引導股中位置一之核苷酸(引導股之最5'位置中之核苷酸)經2'OMe修飾及/或磷酸化。引導股內之C及U核苷酸可經2'F修飾。舉例而言，19個核苷酸之引導股之位置2-10(或不同長度之引導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'F修飾。引導股內之C及U核苷酸亦可經2'OMe修飾。舉例而言，19個核苷酸之引導股之位置11-18(或不同長度之引導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'OMe修飾。在一些實施例中，在引導股之最3'端處之核苷酸未經修飾。在某些實施例中，引導股內之大部分C及U經2'F修飾，且引導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，且引導股之5'端經磷酸化。在

其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，引導股之5'端經磷酸化，且位置2-10中之C或U經2'F修飾。

【1103】自我可遞送RNAi技術提供一種直接用RNAi劑(無論係siRNA、sdRNA或係其他RNAi劑)轉染細胞而無需另外調配物或技術之方法。轉染難以轉染細胞株之能力、高活體內活性及使用簡單為該等組合物及方法之特徵，其相對於基於siRNA之傳統技術存在顯著的功能優勢，且因此在關於減少本發明之TIL中目標基因表現之方法之若干實施例中採用sdRNA方法。sdRNAi方法允許直接遞送化學合成化合物至廣泛範圍之離體及活體內初代細胞及組織。在本文中本發明之一些實施例中描述之sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特之Advirna LLC。

【1104】siRNA及sdRNA可以疏水性修飾之siRNA-反義寡核苷酸雜交結構形成，且揭示於例如Byrne等人，《眼科藥理學治療雜誌(*J. Ocular Pharmacol. Therapeut.*)》, 2013, 29, 855-864中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1105】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸可使用無菌電穿孔遞送至本文所描述之TIL。在某些實施例中，方法包含無菌電穿孔TIL群體以遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸。

【1106】在一些實施例中，寡核苷酸可與跨膜遞送系統組合遞送至細胞。在一些實施例中，此跨膜遞送系統包

含脂質、病毒載體及其類似者。在一些實施例中，寡核苷酸劑為不需要任何遞送劑之自我遞送RNAi劑。在某些實施例中，方法包含使用跨膜遞送系統來遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸至TIL群體。

【1107】使寡核苷酸及寡核苷酸組合物與本文所描述之TIL接觸(例如使其接觸，在本文中亦稱為投與或遞送至)且被攝入，包括經由TIL被動攝取。sdRNA可在以下時添加至如本文所描述之TIL：在第一擴增期間(例如步驟B)、在第一擴增之後(例如在步驟C期間)、在第二擴增之前或期間(例如在步驟D之前或期間)、在步驟D之後且在步驟E中收集之前、在步驟F中收集期間或之後、在步驟F中最終調配及/或轉移至輸注袋之前或期間、以及在步驟F中任何視情況選用之冷凍保存步驟之前。此外，siRNA或sdRNA可在自步驟F中任何冷凍保存步驟解凍之後添加。在一些實施例中，可將一或多個靶向如本文中所描述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及CBLB)之sdRNA，以選自由100 nM至20 mM、200 nM至10 mM、500 nm至1 mM、1 μM至100 μM及1 μM至100 μM組成之群組之濃度，添加至包含TIL及其他藥劑之細胞培養基。在一些實施例中，可將一或多個靶向如本文中所描述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及CBLB)之sdRNA，以選自由以下組成之群組之量添加至包含TIL及其他藥劑之細胞培養基：0.1 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.5 μM

siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.75 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.25 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、2 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基或10 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基。在一些實施例中，可將一或多個靶向如本文中所描述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及CBLB)之sdRNA，在預REP或REP階段期間一天兩次、一天一次、每兩天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每七天一次添加至TIL培養物。

【1108】本發明之寡核苷酸組合物，包括sdRNA，可在擴增過程期間，例如藉由將高濃度sdRNA溶解於細胞培養培養基中及允許足夠時間發生被動攝取而與如本文所描述之TIL接觸。在某些實施例中，本發明方法包含使TIL群體與如本文所描述之寡核苷酸組合物接觸。在某些實施例中，方法包含將寡核苷酸，例如sdRNA，溶解於細胞培養基中，且使細胞培養基與TIL群體接觸。TIL可為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

【1109】在一些實施例中，遞送寡核苷酸至細胞中可藉由合適的本領域公認方法增強，包括磷酸鈣、DMSO、甘油或聚葡萄糖、電穿孔或藉由轉染，例如使用陽離子、

陰離子或中性脂質組合物或脂質體，使用本領域中已知的方法，諸如描述於以下之彼等方法：美國專利第4,897,355號；第5,459,127號；第5,631,237號；第5,955,365號；第5,976,567號；第10,087,464號；及第10,155,945號；及Bergan等人，《核酸評述(*Nucl. Acids Res.*)》 1993, *21*, 3567，其中之每一者之揭示內容以引用的方式併入本文中。

【1110】在一些實施例中，使用超過一種siRNA或sdRNA來減少目標基因表現。在一些實施例中，靶向siRNA或sdRNA之PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2及/或CISH中之一或多者一起使用。在一些實施例中，PD-1 siRNA或sdRNA與TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2及/或CISH中之一或多者一起使用，以減少超過一種基因目標之表現。在一些實施例中，LAG3 siRNA或sdRNA與靶向siRNA或sdRNA之CISH組合使用，以減少兩種目標之基因表現。在一些實施例中，本文中靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2及/或CISH中之一或多者之siRNA或sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特的Advirna LLC。

【1111】在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：PD-1、LAG3、

TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且另一種siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群組之基因：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自以下之基因：PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2 及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自PD-1及以下中之一者之基因：LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA

或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向PD-1。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或

sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。

【1112】如上文所論述，本發明之實施例提供已經由基因編輯進行遺傳修飾以增強其治療效果之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。本發明之實施例涵蓋經由核苷酸插入(RNA或DNA)TIL群體中進行之基因編輯，以促進一或多種蛋白質之表現及抑制一或多種蛋白質之表現以及其組合本發明之實施例亦提供用於將TIL擴增為治療性群體之方法，其中該等方法包含基因編輯TIL。存在若干種可用於遺傳修飾TIL群體之基因編輯技術，該等基因編輯技術適合於根據本發明使用。此類方法包括下文所描述之方法以及本文別處所描述之病毒及轉座子方法。在一些實施例中，遺傳修飾TIL、MIL或PBL以表達CCR的方法亦可包括經由穩定基因剔除此類基因或暫時基因減弱此類基因來抑制基因表現

的修飾。

【1113】在一些實施例中，方法包含遺傳修飾TIL群體之方法，該方法包括穩定併入用於產生一或多種蛋白質之基因的步驟。在實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括逆轉錄病毒轉導之步驟。在實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如以下中：Levine等人，《美國國家科學院院刊》 2006, *103*, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學》 1997, *15*, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌》 1998, *72*, 8463-71及美國專利第6,627,442號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括γ-逆轉錄病毒轉導之步驟。γ-逆轉錄病毒轉導系統為本領域中已知的且描述於例如Cepko及Pear, 《分子生物學中之當前方案(*Cur. Prot. Mol. Biol.*)》 1996, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為本領域中已知的，且包括其中轉位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包含帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包括類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等

人，《分子療法(*Mol. Therapy*)》 2010, *18*, 674-83及美國專利第6,489,458號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，方法包含遺傳修飾TIL群體之方法，該TIL群體為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括穩定併入用於產生或抑制(例如靜默)一或多種蛋白質之基因之步驟。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括電穿孔之步驟。電穿孔方法為本領域中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物物理學雜誌》 1991, *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。可使用本領域中已知之其他電穿孔方法，諸如以下中描述之彼等電穿孔方法：美國專利第5,019,034號、第5,128,257號、第5,137,817號、第5,173,158號、第5,232,856號、第5,273,525號、第5,304,120號、第5,318,514號、第6,010,613號及第6,078,490號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，電穿孔方法為無菌電穿孔方法。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈

衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電穿孔方法為脈衝電穿孔方法，其包含用脈衝電場處

理TIL以誘導TIL中孔形成之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同，使得所誘導的孔持續相對長的時段，及使得維持TIL之存活性。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面包覆及胞吞作用)為本領域中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb, 《病毒學(*Virology*)》 1973, *52*, 456-467；Wigler等人, 《美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci.*)》 1979, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學(*Mol. Cell. Biol.*)》 1987, *7*, 2745-2752；及美國專利第5,593,875號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n,n,n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1: 1(w/w)脂質體調配物之方法為本領域中已知的且描述於以下中：Rose等人, 《生物技術(*Biotechniques*)》 1991, *10*, 520-525及Felgner等人, 《美國國家科學院院刊》, 1987, *84*, 7413-

7417以及美國專利第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遺傳修飾TIL群體之方法包括使用以下中描述之方法進行轉染之步驟：美國專利第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994號及第7,189,705號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。TIL可為如本文所描述之第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1114】根據一實施例，基因編輯方法可包含使用介導在一或多個免疫檢查點基因處產生雙股或單股斷裂之可程式化核酸酶。此類可程式化核酸酶藉由在特定基因體基因座處引入斷裂而能夠進行精確基因體編輯，亦即其依賴於識別基因體內之特定DNA序列以將核酸酶域靶向此位置且介導在目標序列處產生雙股斷裂。DNA中之雙股斷裂隨後將內源性修復機制募集至斷裂位點，以藉由非同源末端連接(NHEJ)或同源定向修復(HDR)來介導基因體編輯。因此，斷裂之修復可導致引入擾亂(例如靜默、抑制或增強)目標基因產物之插入/缺失突變。

【1115】經開發而使得能夠進行位點特異性基因體編輯之核酸酶之主要類別包括鋅指核酸酶(zinc finger nuclease；ZFN)、轉錄活化因子樣核酸酶(transcription activator-like nucleases；TALEN)及CRISPR相關核酸酶(例如CRISPR/Cas9)。此等核酸酶系統可基於其DNA識別模式

而大致分類為兩類：ZFN及TALEN經由蛋白質-DNA相互作用達成特定DNA結合，而CRISPR系統，諸如Cas9，藉由與目標DNA直接鹼基配對之短RNA引導分子及藉由蛋白質-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。參見例如Cox等人，《自然醫學(*Nature Medicine*)》，2015，第21卷，第2期。

【1116】可根據本發明之TIL擴增方法使用之基因編輯方法之非限制性實例包括CRISPR方法、TALE方法及ZFN方法，該等方法在下文更詳細地描述。根據一實施例，將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如Gen 2過程)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由CRISPR方法、TALE方法或ZFN方法中之一或多者基因編輯至少一部分的TIL，以產生可提供增強治療效果的TIL。根據一實施例，可藉由活體外比較基因編輯的TIL與未經修飾的TIL，例如藉由評估相較於未經修飾的TIL之活體外效應功能、細胞介素概況等，來評估基因編輯的TIL之改善的治療效果。在某些實施例中，方法包含使用CRISPR、TALE及/或ZFN方法來基因編輯TIL群體。

【1117】在本發明之一些實施例中，使用電穿孔來遞送基因編輯系統，諸如CRISPR、TALEN及ZFN系統。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統為流式電穿孔系統。

適用於本發明之一些實施例之合適的流式電穿孔系統之實例為市售MaxCyte STX系統。有若干種可能適用於本發明之替代性市售電穿孔儀器，諸如可獲自BTX-Harvard Apparatus之AgilePulse系統或ECM 830、Cellaxess Elektra(Cellectricon)、Nucleofector(龍沙(Lonza)/Amaxa)、GenePulser MXcell(伯樂(BIORAD)、iPorator-96(Primax)或siPORTer96(Ambion)。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。在本發明之一些實施例中，電穿孔系統為如本文中所描述之脈衝電穿孔系統，且與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。

【1118】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如Gen 2)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由CRISPR方法(例如CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1119】CRISPR代表成簇規律間隔短回文重複序列使用CRISPR系統進行基因編輯之方法在本文中亦稱為

CRISPR方法。有三種類型之併入RNA及Cas蛋白且可根據本發明使用之CRISPR系統：第I、II及III型。II型CRISPR(藉由Cas9例示)為最充分表徵之系統之一。

【1120】CRISPR技術係改編自細菌及古菌(單細胞微生物之域)之天然防禦機制。此等生物體使用CRISPR衍生之RNA及各種Cas蛋白(包括Cas9)，藉由切碎及破壞外來入侵者之DNA來阻止病毒及其他外來體的攻擊。CRISPR為具有兩個獨特特徵之DNA特化區：存在核苷酸重複序列及間隔子。核苷酸之重複序列分佈在整個CRISPR區中，其中短外來DNA區段(間隔子)穿插在重複序列中。在II型CRISPR/Cas系統中，間隔子整合於CRISPR基因體基因座內且轉錄並加工成短CRISPR RNA(crRNA)。此等crRNA退火成反式活化crRNA(tracrRNA)，且引導Cas蛋白進行序列特異性裂解及靜默病原性DNA。Cas9蛋白進行之目標識別需要crRNA內之「種子」序列及crRNA結合區上游之含有二核苷酸的保守原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。藉此CRISPR/Cas系統可藉由重新設計crRNA而重新靶向以裂解幾乎任何DNA序列。原生系統中之crRNA及tracrRNA可簡化為大約100個核苷酸之單引導RNA(sgRNA)以用於基因工程改造。CRISPR/Cas系統藉由共同遞送表現Cas9核酸內切酶及必需crRNA組分之質體可直接攜帶入人類細胞。可使用不同的Cas蛋白變異體來減少靶向限制(例如Cas9之異種同源物，諸如Cpf1)。

【1121】可經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而靜

默或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1122】可經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、IL-18及IL-21。

【1123】藉由CRISPR方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於以下中：美國專利第8,697,359號、第8,993,233號、第8,795,965號、第8,771,945號、第8,889,356號、第8,865,406號、第8,999,641號、第8,945,839號、第8,932,814號、第8,871,445號、第8,906,616號及第8,895,308號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。用於進行CRISPR方法之資

源，諸如用於表現CRISPR/Cas9及CRISPR/Cpf1之質體，可購自公司，諸如金斯瑞(GenScript)。

【1124】在一些實施例中，遺傳修飾如本文中所描述之TIL群體可使用如美國專利第US 9790490號中所描述之CRISPR/Cpf1系統進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1125】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法(例如Gen 2)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號中所描述進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包含藉由TALE方法基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1126】TALE代表轉錄活化因子樣效應蛋白，其包括轉錄活化因子樣效應核酸酶(TALEN)。使用TALE系統來基因編輯之方法在本文中亦稱為TALE方法。TALE為來自植物病原細菌黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)之天然存在蛋白質，且含有由一系列各自識別單鹼基對之33-35個胺基酸之重複域構成之DNA結合域。TALE特異性係藉由被稱為重複可變二殘基(repeat-variable di-residue；RVD)之兩

個高變胺基酸判定。模組化TALE重複序列連接在一起以識別連續DNA序列。DNA結合域中之特異性RVD識別目標基因座中之鹼基，從而提供結構特徵以組裝可預測的DNA結合域。將TALE之DNA結合域與IIS型FokI核酸內切酶之催化域融合，以製備可靶向的TALE核酸酶。為了誘導位點特異性突變，由14-20個鹼基對間隔區域分開之兩個個別TALEN組將FokI單體拉近以二聚合及產生靶向的雙股斷裂。

【1127】若干個利用各種組裝方法之大的系統性研究指示，可併入TALE重複序列以識別幾乎任何使用者定義的序列。定製設計的TALE陣列亦由Cellectis Bioresearch(法國巴黎)、Transposagen Biopharmaceuticals(美國肯塔基州列克星敦(Lexington, KY, USA))及Life Technologies(美國紐約州格蘭德島(Grand Island, NY, USA))市售。適用於本發明之TALE及TALEN方法描述於以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0201118 A1號、第US 2013/0117869 A1號、第US 2013/0315884 A1號、第US 2015/0203871 A1號及第US 2016/0120906 A1號，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1128】可經由TALE方法永久性基因編輯TIL而靜默或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、

SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1129】可經由TALE方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、IL-18及IL-21。

【1130】藉由TALE方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利第8,586,526號中，其以引用之方式併入本文中。

【1131】用於將TIL擴增為治療性群體之方法可根據本文所描述之方法之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利第10,925,900號中所描述進行，其中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包含藉由鋅指或鋅指核酸酶方法基因編輯至少一部分的TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點

基因之表現靜默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1132】呈保守ββα組態之個別鋅指含有大約30個胺基酸。α-螺旋表面上之幾個胺基酸通常以不同的選擇性水準接觸DNA主溝槽中的3 bp。鋅指具有兩個蛋白域。第一域為DNA結合域，其包括真核轉錄因子且含有鋅指。第二域為核酸酶域，其包括FokI限制酶且負責催化裂解DNA。

【1133】個別ZFN之DNA結合域通常含有介於三個與六個之間的個別鋅指重複且各自可識別介於9個與18個之間的鹼基對。若鋅指域對其預期目標位點具有特異性，則甚至一對識別總共18個鹼基對之3指ZFN理論上可靶向哺乳動物基因體中之單個基因座。一個產生新的鋅指陣列之方法為組合具有已知特異性之較小鋅指「模組」。最常見的模組組裝過程涉及組合三個分開的可各自識別3個鹼基對DNA序列之鋅指，以產生可識別9個鹼基對目標位點之3指陣列。替代地，可使用基於選擇之方法，諸如寡聚池工程改造(oligomerized pool engineering；OPEN)，來自隨機分組文庫選擇新的鋅指陣列，該等隨機分組文庫考慮介於鄰近指之間的上下文依賴性相互作用(context-dependent interaction)。工程改造之鋅指可從Sangamo Biosciences(美國加利福尼亞州里奇蒙)及Sigma-Aldrich(美國密蘇里州聖路易斯)購得。

【1134】可經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而靜默

或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1135】可經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、IL-18及IL-21。

【1136】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於以下中：美國專利第6,534,261號、第6,607,882號、第6,746,838號、第6,794,136號、第6,824,978號、第6,866,997號、第6,933,113號、第6,979,539號、第7,013,219號、第7,030,215號、第7,220,719號、第7,241,573號、第7,241,574號、第7,585,849號、第7,595,376號、第6,903,185號及第6,479,626號，其以引用

之方式併入本文中。

【1137】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之其他實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於Beane等人，《分子療法》，2015, *23* 1380-1390中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1138】在一些實施例中，TIL視情況經基因工程改造以包括另外官能性，該等官能性包括但不限於高親和力TCR，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例，基因工程改造方法描述於國際專利公開案第WO 2019/160829 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中，其可用於遺傳編輯TIL，包括基因剔除特定靶基因，諸如編碼PD-1即CTLA-4之基因。在某些實施例中，方法包含基因工程改造TIL群體以包括高親和力TCR，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(CAR)。適當地，TIL群體可為如本文所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

D. 用於TIL製造之密閉系統

【1139】本發明提供在TIL培養過程期間使用密閉系統。此類密閉系統允許預防及/或減少微生物污染、允許

使用較少培養瓶且允許成本降低。在一些實施例中，密閉系統使用兩個容器。

【1140】此類密閉系統為本領域中熟知的且可見於例如 http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm 及 https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm處。

【1141】無菌連接裝置(Sterile connecting device；STCD)在兩件相容性管之間產生無菌熔接部分(weld)。此程序允許無菌連接多個容器及管直徑。在一些實施例中，密閉系統包括魯爾鎖(luer lock)及熱封系統，如例如實例中所描述。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例中所描述之密閉系統。在一些實施例中，根據本文實例中所描述之方法，將TIL調配至最終產物調配容器中。

【1142】在一些實施例中，自獲得腫瘤碎片之時間至準備向患者投與TIL或冷凍保存為止，密閉系統使用一個容器。在一些實施例中，當使用兩個容器時，第一容器為密閉G容器，且在不打開第一密閉G容器之情況下離心TIL群體且將其轉移至輸注袋。在一些實施例中，當使用兩個容器時，輸注袋為含有HypoThermosol之輸注袋。密閉系統或密閉TIL細胞培養系統之特徵在於，一旦已添加腫瘤樣本及/或腫瘤碎片，則系統自外部緊密密封以形成密閉環境，不受細菌、真菌及/或任何其他微生物污染入侵。

【1143】在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約100%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約95%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約10%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約15%與約85%之間。在一些實施例中，微生物污染減少為約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%或約100%。

【1144】密閉系統允許TIL在不存在微生物污染下及/或在微生物污染顯著減少下生長。

【1145】此外，TIL細胞培養環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓各自隨細胞培養而變化。因此，即使適合於細胞培養之培養基經循環，但密閉環境仍需要不斷地維持為TIL增殖之最佳環境。為了此目的，合乎需要的係，藉助於感測器監測密閉環境之培養液內之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之物理因素，其訊號用於控制安設在培養環境之入口處的氣體交換器，及根據培養液中之變化實時調整密閉環境之氣體分壓以便最佳化細胞培養環境。在一些實施例中，本發明提供密閉細胞培養系統，其在至密閉環境之入口處併入配備有量測密閉環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之監測裝置的氣體交換器，且藉由基於來自監測裝置之訊號自動調整氣體濃度來最佳化細胞培養環境。

【1146】在一些實施例中，連續地或間歇地控制密閉環境內之壓力。即，密閉環境中之壓力可藉助於例如壓力維持裝置來改變，從而確保空間在正壓力狀態下適合於TIL生長或促進在負壓力狀態下滲出流體且因此促進細胞增殖。此外，藉由間歇性地施加負壓力，有可能藉助於暫時性縮小密閉環境之容積而均勻且有效地置換密閉環境中之循環液體。

【1147】在一些實施例中，可替換或添加TIL增殖之最佳培養物組分，且可添加包括諸如IL-2及/或OKT3以及組合之因子。

E. 視情況選用之TIL之冷凍保存

【1148】主體TIL群體(例如第二TIL群體)或擴增TIL群體(例如第三TIL群體)可視情況進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存發生於 治療性TIL群體。在一些實施例中，冷凍保存發生於在第二擴增後收集之TIL。在一些實施例中，冷凍保存發生於圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之例示性步驟F中之TIL。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於輸注袋中。在一些實施例中，TIL係在置於輸注袋中之前冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存TIL且不將其置於輸注袋中。在一些實施例中，使用冷凍保存培養基進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存培養基含有二甲亞碸(DMSO)。此一般藉由將TIL群體放置於冷凍溶液(例如

85%補體去活化AB血清及15%二甲亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報(*Acta Oncologica*)》**2013,** *52*, 978-986。

【1149】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如本領域中已知的來評定存活性。

【1150】在一些實施例中，TIL群體係使用CS10冷凍保存培養基(CryoStor 10，BioLife Solutions)冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用含有二甲亞碸(DMSO)之冷凍保存培養基冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用約1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基(進一步包含另外IL-2)冷凍保存。

【1151】如上文所論述且如圖1及/或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之步驟A至E中所例示，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的多個點。在一些實施例中，在第一擴增之後(如例如根據步驟B所提供)經擴增之TIL群體或在根據圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D的一或多個第二擴增之後的經擴增之TIL群體可進行冷凍保存。冷凍保

存一般可藉由將TIL群體置放於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報(*Acta Oncologica*)》 **2013,** *52,* 978-986。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於細胞培養基加5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係根據實例6中提供之方法冷凍保存。

【1152】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如本領域中已知的來評定存活性。

【1153】在某些情況下，圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B的TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。或者，主體TIL群體可經歷來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟C及步驟D，且接著在圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D之後進行冷凍保存。類似地，在其中遺傳修飾TIL將用於療法中之情況下，來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B或步驟D的TIL群體可進行

遺傳修飾以用於合適的治療。

F. 擴增TIL之表型特徵

【1154】在一些實施例中，分析TIL在擴增後之多種表型標誌之表現，該等標誌包括本文及實例中所描述之彼等者。在一些實施例中，檢查一或多種表型標誌之表現。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟B中的第一擴增之後分析TIL的表型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟C中的轉變期間分析TIL的表型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟C中的轉變期間且在冷凍保存之後分析TIL的表型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中的第二擴增之後分析TIL的表型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)之步驟D中的兩次或更多次擴增之後分析TIL的表型特徵。

【1155】在一些實施例中，標誌係選自由CD8及CD28組成之群組。在一些實施例中，檢查CD8之表現。在一些實施例中，檢查CD28之表現。在一些實施例中，相較於

其他過程(例如如例如圖8(特別係例如圖圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8及/或CD28的表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別係例如圖8B)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8的表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(特別係例如圖8A)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD28的表現更高。在一些實施例中，高CD28表現指示較年輕更持久的TIL表型。在一些實施例中，量測一或多種調節標誌之表現。

【1156】在一些實施例中，在用於擴增本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法之任一步驟期間，未基於CD8及/或CD28表現選擇第一TIL群體、第二TIL群體、第三TIL群體或所收集TIL群體。

【1157】在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之Gen 3過程)，相

較於如例如圖8(特別係例如圖8A)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL之中樞記憶細胞的百分比更高。在一些實施例中，中樞記憶細胞之記憶標誌係選自由CCR7及CD62L組成之群組。

【1158】在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL記憶子集可分為不同記憶子集。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含初始(CD45RA+CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含中樞記憶(central memory，CM；CD45RA-CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含效應記憶(effector memory，EM；CD45RA-CD62L-)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含RA+效應記憶/效應(TEMRA/TEFF；CD45RA+CD62L+)TIL。

【1159】在一些實施例中，TIL表現一或多種選自由以下組成之群組之標誌：顆粒酶B、穿孔蛋白及顆粒溶解素。在一些實施例中，TIL表現顆粒酶B。在一些實施例中，TIL表現穿孔蛋白。在一些實施例中，TIL表現顆粒溶解素。

【1160】在一些實施例中，亦可使用細胞介素釋放分析，評估再刺激的TIL之細胞介素釋放。在一些實施例中，可評估TIL之干擾素-γ(IFN-γ)分泌。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA分析量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA分析在快速第二擴增步驟之後、在如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖

8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)所提供之步驟D之後量測。在一些實施例中，TIL健康係藉由IFN-γ(IFN-γ)分泌量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。IFN-γ產生可藉由測定經抗CD3、CD28及CD137/4-1BB之抗體刺激之TIL培養基中之細胞介素IFN-γ之含量量測。來自此等受刺激TIL之培養基中之IFN-γ含量可藉由量測IFN-γ釋放測定。在一些實施例中，例如如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中提供之Gen 3過程中步驟D的TIL相較於例如如圖8(特別係例如圖8A)中提供之2A過程中步驟D之IFN-γ產生增加，指示步驟D的TIL之細胞毒性潛力增加。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，IFN-γ之分泌增加三倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ，包括藉由本發明之方法(包括例如圖8B方法)產生之TIL。

【1161】在一些實施例中，能夠分泌至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及

/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於一倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於兩倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於三倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於四倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於五倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。

【1162】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/mL至約1000 pg/mL或更多之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，在能夠分泌至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少550 pg/mL、至少600

pg/mL、至少650 pg/mL、至少700 pg/mL、至少750 pg/mL、至少800 pg/mL、至少850 pg/mL、至少900 pg/mL、至少950 pg/mL或至少1000 pg/mL或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，

能夠分泌至少700 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G

方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B

及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。

【1163】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/mL/5e5個細胞至約1000 pg/mL/5e5個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞、至少250 pg/mL/5e5個細胞、至少300 pg/mL/5e5個細胞、至少350 pg/mL/5e5個細胞、至少400

pg/mL/5e5個細胞、至少450 pg/mL/5e5個細胞、至少500 pg/mL/5e5個細胞、至少550 pg/mL/5e5個細胞、至少600 pg/mL/5e5個細胞、至少650 pg/mL/5e5個細胞、至少700 pg/mL/5e5個細胞、至少750 pg/mL/5e5個細胞、至少800 pg/mL/5e5個細胞、至少850 pg/mL/5e5個細胞、至少900 pg/mL/5e5個細胞、至少950 pg/mL/5e5個細胞或至少1000 pg/mL/5e5個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖

8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一

些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/mL/5e5個細胞

IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包

括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。

【1164】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文中提供之方法以外之其他方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性，該等其他方法包括例如除圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中實施之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖8(特別係例如圖8A)中例示之稱為Gen 2之方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第一擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群組之T

細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。在一些實施例中，如本文所描述之過程(例如Gen 3過程)相較於其他過程(例如稱為Gen 2之過程)，基於樣本內獨特肽CDR之數目，顯示更高的純系多樣性。

【1165】在一些實施例中，TIL之活化及耗竭可藉由檢查一或多種標誌判定。在一些實施例中，活化及耗竭可使用多色流動式細胞測量術判定。在一些實施例中，標誌之活化及耗竭包括但不限於一或多種選自由以下組成之群組之標誌：CD3、PD-1、2B4/CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194/CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103及/或LAG-3)。在一些實施例中，標誌之活化及耗竭包括但不限於一或多種選自由以下組成之群組之標誌：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、PD-1、TIGIT及/或TIM-3。在一些實施例中，標誌之活化及耗竭包括但不限於一或多種選自由以下組成之群組之標誌：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+/CD69+、CD103+/CD69-、PD-1、TIGIT及/或TIM-3。在一些實施例中，可判定及/或分析T細胞標誌(包括活化及耗竭標誌)以檢查T細胞活化、抑制或功能。在一些實施例中，T細胞標誌可包括但不限於一或多種選自由以下組成之群組之標誌：TIGIT、CD3、FoxP3、

Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4及/或CD59。

【1166】在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆

粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或

圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL

為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖

8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及

/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶

B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖

8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。

【1167】在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/mL至300000 pg/mL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/mL、高於2000 pg/mL、高於3000 pg/mL、高於4000 pg/mL、高於5000 pg/mL、高於6000 pg/mL、高於7000 pg/mL、高於8000 pg/mL、高於9000 pg/mL、高於10000 pg/mL、高於20000 pg/mL、高於30000 pg/mL、高於40000 pg/mL、高於50000 pg/mL、高於60000 pg/mL、高於70000 pg/mL、高於80000 pg/mL、高於90000 pg/mL、高於100000 pg/mL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於1000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於2000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於3000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於4000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖

8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於5000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於6000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於7000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於8000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於9000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於10000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於20000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於30000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及

/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於40000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於50000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於60000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於70000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於80000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於90000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於100000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖

8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方

法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)產生之TIL。

【1168】在一些實施例中，本發明之擴增方法產生展現相較於非擴增TIL群體增加的活體外顆粒酶B分泌的擴增TIL群體，包括例如如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G中提供的TIL。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍至五十倍或更多。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，IFN-γ分泌增加至少一倍、至少兩倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍、至少十倍、至少二十倍、至少三十倍、至少四十倍、至少五十倍或更多。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少兩倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，

本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少六倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少七倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少八倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少九倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少二十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五十倍。

【1169】在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多含量之TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少一倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至

少兩倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少三倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少四倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌分泌低至少五倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。

【1170】在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A

及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B

及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL。

【1171】在一些實施例中，量測IFN-γ及顆粒酶B含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL的表型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ、顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G方法)產生之TIL的表型特徵。

【1172】在一些實施例中，表型特徵係在冷凍保存之後檢查。

G. 另外過程實施例

【1173】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包含：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包含IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1天至7天或約1至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至11天或約1天至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天或約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中

培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天或約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4

天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天之時段。

【1174】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包含：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包含IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，

其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至6天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至6天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養

中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至5天之時段。

【1175】在一些實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包含：(a)藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體；(b)藉由在包含IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約1至7天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至11天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(d)收集獲自步驟(c)之治療性TIL群體。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，

其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養

中培養第二TIL群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-g500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5天之時段。

【1176】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由使第一TIL群體與進一步包含外源性抗原呈現細胞(APC)之培養基接觸來進行，其中步驟(c)中培養基中之APC數目大於步驟(b)中培養基中之APC數目。

【1177】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，培養基補充有另外外源性APC。

【1178】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【1179】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1180】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1181】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1182】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1183】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1184】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1之範圍。

【1185】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1186】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1187】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1188】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1189】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1190】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1191】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1192】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1193】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1194】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1195】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1196】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【1197】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1198】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1199】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1200】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1201】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1202】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1203】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1204】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1205】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1206】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1207】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1208】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1209】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1210】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中

添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約2:1。

【1211】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【1212】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目為剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC，且其中快速第二擴增中添加之APC數目為剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、$6.5\times$

10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC。

【1213】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約1×10^8個APC至剛好或大約3.5×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約3.5×10^8個APC至剛好或大約1×10^9個APC的範圍。

【1214】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍。

【1215】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中初始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5

$\times 10^8$個APC的範圍。

【1216】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中剛好或大約2.5$\times 10^8$個APC係添加至初始第一擴增，且剛好或大約5$\times 10^8$個APC係添加至快速第二擴增。

【1217】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1218】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤碎片係分佈至複數個分開的容器中，在各分開的容器中，第一TIL群體係在步驟(a)中獲得，第二TIL群體該步驟(b)中獲得，且第三TIL群體係在步驟(c)中獲得，且將來自步驟(c)中複數個容器之治療性TIL群體合併以產生來自步驟(d)之經收集的TIL群體。

【1219】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤均勻分佈至複數個分開的容器中。

【1220】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含至少兩個分開的容器。

【1221】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至二十個分開的容器。

【1222】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至十五個分開的容器。

【1223】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至十個分開的容器。

【1224】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至五個分開的容器。

【1225】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個分開的容器。

【1226】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在各容器中對步驟(b)中之第一TIL群體進行初始第一擴增，在同一容器中對由此類第一TIL群體產生之第二TIL群體進行步驟(c)中的快速第二擴增。

【1227】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中分開的容器中之各者包含第一透氣表面區域。

【1228】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤碎片分佈於單一容器中。

【1229】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中單一容器包含第一透氣表面區域。

【1230】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1231】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1232】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1233】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【1234】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1235】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1236】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1237】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【1238】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係在包含第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在包含第二透氣表面

區域的第二容器中進行。

【1239】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二容器大於第一容器。

【1240】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1241】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1242】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1243】在其他實施例中，本發明提供經修改之如適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細

胞層。

【1244】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層迭至第二透氣表面區域上。

【1245】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層迭至第二透氣表面區域上。

【1246】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層迭至第二透氣表面區域上。

【1247】在其他實施例中，本發明提供經修改之適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層迭至第二透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【1248】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係在包含第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在第一容器中進行。

【1249】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1250】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1251】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1252】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【1253】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之

平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1254】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1255】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上。

【1256】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層迭至第一透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【1257】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍。

【1258】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:9的範圍。

【1259】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範圍。

【1260】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍。

【1261】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第

一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍。

【1262】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範圍。

【1263】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍。

【1264】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的

比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍。

【1265】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範圍。

【1266】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍。

【1267】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍。

【1268】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，

初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範圍。

【1269】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍。

【1270】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍。

【1271】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層

迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範圍。

【1272】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍。

【1273】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍。

【1274】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:2的範圍。

【1275】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，初始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層迭的APC之平均層數與步驟(c)中層迭的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

【1276】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約1.5:1至剛好或大約100:1。

【1277】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大

約50:1。

【1278】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約25:1。

【1279】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約20:1。

【1280】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約10:1。

【1281】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體高至少剛好或大約50倍。

【1282】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體高至少剛好或大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50倍。

【1283】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中之第二時段開始後剛好或大約2天或剛好或大約3天，對細胞培養基補充另外的IL-2。

【1284】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，進一步包含使用冷凍保存過程冷凍保存步驟(d)中之經收集的TIL群體的步驟。

【1285】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包含在步驟(d)後進行將來自步驟(d)之經收集的TIL群體轉移至視情況含有HypoThermosol之輸注袋的另外步驟(e)。

【1286】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包含使用冷凍保存過程冷凍保存包含步驟(e)中之經收集之TIL群體的輸注袋的步驟。

【1287】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用1:1比率之經收集之TIL群體與冷凍保存培養基來進行冷凍保存過程。

【1288】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1289】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經照射且同種異體的。

【1290】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中添加至細胞培養物之APC總數為2.5×10^8個。

【1291】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中添加至細胞培養物之APC總數為5×10^8個。

【1292】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中APC為PBMC。

【1293】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經照射且同種異體的。

【1294】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為人工抗原呈現細胞。

【1295】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用基於膜之細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【1296】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用LOVO細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【1297】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約5至剛好或大約60個碎片。

【1298】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約10至剛好或大約60個碎片。

【1299】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約15至剛好或大約60個碎片。

【1300】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約20至剛好或大約60個碎片。

【1301】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約25至剛好或大約60個碎片。

【1302】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約30至剛好或大約60個碎片。

【1303】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約35至剛好或大約60個碎片。

【1304】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約40至剛好或大約60個碎片。

【1305】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約45至剛好或大約60個碎片。

【1306】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約50至剛好或大約60個碎片。

【1307】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含在步驟(b)中每容器剛好或大約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60個碎片。

【1308】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約27 mm^3之體積。

【1309】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約20 mm^3至剛好或大約50 mm^3之體積。

【1310】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約21 mm^3至剛好或大約30 mm^3之體積。

【1311】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約22 mm^3至剛好或大約29.5 mm^3之體積。

【1312】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好

或大約23 mm^3至剛好或大約29 mm^3之體積。

【1313】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約24 mm^3至剛好或大約28.5 mm^3之體積。

【1314】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約25 mm^3至剛好或大約28 mm^3之體積。

【1315】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約26.5 mm^3至剛好或大約27.5 mm^3之體積。

【1316】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各碎片具有剛好或大約以下之體積：21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50 mm^3。

【1317】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含剛好或大約30至剛好或大約60個碎片，其中總體積為剛好或大約1300 mm^3至剛好或大約1500 mm^3。

【1318】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含剛好或大約50個碎片，其中總體積為剛好或大約1350 mm^3。

【1319】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個碎片包含剛

好或大約50個碎片，其中總質量為剛好或大約1公克至剛好或大約1.5公克。

【1320】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基係提供於呈G容器或Xuri細胞袋之容器中。

【1321】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基中之IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【1322】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基中之IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【1323】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包含二甲亞碸(DMSO)。

【1324】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包含7%至10% DMSO。

【1325】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【1326】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第二時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7

天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【1327】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【1328】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約5天、6天或7天之時段內進行。

【1329】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約7天之時段內進行。

【1330】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約18天中進行。

【1331】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約18天中進行。

【1332】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約18天中進行。

【1333】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係

於總共剛好或大約17天至剛好或大約18天中進行。

【1334】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約17天中進行。

【1335】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約17天中進行。

【1336】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約17天中進行。

【1337】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約16天中進行。

【1338】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約16天中進行。

【1339】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天中進行。

【1340】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天中進行。

【1341】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係

於總共剛好或大約16天中進行。

【1342】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天中進行。

【1343】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天中進行。

【1344】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天或更短中進行。

【1345】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天或更短中進行。

【1346】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天或更短中進行。

【1347】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天或更短中進行。

【1348】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(d)中收集之治療性TIL群體包含足以用於TIL之治療有效劑量的TIL。

【1349】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中足以用於治療有效劑量之TIL數為剛好或大約2.3×10^{10}個至剛好或大約13.7×10^{10}個。

【1350】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第三TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1351】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於16天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1352】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於17天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1353】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於18天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【1354】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相對於獲自步驟(b)第二細胞群體之效應T細胞及/或中樞記憶T細胞，獲自步驟(c)第三TIL群體之效應T細胞及/或中樞記憶T細胞展現增加的CD8及CD28表現。

【1355】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為密閉容器。

【1356】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為G容器。

【1357】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-10。

【1358】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-100。

【1359】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-500。

【1360】在其他實施例中，本發明提供藉由如上適用之任何前述段落中描述之方法製備的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體。

【1361】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)或OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1362】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1363】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1364】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無添加的抗原呈現細胞(APC)及無添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1365】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於16天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1366】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其

中相較於藉由過程長於17天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1367】在其他實施例中，本發明提供一種自患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中相較於藉由過程長於18天之過程製備的TIL，治療性TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【1368】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的干擾素-γ產生。

【1369】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的多株性。

【1370】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的功效。

【1371】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在其

他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1372】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1373】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【1374】在其他實施例中，本發明提供一種治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的抗原呈現細胞(APC)之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性腫瘤浸潤性淋巴球群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1375】在其他實施例中，本發明提供一種治療性腫

瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性腫瘤浸潤性淋巴球群體產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1376】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1377】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【1378】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的APC之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【1379】在其他實施例中，本發明提供一種治療性TIL群體，相較於藉由其中TIL之第一擴增係在無任何添加的OKT3之情況下進行之過程製備的TIL，該治療性TIL群體產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中描述，例如如上文步驟A至F中或根據上文步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(特別係例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D及/或圖8E及/或圖8F及/或圖8G)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【1380】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1381】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為粗針活體組織切片。

【1382】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為細針抽吸物。

【1383】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1384】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤碎片為芯針活體組織切片。

【1385】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自一或多個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含進行初始第一擴增約8天之時段；且(iv)該方法包含進行快速第二擴增約11天之時段。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1386】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自一或多個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包含IL-2之

細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含進行初始第一擴增約8天之時段；且(iv)該方法包含藉由以下方式進行快速第二擴增：培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1387】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1388】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1389】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織小活

體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1390】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1391】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1392】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1393】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1394】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1395】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1396】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1397】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1398】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1399】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1400】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1401】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1402】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1403】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1404】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1405】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1406】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫

瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1407】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包含藉由在包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1408】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行初始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包含藉由以下方式進行快速第二擴增：在包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養

物，以及在包含IL-2之細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1409】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包含自1至約10個來自個體之腫瘤組織粗針活體組織切片獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行初始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在G-REX-100M培養瓶中在包含6000 IU IL-2/ml之0.5 L CM1培養基的細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含藉由以下方式進行初始第一擴增：添加含有6000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及約10^8個飼養細胞之0.5 L CM1培養基，且培養約8天之時段；且(iv)該方法包含藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)將第二TIL群體轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2、30 ng/ml OKT-3及5×10^9個飼養細胞之5 L CM2培養基的G-REX-500MCS培養瓶中，且培養約5天；(b)藉由將10^9個TIL轉移至含有具有3000 IU/ml IL-2之5 L AIM-V培養基的至多5個G-REX-500MCS培養瓶中之每一者中而將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【1410】在其他實施例中，本發明提供一種擴增T細胞之方法，其包含：(a)藉由培養獲自供體之第一T細胞群體來進行該第一T細胞群體的初始第一擴增，以實現生長及啟動第一T細胞群體的活化；(b)在步驟(a)中啟動之第一T細胞群體之活化開始衰退後，藉由培養第一T細胞群體進行第一T細胞群體的快速第二擴增以實現生長及增強第一T細胞群體的活化，以獲得第二T細胞群體；及(c)收集第二T細胞群體。在其他實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至大於第一容器的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約4至7天之時段。在其他實施例中，快速擴增步之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培

養約4至7天之時段。在其他實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天之時段。在其他實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天之時段。

【1411】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速

第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至大於第一容器之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約5至7天之時段。

【1412】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約5至7天之時段。

【1413】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)

之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天的時段。

【1414】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至6天之時段。

【1415】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天之時段。

【1416】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約6天之時段。

【1417】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模橫向擴大及規模縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約7天之時段。

【1418】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(a)之初始第一擴增係在至多7天之時段內進行。

【1419】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【1420】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。。

【1421】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1422】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多11天之時段內進行。

【1423】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1424】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1425】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1426】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【1427】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【1428】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之初始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【1429】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含OKT-3及IL-2之第一培養基中培養。

【1430】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3及IL-2。

【1431】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包含OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1432】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1433】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在包含OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)之第二培養基中培養。

【1434】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【1435】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層迭至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層迭至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1436】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層

迭至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層迭至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1437】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層迭至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層迭至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1438】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈現細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層

迭至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層迭至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【1439】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二APC群體中之APC之數目與第一APC群體中之APC之數目的比率為約2:1。

【1440】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一APC群體中之APC之數目為約2.5×10^8，且第二APC群體中之APC之數目為約5×10^8。

【1441】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以2個APC層之平均厚度層迭至第一透氣表面上。

【1442】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自4至8個APC層之範圍內的平均厚度層迭至第一透氣表面上。

【1443】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中層

迭至第一透氣表面上之APC層的平均數目與在步驟(a)中層迭至第一透氣表面上之APC層的平均數目的比率為2:1。

【1444】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自在或約1.0×10^6個APC/cm^2至在或約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1445】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1446】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自在或約2.0×10^6個APC/cm^2至在或約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1447】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1448】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1449】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1450】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1451】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1452】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1453】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或

大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1454】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【1455】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【1456】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【1457】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中PBMC經照射且對於第一T細胞群體之供體為外源性的。

【1458】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為腫瘤浸

潤性淋巴球(TIL)。

【1459】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【1460】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【1461】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之全血分離而獲得。

【1462】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之血球分離術產物分離而獲得。

【1463】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由T細胞表型之正向或負向選擇自供體之全血或血球分離術產物分離。

【1464】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞表型為CD3+及CD45+。

【1465】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在進行第一T細胞群體之初始第一擴增之前，自NK細胞分離T細胞。在其他實施例中，藉由自第一T細胞群體移除CD3- CD56+細胞

來將第一T細胞群體中之T細胞與NK細胞分離。在其他實施例中，藉由使用移除CD3- CD56+細胞級份且回收陰性級份之圈選策略對第一T細胞群體進行細胞分選，自第一T細胞群體移除CD3- CD56+細胞。在其他實施例中，前述方法係用於以高百分比之NK細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以高百分比之CD3-CD56+細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以存在大量NK細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以大量CD3-CD56+細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量NK細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量CD3-CD56+細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有卵巢癌之患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。

【1466】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將剛好或大約1x 10^7個來自第一T細胞群體之T細胞接種於容器中，以起始此類容器中之初始第一擴增培養。

【1467】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將第一T細胞群體分佈至複數個容器中，且在各容器中接種剛好或大約1x

10^7個來自第一T細胞群體之T細胞，以起始此類容器中之初始第一擴增培養。

【1468】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(c)中收集之第二T細胞群體為治療性TIL群體。

【1469】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1470】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1471】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1472】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織小活

體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1473】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)、粗針活體組織切片、芯針活體組織切片或細針抽吸物。

【1474】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1475】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1476】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1477】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織粗針活體組織切片。

【1478】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫

瘤組織粗針活體組織切片。

【1479】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1480】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1481】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1482】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1483】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【1484】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1485】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1486】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1487】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1488】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織小活體組織切片(包括例如穿孔活體組織切片)。

【1489】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1490】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1491】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1492】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1493】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織芯針活體組織切片。

【1494】在其他實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包含：i)藉由在包含IL-2之第一細胞培養基中培養自個體腫瘤之一或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或穿刺活體組織切片獲得的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；(ii)藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(iii)藉由用另外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之第二細胞培養基來進行快速第二擴增以產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC數目為在步驟(ii)中添加之

APC數目的至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體；及(v)將來自步驟(iv)之經收集的TIL群體轉移至輸注袋。

【1495】在其他實施例中，本發明提供一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增為治療性TIL群體之方法，其包含：(i)藉由在包含IL-2之第一細胞培養基中培養自個體腫瘤之一或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或穿刺活體組織切片獲得的腫瘤樣本約3天而自該腫瘤樣本獲得及/或接受第一TIL群體；(ii)藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行初始第一擴增以產生第二TIL群體，其中該初始第一擴增進行約7天或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體在數目上大於第一TIL群體；(iii)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；及(iv)收集獲自步驟(iii)之治療性TIL群體。

【1496】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼

代培養物補充另外數量的第三培養基且培養約6天。

【1497】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充包含IL-2之第四培養基且培養約6天。

【1498】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成至多5個繼代培養物。

【1499】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中之所有步驟係在約22天內完成。

【1500】在其他實施例中，本發明提供一種擴增T細胞之方法，其包含：(i)藉由培養來自腫瘤樣本之第一T細胞群體來進行該第一T細胞群體的初始第一擴增，以實現生長及啟動第一T細胞群體的活化，該腫瘤樣本係自供體腫瘤之一或多個小活體組織切片、粗針活體組織切片或穿刺活體組織切片獲得；(ii)在步驟(a)中啟動之第一T細胞群體之活化開始衰退後，藉由培養第一T細胞群體進行第一T細胞群體的快速第二擴增以實現生長及增強第一T細胞群體的活化，以獲得第二T細胞群體；及(iv)收集第二T細胞群體。在一些實施例中，腫瘤樣本係自複數個粗針活體組織切片獲得。在一些實施例中，複數個粗針活體組織切片係選自由以下組成之群組：2、3、4、5、6、7、8、9及10個粗針活體組織切片。

【1501】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中T細胞或TIL自腫瘤碎解物中獲得。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如但不限於RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)培育腫瘤，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術有限公司的GentleMACS)來產生腫瘤碎解物。在一些實施例中，將腫瘤置放於腫瘤解離酶混合物中，該腫瘤解離酶混合物包括一或多種解離(消化)酶，諸如(但不限於)膠原蛋白酶(包括任何摻合物或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶(hyaluronidase)、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)、胰蛋白酶(trypsin)、酪蛋白酶(caseinase)、彈性蛋白酶(elastase)、木瓜酶(papain)、蛋白酶型XIV(鏈蛋白酶(pronase))、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。在其他實施例中，將腫瘤置放於腫瘤解離酶混合物中，該腫瘤解離酶混合物包括膠原蛋白酶(包括任何摻合物或類型之膠原蛋白酶)、中性蛋白酶(分散酶)及去氧核糖核酸酶I(DNA酶)。

V. 醫藥組合物、劑量及給藥方案

【1502】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增及/或遺傳修飾的TIL、MIL或PBL(包括遺傳修飾以表現

CCR之TIL、MIL或PBL)作為醫藥組合物投與患者。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投與。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

【1503】可投與任何適合劑量之TIL。在一些實施例中，投與約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，特別係在癌症為NSCLC或黑色素瘤之情況下。在一些實施例中，投與約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，特別係在癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，特別係在癌症為NSCLC。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例

中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【1504】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1505】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度小於例如醫藥組合物之100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、

8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1506】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度大於醫藥組合物之90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、

0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1507】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1508】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物之約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1509】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15

g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【1510】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【1511】提供於本發明之醫藥組合物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投與途徑、化合物投與形式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投與之醫藥組合物的量，諸如TIL

之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投與速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判斷而定。

【1512】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投與。此類投與可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投與。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投與可視需要而繼續。

【1513】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，TIL之有效劑量在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至$1\times$

10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1514】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg之範圍內。

【1515】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98

mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【1516】有效量之TIL可藉由投與具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包括鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投與。

【1517】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包含如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體。

【1518】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包含如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及醫藥學上可接受之載劑。

【1519】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包含如上在任何前述段落中描述的TIL組合物。

【1520】在其他實施例中，本發明提供一種如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體的冷凍保存製劑。

【1521】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包含如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及冷凍保存培養基。

【1522】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的TIL組合物，其中冷凍保存培養基含有DMSO。

【1523】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

任何前述段落中描述的TIL組合物，其中冷凍保存培養基含有7%至10% DMSO。

【1524】在其他實施例中，本發明提供一種如上在任何前述段落中描述的TIL組合物的冷凍保存製劑。

【1525】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組合物之形式向患者投與。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投與。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

【1526】可投與任何適合劑量之TIL。在一些實施例中，投與約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，特別係在癌症為NSCLC之情況下。在一些實施例中，投與約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，特別係癌症為NSCLC。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約12×10^{10}個

TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【1527】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1528】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合

物中的TIL之濃度小於例如醫藥組合物之100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1529】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度大於醫藥組合物之90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、

1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【1530】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1531】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物之約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【1532】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0

g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【1533】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【1534】提供於本發明之醫藥組合物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投與途徑、化合物投與形

式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投與之醫藥組合物的量，諸如TIL之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投與速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判斷而定。

【1535】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投與。此類投與可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投與。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投與可視需要而繼續。

【1536】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，TIL

之有效劑量在1×10^6至5×10^6、5×10^6至1×10^7、1×10^7至5×10^7、5×10^7至1×10^8、1×10^8至5×10^8、5×10^8至1×10^9、1×10^9至5×10^9、5×10^9至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【1537】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg之範圍內。

【1538】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至

約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【1539】有效量之TIL可藉由投與具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包括鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投與。

VI. 治療患者之方法

【1540】治療方法始於原始TIL收集及TIL培養。此類方法均已描述於例如以全文引用之方式併入本文中的Jin等人，《免疫療法雜誌》，**2012**, 35(3):283-292之領域中。下文貫穿各個部分，包括實例，描述了治療方法之實施例。

【1541】發現根據本文所描述之方法，包括例如如上文步驟A至F中所描述或根據上文步驟A至F(亦如例如圖1及/或圖8中所示)而產生的擴增TIL在治療癌症患者方面的特殊用途(例如，如以全文引用之方式併入本文中的Goff等人，《臨床腫瘤學雜誌》，**2016**, 34(20):2389-239以及補充內容中所描述)。在一些實施例中，如先前描述自經切

除轉移性黑色素瘤寄存物生長TIL(參見以全文引用之方式併入本文中的Dudley等人，《免疫療法雜誌》，**2003**, 26:332-342)。可在無菌條件下分割新鮮腫瘤。可收集代表樣本以用於正式病理分析。可使用2 mm^3至3 mm^3之單個碎片。在一些實施例中，自每位患者獲得5、10、15、20、25或30個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得20、25或30個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得20、22、24、26或28個樣本。在一些實施例中，自每位患者獲得24個樣本。可將樣本置於24孔盤之個別孔中，維持於含高劑量IL-2(6,000 IU/mL)之生長培養基中，並監測腫瘤破壞及/或TIL增殖。如本文所描述，可將在處理後剩餘活細胞之任何腫瘤酶碎解成單細胞懸浮液並冷凍保存。

【1542】在一些實施例中，可對成功生長之TIL進行取樣以用於表型分析(CD3、CD4、CD8及CD56)，並在可用時針對自體腫瘤進行測試。若隔夜共培養產生之干擾素-γ(IFN-γ)含量> 200 pg/mL且為背景之兩倍，則可認為TIL具反應性。(Goff等人，《免疫療法雜誌》，**2010**, 33:840-847；以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，可選擇已證明具自體反應性或充足生長模式的培養物用於第二擴增(例如根據圖1及/或圖8之步驟D中所提供之第二擴增，包括有時稱作快速擴增(REP)的第二擴增)。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如在第二擴增期間高度增殖)的經擴增TIL用於另外的第二擴增。在一些實施例中，選擇具高自體反應性(例如在如圖1及/或圖8之步驟

D中所提供之第二擴增期間高度增殖)的TIL用於根據圖1及/或圖8之步驟D的另外之第二擴增。

【1543】可藉由針對表面標誌CD3、CD4、CD8、CCR7及CD45RA之流動式細胞測量術(例如FlowJo)(碧迪生物科學)以及藉由本文所描述之任一種方法分析輸注袋TIL之冷凍保存樣本之細胞表型。藉由使用標準酶聯免疫吸附分析技術量測血清細胞介素。血清IFN-g之升高定義為>100 pg/mL及大於43之基線水準。

【1544】在一些實施例中，藉由本文所提供之方法，例如圖1及/或圖8中例示之方法產生的TIL獲得對TIL之臨床功效的驚人改善。在一些實施例中，相較於藉由除本文所描述方法外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中例示之方法外的方法)產生的TIL，藉由本文所提供之方法，例如圖1及/或圖8中例示之方法產生的TIL展現增加之臨床功效。在一些實施例中，除本文所描述之方法外的方法包括稱作過程1C及/或第1代(Gen 1)之方法。在一些實施例中，藉由DCR、ORR及/或其他臨床反應量測增加之功效。在一些實施例中，相較於藉由除本文所描述方法外之方法(包括例如除圖1及/或圖8例示之方法外的方法)產生的TIL，藉由本文所提供之方法，例如圖1中例示之方法產生的TIL展現類似反應時間及安全性概況。

【1545】在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對

IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本發明方法製備之TIL治療的個體之血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的

方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法製備的TIL治療的個體之離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法製備的TIL治療的個體之血液中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法製備的TIL治療的個體之TIL血清中之IFN-γ。在一些實施例中，IFN-γ(IFN-gamma)指示在治療腫瘤中的治療功效及/或增加之臨床功效。

【1546】在一些實施例中，藉由本發明之方法製備之TIL，包括如例如圖1中所描述之彼等TIL。在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本發明方法製備之TIL治療的個體之血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除

體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍IFN-γ。

【1547】在一些實施例中，藉由本發明之方法(包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL，相較於藉由其他方法(包括未在圖1及/或圖8中例示之方法，包括例如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL展現增加的多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投與藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加十

倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加1000倍。

【1548】功效之量度可包括疾病控制率(DCR)以及總反應率(ORR)，如本領域已知以及本文所描述。

A. 治療癌症之方法

【1549】本文所描述之組合物及方法可用於一種治療疾病之方法中。在一些實施例中，其用於治療成人患者或兒科患者中之過度增殖性病症，諸如癌症。其亦可用於治療如本文及以下段落中所描述之其他病症。

【1550】在一些實施例中，過度增殖性病症為癌症。在一些實施例中，過度增殖性病症為實體腫瘤癌症。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母

細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。

【1551】在一些實施例中，過度增殖性病症為血液惡性病。在一些實施例中，血液科惡性疾病係選自由以下組成之群組：慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞白血病、彌漫性大B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、被套細胞淋巴瘤及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，本發明包括治療患有癌症之患者之方法，其中該癌症為血液惡性病。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症係血液惡性病。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該癌

症係血液惡性病。

【1552】在一些實施例中，癌症為前述癌症中之一者，包括實體腫瘤癌症及血液惡性病，其對於用至少一種先前療法(包括化學療法、放射療法或免疫療法)治療為復發性或難治性的。在一些實施例中，癌症對用至少兩種先前療法(包括化學療法、放射療法及/或免疫療法)治療為復發性或難治性的前述癌症之一。在一些實施例中，癌症對用至少三種先前療法(包括化學療法、放射療法及/或免疫療法)治療為復發性或難治性的前述癌症之一。

【1553】在一些實施例中，癌症為高微隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷型癌症。MSI-H及dMMR癌症及其檢測已描述於Kawakami等人，《當前腫瘤學之治療選擇(*Curr. Treat. Options Oncol.*)》**2015,** *16,* 30中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1554】在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該患者係人類。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該患者係非人類。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該患者係伴侶動物。

【1555】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用BRAF抑制劑及/或

MEK抑制劑治療。在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用選自由以下組成之群組的BRAF抑制劑治療：維羅非尼、達拉非尼、恩拉非尼、索拉非尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用選自由以下組成之群組的MEK抑制劑治療：曲美替尼、考比替尼、貝美替尼、司美替尼、匹馬色替尼、瑞法替尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用選自由以下組成之群組的BRAF抑制劑治療：維羅非尼、達拉非尼、恩拉非尼、索拉非尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物；且難以用選自由以下組成之群組的MEK抑制劑治療：曲美替尼、考比替尼、貝美替尼、司美替尼、匹馬色替尼、瑞法替尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

【1556】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症係兒科癌症。

【1557】在一些實施例中，本發明一種包括治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症係葡萄膜黑色素瘤。

【1558】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該葡萄膜黑色素瘤係脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤。

【1559】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該兒科癌症係神經母細胞瘤。

【1560】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該兒科癌症係肉瘤。

【1561】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該肉瘤係骨肉瘤。

【1562】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該肉瘤係軟組織肉瘤。

【1563】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者之方法，其中該軟組織肉瘤係橫紋肌肉瘤、尤文氏肉瘤或原始神經外胚層腫瘤(PNET)。

【1564】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該兒科癌症係中樞神經系統(CNS)相關癌症。在一些實施例中，兒科癌症難以用化學療法治療。在一些實施例中，兒科癌症難以用放射療法治療。在一些實施例中，兒科癌症難以用地努圖希單抗(dinutuximab)治療。

【1565】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者之方法，其中該CNS相關癌症為神經管胚細胞瘤、松果體母細胞瘤、神經膠質瘤、室管膜瘤或神經膠母細胞瘤。

【1566】本文中所描述之組合物及方法可用於治療癌症之方法，其中癌症難以用抗PD-1或抗PD-L1抗體治療或對先前治療具有抗性。在一些實施例中，患者係抗PD-1或抗PD-L1抗體的原發性難治性患者。在一些實施例中，患者未展示出對抗PD-1或抗PD-L1抗體的先前反應。在一些

實施例中，患者展示出對抗PD-1或抗PD-L1抗體的先前反應，隨後患者之癌症進展。在一些實施例中，癌症難以用抗CTLA-4抗體及/或抗PD-1或抗PD-L1抗體與至少一種化學治療劑之組合治療。在一些實施例中，先前化學治療劑為卡鉑、太平洋紫杉醇、培美曲塞(pemetrexed)及/或順鉑。在一些先前實施例中，化學治療劑係鉑雙重化學治療劑。在一些實施例中，鉑雙重療法包含選自由順鉑及卡鉑組成之群組之第一化學治療劑，及選自由長春瑞濱、吉西他濱及紫杉烷(包括例如太平洋紫杉醇、多西他賽或nab-太平洋紫杉醇)組成之群組之第二化學治療劑。在一些實施例中，鉑雙重化學治療劑與培美曲塞組合。

【1567】在一些實施例中，NSCLC為PD-L1陰性及/或來自患有表現PD-L1且腫瘤比例評分(TPS)<1%之癌症的患者，如本文別處所描述。

【1568】在一些實施例中，NSCLC難以用包含抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體及鉑雙重療法之組合療法治療，其中該鉑雙重療法包含：

i)第一化學治療劑，其選自由順鉑及卡鉑組成之群組，

ii)及第二化學治療劑，其選自由以下組成之群組：長春瑞濱、吉西他濱及紫杉烷(包括例如太平洋紫杉醇、多西他賽或nab-太平洋紫杉醇)。

【1569】在一些實施例中，NSCLC難以用包含抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體、培美曲塞及鉑雙重療法之組合療法

治療，其中該鉑雙重療法包含：

i)第一化學治療劑，其選自由順鉑及卡鉑組成之群組，

ii)及第二化學治療劑，其選自由以下組成之群組：長春瑞濱、吉西他濱及紫杉烷(包括例如太平洋紫杉醇、多西他賽或nab-太平洋紫杉醇)。

【1570】在一些實施例中，NSCLC已用抗PD-1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC已用抗PD-L1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC患者尚未接受治療。在一些實施例中，NSCLC尚未用抗PD-1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC尚未用抗PD-L1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC先前已用化學治療治療。在一些實施例中，NSCLC先前已用化學治療劑治療，但目前不再用該化學治療劑治療。在一些實施例中，NSCLC患者未使用過抗PD-1/PD-L1。在一些實施例中，NSCLC患者具有低PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者未經NSCLC治療或為化學療法後治療，但未經PD-1/PD-L1治療。在一些實施例中，NSCLC患者未經治療或接受化學治療劑治療後但未經抗PD-1/PD-L1治療且具有低PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者在基線時患有大塊疾病。在一些實施例中，個體在基線時患有大塊疾病且具有低PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者無可偵測之PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者未經治療或接受化學治療劑治療後但未經抗PD-1/PD-L1治療且無可偵測之PD-L1表現。在一些實

施例中，患者在基線時患有大塊疾病且無可偵測之PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者具有未經治療的NSCLC或接受化療後(例如化學治療劑後)但未經抗PD-1/PD-L1治療，且該患者具有低PD-L1表現及/或在基線時具有大塊疾病。在一些實施例中，當在橫向或冠狀面中量測的最大腫瘤直徑大於7 cm時指示為大塊疾病。在一些實施例中，當存在具有20 mm或更大的短軸直徑的腫脹淋巴結時指示為大塊疾病。在一些實施例中，化學治療劑包括NSCLC的標準護理治療劑。

【1571】在一些實施例中，藉由腫瘤比例評分確定PD-L1表現。在一些實施例中，患有難治性NSCLC腫瘤之個體具有<1%的腫瘤比例評分(TPS)。在一些實施例中，患有難治性NSCLC腫瘤之個體具有≥1%的TPS。在一些實施例中，患有難治性NSCLC之個體先前已用抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有難治性NSCLC之個體先前已用抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。

【1572】在一些實施例中，藉由本發明之方法(包括如例如圖1或圖8中所描述之彼等方法)製備之TIL，相較於藉由其他方法(包括未在圖1或圖8中例示之彼等方法，包括諸如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL展現增加的多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示對癌症治療之治療功效及/或增加之臨床功效。

在一些實施例中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投與藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之

TIL治療之患者，多株性增加1000倍。

【1573】在一些實施例中，使用如本文所描述之一或多種測試方法藉由腫瘤比例評分確定PD-L1表現。在一些實施例中，患有NSCLC腫瘤之個體或患者具有<1%的腫瘤比例評分(TPS)。在一些實施例中，NSCLC腫瘤具有≥1%的TPS。在一些實施例中，患有NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療且在抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC腫瘤之個體或患者具有<1%的腫瘤比例評分(TPS)。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC腫瘤之個體或患者具有≥1%的TPS。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療且在抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。

【1574】在一些實施例中，NSCLC係展現出腫瘤比例評分(TPS)之NSCLC，或在抗PD-1或抗PD-L1療法之前自患者獲取的活腫瘤細胞的百分比，在任何強度下顯示部分或完全膜染色的PD-L1蛋白的百分比低於1%(TPS<1%)。在一些實施例中，NSCLC為展現TPS之NSCLC，TPS選自由

以下組成之群組：<50%、<45%、<40%、<35%、<30%、<25%、<20%、<15%、<10%、<9%、<8%、<7%、<6%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%、<0.9%、<0.8%、<0.7%、<0.6%、<0.5%、<0.4%、<0.3%、<0.2%、<0.1%、<0.09%、<0.08%、<0.07%、<0.06%、<0.05%、<0.04%、<0.03%、<0.02%及<0.01%。在一些實施例中，NSCLC為展現TPS之NSCLC，TPS選自由以下組成之群組：約50%、約45%、約40%、約35%、約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%、約0.9%、約0.8%、約0.7%、約0.6%、約0.5%、約0.4%、約0.3%、約0.2%、約0.1%、約0.09%、約0.08%、約0.07%、約0.06%、約0.05%、約0.04%、約0.03%、約0.02%及約0.01%。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與1%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.9%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.8%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.7%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.6%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.5%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.4%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.3%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%與0.2%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係展現出0%

與0.1%之間的TPS的NSCLC。TPS可藉由此項技術中已知之方法量測，諸如描述於Hirsch等人,《胸腫瘤學期刊(J. Thorac. Oncol.)》》**2017,** *12*, 208-222中之彼等方法或用於在使用帕博利珠單抗或其他抗PD-1或抗PD-L1療法治療前測定TPS之彼等方法。亦可使用經美國食品藥物管理局批准之用於量測TPS的方法。在一些實施例中，PD-L1係外泌體PD-L1。在一些實施例中，在循環腫瘤細胞上發現PD-L1。

【1575】在一些實施例中，部分膜染色包括1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。在一些實施例中，完整膜染色包括大致100%膜染色。

【1576】在一些實施例中，測試PD-L1可涉及量測患者血清中PD-L1之含量。在此等實施例中，患者血清中PD-L1之量測移除腫瘤異質性之不確定性及患者進行連續活體組織切片之不適。

【1577】在一些實施例中，相較於基線或標準水準升高之可溶性PD-L1與NSCLC之惡化的預後相關。參見例如Okuma等人，《臨床肺癌(*Clinical Lung Cancer*)》, **2018**, *19*, 410-417；Vecchiarelli等人，《腫瘤標靶(*Oncotarget*)》, **2018**, *9*, 17554-17563。在一些實施例中，PD-L1係外泌體PD-L1。在一些實施例中，PD-L1在循環腫瘤細胞上表現。

【1578】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之個體或患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該個體或患者具有以下中之至少一者：

i. PD-L1之預定腫瘤比例評分(TPS)<1%，

ii. PD-L1之TPS分數為1%-49%，或

iii. 一或多個驅動突變之預定缺失，

其中驅動突變選自由以下組成之群組：EGFR突變、EGFR插入、EGFR外顯子20突變、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變、RET融合、ERBB2突變、ERBB2擴增、BRCA突變、MAP2K1突變、PIK3CA、CDKN2A、PTEN突變、UMD突變、NRAS突變、KRAS突變、NF1突變、MET突變、MET剪接及/或改變之MET信號、TP53突變、CREBBP突變、KMT2C突變、KMT2D突變、ARID1A突變、RB1突變、ATM突變、SETD2突變、FLT3突變、PTPN11突變、FGFR1突變、EP300突變、MYC突變、EZH2突變、JAK2突變、FBXW7突變、CCND3突變及GNA11突變，其中該方法包含：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群

體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；及

(h) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【1579】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫

瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅動突變選自由以下組成之群組：EGFR突變、EGFR插入、EGFR外顯子20突變、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變、RET融合、ERBB2突變、ERBB2擴增、BRCA突變、MAP2K1突變、PIK3CA、CDKN2A、PTEN突變、UMD突變、NRAS突變、KRAS突變、NF1突變、MET突變、MET剪接及/或改變之MET信號、TP53突變、CREBBP突變、KMT2C突變、KMT2D突變、ARID1A突變、RB1突變、ATM突變、SETD2突變、FLT3突變、PTPN11突變、FGFR1突變、EP300突變、MYC突變、EZH2突變、JAK2突變、FBXW7突變、CCND3突變及GNA11突變，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分為約1%至約49%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該

第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(h) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(j) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；及

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【1580】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例

評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅動突變選自由以下組成之群組：EGFR突變、EGFR插入、EGFR外顯子20突變、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變、RET融合、ERBB2突變、ERBB2擴增、BRCA突變、MAP2K1突變、PIK3CA、CDKN2A、PTEN突變、UMD突變、NRAS突變、KRAS突變、NF1突變、MET突變、MET剪接及/或改變之MET信號、TP53突變、CREBBP突變、KMT2C突變、KMT2D突變、ARID1A突變、RB1突變、ATM突變、SETD2突變、FLT3突變、PTPN11突變、FGFR1突變、EP300突變、MYC突變、EZH2突變、JAK2突變、FBXW7突變、CCND3突變及GNA11突變，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分小於約1%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不打開該系統的情況下發

生；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(h) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(j) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；及

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【1581】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅

動突變選自由以下組成之群組：EGFR突變、EGFR插入、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變或RET融合，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分為約1%至約49%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(h) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發

生；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(j) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；及

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【1582】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅動突變選自由以下組成之群組：EGFR突變、EGFR插入、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變或RET融合，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分小於約1%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成多個腫瘤碎片而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群

體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(h) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(j) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；及

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【1583】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效劑

量之本文所描述之治療性TIL群體。

【1584】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之本文所描述之TIL組合物。

【1585】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中在分別投與治療有效劑量之本文所描述之治療性TIL群體及TIL組合物之前，已向個體投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1586】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【1587】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，該方法進一步包含在向個體投與TIL細胞之後當天開始用高劑量IL-2方案治療個體的步驟。

【1588】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1589】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為實體腫瘤。

【1590】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【1591】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【1592】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤。

【1593】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為HNSCC。

【1594】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為子宮頸癌。

【1595】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為NSCLC。

【1596】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為神

經膠母細胞瘤(包括GBM)。

【1597】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為胃腸癌。

【1598】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為高突變癌症。

【1599】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為兒科高突變癌症。

【1600】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法中的本文所描述之治療性TIL群體，其包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【1601】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法中的本文所描述之TIL組合物，其包含向該個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【1602】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或本文所描述之TIL組合物，其中在投與治療有效劑量之本文所描述之治療性TIL群體或本文所描述之TIL組合物之前，已向個體投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1603】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中非骨髓清除式

淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【1604】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其進一步包含在向患者投與TIL細胞之後當天開始用高劑量IL-2方案治療患者的步驟。

【1605】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1606】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為實體腫瘤。

【1607】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【1608】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【1609】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤。

【1610】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為HNSCC。

【1611】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為子宮頸癌。

【1612】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為NSCLC。

【1613】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為神經膠母細胞瘤。

【1614】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為胃腸癌。

【1615】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為高突變癌症。

【1616】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為兒科高突變癌症。

【1617】在其他實施例中，本發明提供本文所描述之治療性TIL群體在治療個體之癌症之方法中的用途，其包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【1618】在其他實施例中，本發明提供任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向該個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【1619】在其他實施例中，本發明提供本文所描述之治療性TIL群體或本文所描述之TIL組合物在治療患者之癌症之方法中的用途，該方法包含向患者投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案，且隨後向個體投與治療有效劑量之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量之本文所描述之TIL組合物。

1. 與PD-1及PD-L1抑制劑之組合

【1620】在一些實施例中，提供給患有癌症之患者的TIL療法可包括單獨用TIL之治療性群體治療或可包括組合治療，該組合治療包括TIL及一或多種PD-1及/或PD-L1抑制劑。

【1621】計劃性死亡1(PD-1)為由T細胞、B細胞、自然殺手(NK)T細胞、活化單核球及樹突狀細胞表現之288胺基酸跨膜免疫檢查點受體蛋白。PD-1，亦稱為CD279，屬於CD28家族，且在人類中係由2號染色體上之Pdcd1基因編碼。PD-1由一個免疫球蛋白(Ig)超家族域、跨膜區及細胞內域組成，該細胞內域含有免疫受體酪胺酸抑制模體

(ITIM)及免疫受體酪胺酸切換模體(ITSM)。已知PD-1及其配體(PD-L1及PD-L2)在免疫耐受性中起重要作用，如Keir等人，《免疫學年度評論》**2008**, *26*, 677-704中所描述。PD-1提供負向調節T細胞免疫反應的抑制信號。PD-L1(亦稱為B7-H1或CD274)及PD-L2(亦稱為B7-DC或CD273)表現於腫瘤細胞及基質細胞上，其可能遇到表現PD-1之活化T細胞，導致對T細胞之免疫抑制。PD-L1為由人類9號染色體上之Cd274基因編碼的290胺基酸跨膜蛋白。使用PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑及/或PD-L2抑制劑阻斷PD-1與其配體PD-L1及PD-L2之間的相互作用，可克服免疫抗性，如近期臨床研究，諸如Topalian等人，《新英格蘭醫學雜誌(N. Eng. J. Med.)》 **2012**, *366*, 2443-54中所描述之研究所顯示。PD-L1表現於許多腫瘤細胞株上，而PD-L2表現於主要地表現於樹突狀細胞及一些腫瘤株上。除T細胞(其在活化後誘導性表現PD-1)以外，PD-1亦表現於B細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、活化單核球及樹突狀細胞上。

【1622】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1

抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包

括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1623】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種

PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1624】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可

與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1625】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組

合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1626】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個

體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施

例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1627】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒

性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1628】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1629】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮

頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1630】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個

體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食

道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1631】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供

如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1632】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於

治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1633】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例

中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合，而無需進一步與一或多種CTLA抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1634】在一些實施例中，TIL及PD-1抑制劑係作為用於治療NSCLC之組合療法或協同療法投與。

【1635】在一些實施例中，NSCLC尚未經歷先前療法。在一些實施例中，將PD-1抑制劑作為一線療法或初始療法投與。在一些實施例中，將PD-1抑制劑作為一線療法或初始療法與如本文所描述之TIL組合投與。

【1636】在一些實施例中，PD-1抑制劑可為本領域已知的任何PD-1抑制劑或PD-1阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-1抑制劑或阻斷劑之一。關於PD-1

抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-1抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變異體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-1抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1637】在一些實施例中，PD-1抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包括其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-1抑制劑為多株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。在一些實施例中，抗體競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。

【1638】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約30 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約20 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約10 pM或更低之KD結合人類PD-1，或以約1 pM或更低之KD結合人類PD-1。

【1639】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合

至人類PD-1、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1，或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-1。

【1640】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1，或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1。

【1641】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約10 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、

以約6 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【1642】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗(可自百時美施貴寶公司以OPDIVO商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變異體。納武單抗為阻斷PD-1受體之完全人類IgG4抗體。在一些實施例中，抗PD-1抗體為免疫球蛋白G4κ抗(人類CD274)抗體。納武單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號946414-94-4且亦稱為5C4、BMS-936558、MDX-1106及ONO-4538。納武單抗之製備及特性描述於美國專利第8,008,449號及國際專利公開案第WO 2006/121168號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效已描述於Wang等人，《癌症免疫學研究(*Cancer Immunol Res.*)》**2014,** *2,* 846-56；Page等人，《醫學年評(*Ann. Rev. Med.*)》，**2014,** *65,* 185-202；及Weber等人，《臨床腫瘤學雜誌》，**2013,** *31,* 4311-4318中，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗之胺基酸序

列闡述於表18中。納武單抗在22-96、140-196、254-314、360-418、22''-96''、140''-196''、254''-314''及360''-418''處具有重鏈內雙硫鍵；在23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處具有輕鏈內雙硫鍵；在127-214'、127''-214'''處具有重鏈-輕鏈間雙硫鍵；在219-219''及222-222''處具有重鏈-重鏈間雙硫鍵；且在290、290''處具有N-糖基化位點(H CH2 84.4)。

【1643】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含SEQ ID NO:158所載之重鏈及SEQ ID NO:159所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1644】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含納武單抗

之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:160中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:161中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1645】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:163及SEQ ID NO:164中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166及SEQ ID NO:167中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1646】在一些實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機

構參考納武單抗核准之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。

表 18. 參考納武單抗之 PD-1 抑制劑的胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:158 納武單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 440
SEQ ID NO:159 納武單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:160 納武單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
SEQ ID NO:161 納武單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:162 納武單抗重鏈 CDR1	NSGMH	5
SEQ ID NO:163 納武單抗重鏈 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID NO:164 納武單抗重鏈 CDR3	NDDY	4
SEQ ID NO:165 納武單抗輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:166 納武單抗輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:167 納武單抗輕鏈 CDR3	QQSSNWPRT	9

【1647】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投

與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1648】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1649】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與納武單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，

亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1650】在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每2週以約240 mg進行投與。在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每4週以約480 mg進行投與。在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每3週於同一天投與約1 mg/kg納武單抗，然後投與3 mg/kg伊匹木單抗，持續4次劑量，隨後每2週投與240 mg或每4週投與480 mg納武單抗。

【1651】在一些實施例中，投與納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1652】在一些實施例中，投與納武單抗以治療轉移

性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投與納武單抗且每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每3週以約360 mg投與納武單抗，加上每6週1 mg/kg伊匹木單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg或每4週以480 mg投與納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1653】在一些實施例中，投與納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1654】在一些實施例中，每3週以約360 mg投與納武單抗且每6週投與1 mg/kg伊匹木單抗，以治療惡性胸膜

間皮瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1655】在一些實施例中，投與納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，然後每3週在同一天以約1 mg/kg投與伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與240 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，然後每3週在同一天以約1 mg/kg投與伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與240 mg、每4週投與480 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1656】在一些實施例中，投與納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1657】在一些實施例中，投與納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1658】在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施

例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1659】在一些實施例中，投與納武單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，投與納武單抗以治療成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1660】在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投與納武單抗以治療<40 kg之小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，然後每3週在同一天投與1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與240 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，然後每3週在同一天投與1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投與480 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1661】在一些實施例中，投與納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投與納武單抗，然後每3週在同一天投與3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與納武單抗240 mg，以

治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投與納武單抗，然後每3週在同一天投與3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投與480 mg納武單抗，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1662】在一些實施例中，投與納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與納武單抗。

【1663】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含帕博利珠單抗(可自美國新澤西州凱尼爾沃思之默克公司以KEYTRUDA商購)或抗原結合片段、結合物或變異體。帕博利珠單抗經指派CAS登記號1374853-91-4且亦稱為蘭立

珠單抗、MK-3475及SCH-900475。帕博利珠單抗具有免疫球蛋白G4抗(人類蛋白PDCD1(計劃性細胞死亡1))抗體，含(人類家鼷鼠單株重鏈)雙硫鍵與人類家鼷鼠單株輕鏈二聚體結構。帕博利珠單抗之結構亦可描述為免疫球蛋白G4抗(人類計劃性細胞死亡1)抗體；含人源化小鼠單株[228-L-脯胺酸(H10-S>P)]γ4重鏈(134-218')雙硫鍵與人源化小鼠單株κ輕鏈二聚體(226-226'':229-229'')雙二硫鍵。帕博利珠單抗之特性、用途及製備描述於國際專利公開案第WO 2008/156712 A1號、美國專利第8,354,509號以及美國專利申請公開案第US 2010/0266617 A1號、第US 2013/0108651 A1號及第US 2013/0109843 A2號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。帕博利珠單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效描述於Fuerst, 《腫瘤學時報(*Oncology Times*)》, **2014,** *36*, 35-36；Robert等人, 《柳葉刀(*Lancet*)》, **2014**, 384, 1109-17；及Thomas等人, 《生物治療專家意見(*Exp. Opin. Biol. Ther.*)》, **2014**, *14*, 1061-1064中。帕博利珠單抗之胺基酸序列闡述於表19中。帕博利珠單抗包括以下雙硫鍵：22-96、22''-96''、23'-92'、23'''-92'''、134-218'、134''-218'''、138'-198'、138'''-198'''、147-203、147''-203''、226-226''、229-229''、261-321、261''-321''、367-425及367''-425''；以及以下糖基化位點(N)：Asn-297及Asn-297''。帕博利珠單抗為在Fc區中含穩定化S228P突變的IgG4/κ同型；IgG4鉸鏈區中此突變之插入防止形成IgG4抗體通常觀測到之半分子。帕博利珠

單抗在各重鏈之Fc域內於Asn297處異質糖基化，使得完整抗體之分子量為大約149 kDa。帕博利珠單抗之主要糖型為岩藻糖基化去半乳糖基雙線聚糖形式(G0F)。

【1664】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含SEQ ID NO:168所載之重鏈及SEQ ID NO:169所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1665】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含帕博利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:170中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:171中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，

PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1666】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:174中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176及SEQ ID NO:177中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1667】在一些實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構參考帕博利珠單抗核准之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一

致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。

表 19. 參考帕博利珠單抗之 PD-1 抑制劑的胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:168 帕博利珠單抗重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 447
SEQ ID NO:169 帕博利珠單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	60 120 180 218
SEQ ID NO:170 帕博利珠單抗可變重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS	60 120
SEQ ID NO:171 帕博利珠單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:172 帕博利珠單抗重鏈 CDR1	NYYMY	5
SEQ ID NO:173 帕博利珠單抗重鏈 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK	16
SEQ ID NO:174 帕博利珠單抗重鏈 CDR3	RDYRFDMGFD Y	11
SEQ ID NO:175 帕博利珠單抗輕鏈 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH	15
SEQ ID NO:176 帕博利珠單抗輕鏈 CDR2	LASYLES	7
SEQ ID NO:177 帕博利珠單抗輕鏈 CDR3	QHSRDLPLT	9

【1668】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天

開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1669】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1670】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些

實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1671】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1672】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博

利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1673】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療小細胞肺癌(SCLC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1674】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或

3週投與帕博利珠單抗。

【1675】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，小兒每3週以約約2 mg/kg(至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1676】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投

與帕博利珠單抗。

【1677】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)癌。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1678】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷大腸直腸癌(dMMR)CRC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR CRC。

在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1679】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1680】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與

帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1681】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1682】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療肝細胞癌(HCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療HCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1683】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投

與帕博利珠單抗以治療默克氏細胞癌(MCC)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1684】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療腎細胞癌(RCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗且每天兩次經口投與阿西替尼(axitinib)5 mg以治療RCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或

患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1685】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗且每天一次經口投與用於非MSI-H或dMMR腫瘤之樂伐替尼(lenvatinib)20 mg以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1686】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療高腫瘤突變負荷(TMB-H)癌症。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg(至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例

中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1687】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療皮膚鱗狀細胞癌(cSCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療cSCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1688】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療三陰性乳癌(TNBC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療TNBC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1689】在一些實施例中，若患者或個體為成人，亦即治療成人適應症，則可採用另外的每6週400 mg之給藥

方案。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【1690】在一些實施例中，PD-1抑制劑為可商購抗PD-1單株抗體，諸如抗m-PD-1選殖株J43(目錄號BE0033-2)及RMP1-14(目錄號BE0146)(美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。多種可商購抗PD-1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【1691】在一些實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利第8,354,509號或美國專利申請公開案第2010/0266617 A1號、第2013/0108651 A1號、第2013/0109843 A2號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑為描述於美國專利第8,287,856號、第8,580,247號及第8,168,757號以及美國專利申請公開案第2009/0028857 A1號、第2010/0285013 A1號、第2013/0022600 A1號及第2011/0008369 A1號中之抗PD-1抗體，該等專利之教示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利第8,735,553 B1號中之抗PD-1抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑為皮

立珠單抗，亦稱為CT-011，其描述於美國專利第8,686,119號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1692】在一些實施例中，PD-1抑制劑可為小分子或肽或肽衍生物，諸如美國專利第8,907,053號、第9,096,642號及第9,044,442號以及美國專利申請公開案第US 2015/0087581號中所描述之小分子或肽或肽衍生物；1,2,4-噁二唑化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第2015/0073024號中所描述之1,2,4-噁二唑化合物及衍生物；環狀肽模擬化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0073042號中所描述之環狀肽模擬化合物及衍生物；環狀化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0125491中所描述之環狀化合物及衍生物；1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/033301號中所描述之彼等1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物；基於肽之化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/036927號及第WO 2015/04490號中所描述之基於肽之化合物及衍生物；或基於肽之巨環化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2014/0294898號中所描述之基於肽之巨環化合物及衍生物；該等專利中之每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑係西米普利單抗，其可商購自再生元公司(Regeneron, Inc.)。

【1693】在一些實施例中，TIL及PD-L1抑制劑或PD-

L2抑制劑係以用於治療NSCLC之組合療法或協同療法投與。

【1694】在一些實施例中，NSCLC尚未經歷先前療法。在一些實施例中，將PD-L1抑制劑或PD-L2抑制劑作為一線療法或初始療法投與。在一些實施例中，將PD-L1抑制劑或PD-L2抑制劑作為一線療法或初始療法與如本文所描述之TIL組合投與。

【1695】在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑可為本領域已知的任何PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑之一。關於PD-L1及PD-L2抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-L1或PD-L2抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變異體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-L1或PD-L2抑制劑時亦可指代化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1696】在一些實施例中，本文所描述之組合物、過程及方法包括PD-L1或PD-L2抑制劑。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為小分子。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包括其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為多株抗體。在一些實施例中，PD-L1

或PD-L2抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑競爭結合PD-L1或PD-L2及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。在一些實施例中，抗體競爭結合PD-L1或PD-L2，及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。

【1697】在一些實施例中，本文提供之PD-L1抑制劑對PD-L1具選擇性，因為化合物與PD-L1結合或相互作用之濃度相比其與包括PD-L2受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L1受體，該結合常數為相比結合至PD-L2受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【1698】在一些實施例中，本文提供之PD-L2抑制劑對PD-L2具選擇性，因為化合物與PD-L2結合或相互作用之濃度相比其與包括PD-L1受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L2受體，該結合常數為相比結合至PD-L1受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【1699】不受任何理論束縛，咸信腫瘤細胞表現PD-

L1，且T細胞表現PD-1。然而，腫瘤細胞對PD-L1之表現不為PD-1或PD-L1抑制劑或阻斷劑之功效所需。在一些實施例中，腫瘤細胞表現PD-L1。在其他實施例中，腫瘤細胞並不表現PD-L1。在一些實施例中，方法可包括PD-1及PD-L1抗體(諸如本文所描述之PD-1及PD-L1抗體)與TIL之組合。可同時或依序投與PD-1及PD-L1抗體與TIL之組合。

【1700】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2，或以約30 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2。

【1701】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之

k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2，或以約1×10^{6} 1/M·s或更快之k_{assoc}結合至人類PD-L1及/或PD-L2。

【1702】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-L1或PD-L2、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-1、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-L1或PD-L2，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合至人類PD-L1或PD-L2。

【1703】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約10 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC50阻斷

或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC50阻斷人類PD-1或阻斷人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【1704】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為德瓦魯單抗，亦稱為MEDI4736(其可自馬里蘭州蓋瑟斯堡阿斯特捷利康製藥公司子公司Medimmune, LLC商購)或其抗原結合片段、結合物或變異體。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利第8,779,108號或美國專利申請公開案第2013/0034559號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之臨床功效已描述於Page等人，《年度醫學評論》，2014, 65, 185-202；Brahmer等人，《臨床腫瘤學雜誌》2014, 32, 5s(增刊，摘要8021)；及McDermott等人，《癌症治療評論(Cancer Treatment Rev.)》，2014, 40, 1056-64中。德瓦魯單抗之製備及特性描述於美國專利第8,779,108號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之胺基酸序列闡述於表20中。德瓦魯單抗單株抗體包括22-96、22''-96''、23'-89'、23'''-89'''、135'-195'、135'''-195'''、148-204、148''-204''、215'-224、215'''-224''、230-230''、233-233''、265-325、265''-325''、371-429及371''-429'處之雙硫鍵；及Asn-301及Asn-301''處之N-糖基化位點。

【1705】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含SEQ ID NO:178所載之重鏈及SEQ ID NO:179所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1706】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含德瓦魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:180中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:181中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及

SEQ ID NO:181中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1707】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:182、SEQ ID NO:183及SEQ ID NO:184中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:186及SEQ ID NO:187中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1708】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考德瓦魯單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，該一

或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。

表 20. 參考德瓦魯單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:178 德瓦魯單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:179 德瓦魯單抗輕鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
SEQ ID NO:180 德瓦魯單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
SEQ ID NO:181 德瓦魯單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
SEQ ID NO:182 德瓦魯單抗重鏈 CDR1	RYWMS	5
SEQ ID NO:183 德瓦魯單抗重鏈 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
SEQ ID NO:184 德瓦魯單抗重鏈 CDR3	EGGWFGELAF DY	12
SEQ ID NO:185 德瓦魯單抗輕鏈 CDR1	RASQRVSSSY LA	12
SEQ ID NO:186 德瓦魯單抗輕鏈 CDR2	DASSRAT	7
SEQ ID NO:187 德瓦魯單抗輕鏈 CDR3	QQYGSLPWT	9

【1709】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿維魯單抗，亦稱為MSB0010718C(可自默克集團/雪蘭諾商購)或其抗原結合片段、結合物或變異體。阿維魯單抗之製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿維魯單抗之胺基酸序列闡述於表21中。阿維魯單抗具有22-96、147-203、264-324、370-428、22''-96''、147''-203''、264''-324''及370''-428''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；22'-90'、138'-197'、22'''-90'''及138'''-197'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；223-215'及223''-215'''處之重鏈-

輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；229-229''及232-232''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；300、300''處之N-糖基化位點(H CH2 N84.4)；岩藻糖基化複合物雙線CHO類聚糖；及450及450'處之H CHS K2 C端離胺酸裁剪。

【1710】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含SEQ ID NO:188所載之重鏈及SEQ ID NO:189所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1711】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含阿維魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(VH)包含SEQ ID NO:190中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(VL)包含SEQ ID

NO:191中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1712】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:193及SEQ ID NO:194中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:195、SEQ ID NO:196及SEQ ID NO:197中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1713】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考阿維魯單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序

列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。

表 21. 參考阿維魯單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:188 阿維魯單抗重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:189 阿維魯單抗輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	60 120 180 216
SEQ ID NO:190 阿維魯單抗可變重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:191 阿維魯單抗可變輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
SEQ ID NO:192 阿維魯單抗重鏈 CDR1	SYIMM	5
SEQ ID NO:193 阿維魯單抗重鏈 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
SEQ ID NO:194 阿維魯單抗重鏈 CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
SEQ ID NO:195 阿維魯單抗輕鏈 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
SEQ ID NO:196 阿維魯單抗輕鏈 CDR2	DVSNRPS	7
SEQ ID NO:197 阿維魯單抗輕鏈 CDR3	SSYTSSSTRV	10

【1714】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿替利珠單抗，亦稱為MPDL3280A或RG7446(其可自瑞士巴塞爾羅氏之子公司基因泰克公司以TECENTRIQ商購)或其抗原結合片段、結合物或變異體。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利第8,217,149號中之抗體，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利申請公開案第2010/0203056 A1號、第2013/0045200 A1號、第2013/0045201 A1號、第2013/0045202 A1號或第2014/0065135 A1號中之抗體，該等專利之揭示內容特別

以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之製備及特性描述於美國專利第8,217,149號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之胺基酸序列闡述於表22中。阿替利珠單抗具有22-96、145-201、262-322、368-426、22''-96''、145''-201''、262''-322''及368''-426''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；221-214'及221''-214'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；227-227''及230-230''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；及298及298'處之N-糖基化位點(H CH2 N84.4>A)。

【1715】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含SEQ ID NO:198所載之重鏈及SEQ ID NO:199所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例

中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1716】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含阿替利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:200中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:201中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1717】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:203及SEQ ID NO:204中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206及SEQ ID NO:207中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭

以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1718】在一些實施例中，抗PD-L1抗體為藥物管理機構參考阿替利珠單抗核准之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。

表 22. 參考阿替利珠單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:198 阿替利珠單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:199 阿替利珠單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:200 阿替利珠單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA	60 118
SEQ ID NO:201 阿替利珠單抗可變輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:202 阿替利珠單抗重鏈 CDR1	GFTFSDSWIH	10
SEQ ID NO:203 阿替利珠單抗重鏈 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
SEQ ID NO:204 阿替利珠單抗重鏈 CDR3	RHWPGGFDY	9
SEQ ID NO:205 阿替利珠單抗輕鏈 CDR1	RASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:206 阿替利珠單抗輕鏈 CDR2	SASFLYS	7
SEQ ID NO:207 阿替利珠單抗輕鏈 CDR3	QQYLYHPAT	9

【1719】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中所描述之彼等抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，亦包括與此等抗體中之任一種競爭結合至PD-L1的抗體。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為MDX-1105，亦稱為BMS-935559，其揭示於美國專利第US 7,943,743號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗PD-L1抗體係選自揭示於美國專利第US 7,943,743號中之抗PD-L1抗體，該專利以引用之方式併入本文中。

【1720】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為可商購單株抗體，諸如INVIVOMAB抗m-PD-L1選殖株10F.9G2(目錄號BE0101，美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為可商購單株抗體，諸如AFFYMETRIX EBIOSCIENCE(MIH1)。多種可商購抗PD-L1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【1721】在一些實施例中，PD-L2抑制劑為可商購單株抗體，諸如BIOLEGEND 24F.10C12小鼠IgG2aκ同型(目錄號329602，加利福尼亞聖地亞哥Biolegend, Inc.)、SIGMA抗PD-L2抗體(目錄號SAB3500395，密蘇里州聖路易斯西格瑪奧瑞奇公司)或本領域一般熟習此項技術者已知的其他可商購抗PD-L2抗體。

2. 與CTLA-4抑制劑之組合

【1722】在一些實施例中，提供給患有癌症之患者的TIL療法可包括單獨用TIL之治療性群體治療或可包括組合治療，該組合治療包括TIL及一或多種CTLA-4抑制劑。

【1723】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。

【1724】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL

可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素

瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1725】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。

【1726】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一

或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1727】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。

【1728】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫

檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1729】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑組合投與，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。

【1730】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL可與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合投與以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1731】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL

與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症。

【1732】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺

癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1733】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤。

【1734】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL

與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1735】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC。

【1736】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一

些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1737】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌。

【1738】在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治

療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1739】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之癌症的用途。

【1740】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之癌症的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體

1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群組：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起的癌症(HPV)、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1741】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。

【1742】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之黑色素瘤的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1743】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如

本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。

【1744】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之HNSCC的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1745】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑組合，而無需進一步與一或多種PD-1抑制劑及/或一或多種PD-L1抑制劑組合，以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。

【1746】在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所描述產生之TIL與一或多種CTLA-4抑制劑及一或多種PD-1抑制劑及一或多種PD-L1抑制劑組合以用於治療患者或個體之子宮頸癌的用途。在一些實施例中，患者或個體先前未經一或多種免疫檢查點抑制劑治療；換言之，患者或個體為未使用過免疫檢查點抑制劑之患者或個體。在一些實施例中，免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群組：計劃性細胞死亡-1(PD-1)抑制劑、計劃性細胞死亡-配體1(PD-L1)抑制劑、細胞毒性T淋巴球相關蛋白4(CTLA-4)抑制劑及其組合。

【1747】細胞毒性T淋巴球抗原4(CTLA-4)為免疫球蛋白超家族成員且表現於輔助T細胞表面上。CTLA-4為CD28依賴性T細胞活化之負向調節因子且充當適應性免疫反應之檢查點。類似於T細胞共刺激蛋白CD28，CTLA-4結合抗原在細胞上呈遞CD80及CD86。CTLA-4將抑制因子信號遞送至T細胞，而CD28遞送刺激信號。針對人類CTLA-4之人類抗體已描述為許多疾病病狀之免疫刺激調節劑，諸如治療或預防病毒及細菌感染且治療癌症(WO 01/14424及WO 00/37504)。已在臨床試驗中研究多種完全

人類抗人類CTLA-4單株抗體(mAb)，用於治療各種類型的實體腫瘤，該等抗體包括但不限於伊匹木單抗(MDX-010)及曲美單抗(CP-675,206)。

【1748】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑可為本領域已知的任何CTLA-4抑制劑或CTLA-4阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的CTLA-4抑制劑或阻斷劑之一。關於CTLA-4抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之CTLA-4抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變異體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及CTLA-4抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【1749】適用於本發明之方法的CTLA-4抑制劑包括但不限於抗CTLA-4抗體、人類抗CTLA-4抗體、小鼠抗CTLA-4抗體、哺乳動物抗CTLA-4抗體、人源化抗CTLA-4抗體、單株抗CTLA-4抗體、多株抗CTLA-4抗體、嵌合抗CTLA-4抗體、MDX-010(伊匹木單抗)、曲美單抗、抗CD28抗體、抗CTLA-4阿德奈汀、抗CTLA-4域抗體、單鏈抗CTLA-4片段、重鏈抗CTLA-4片段、輕鏈抗CTLA-4片段、促效共刺激路徑之CTLA-4抑制劑、揭示於PCT公開案第WO 2001/014424號中之抗體、揭示於PCT公開案第WO 2004/035607號中之抗體、揭示於美國公開案第2005/0201994號中之抗體及揭示於授與歐洲專利第EP 1212422

B1號中之抗體，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。另外的CTLA-4抗體描述於美國專利第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號中；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號中；及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號中，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。可用於本發明方法中之其他抗CTLA-4抗體包括例如揭示於以下中之抗體：WO 98/42752；美國專利第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，95(17):10067-10071 (1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》，22(145): 摘要號2505 (2004)(抗體CP-675206)；Mokyr等人，《癌症研究》，58:5301-5304 (1998)；及美國專利第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1750】另外的CTLA-4抑制劑包括但不限於以下：通常由於經活化而能夠破壞CD28抗原結合至其同源配體之能力、抑制CTLA-4結合至其同源配體之能力、增強經由共刺激路徑之T細胞反應、破壞B7結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞B7活化共刺激路徑之能力、破壞CD80結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD80活化共刺激路徑之能力、破壞CD86結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD86活化共刺激路徑之能力及破壞共刺激路

徑的任何抑制劑。此必定包括：CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員之小分子抑制劑；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的抗體；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的反義分子；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的阿德奈汀；CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的RNAi抑制劑(單股及雙股)；以及其他CTLA-4抑制劑。

【1751】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑以如下Kd結合至CTLA-4，該Kd為約10^{-6} M或更小、10^{-7} M或更小、10^{-8} M或更小、10^{-9} M或更小、10^{-10} M或更小、10^{-11} M或更小、10^{-12} M或更小，例如10^{-13} M與10^{-16} M之間，或在任兩個前述值作為端點的任何範圍內。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd不超過伊匹木單抗之Kd之10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd與伊匹木單抗之Kd約相同或更小(例如低至多10倍或低至多100倍)。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC50值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC50值高不超過10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC50值相比，CTLA-4抑制

劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC50值約相同或更小(例如，低至多10倍或低至多100倍)。

【1752】在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4抑制劑，該量足以相對於適合之對照將CTLA-4之表現抑制及/或使CTLA-4之生物活性降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如50%與75%、75%與90%或90%與100%之間。在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4路徑抑制劑，該量足以藉由使CTLA-4與CD80、CD86或兩者之結合相對於適合之對照減少至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如相對於適合之對照減少50%與75%、75%與90%或90%與100%之間來降低CTLA-4之生物活性。在評定或量化所關注之藥劑之效應的上下文中之適合對照通常為尚未暴露於所關注之藥劑(例如CTLA-4路徑抑制劑)或用該藥劑處理的相當之生物系統(例如細胞或個體)(或已暴露於可忽略量或用可忽略量進行處理)。在一些實施例中，生物系統可充當其自身之對照，例如可在暴露於藥劑或用藥劑處理之前評定生物系統並與開始或結束暴露或處理之後的狀態進行比較。在一些實施例中，可使用歷史對照。

【1753】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗(可自百時美施貴寶公司以Yervoy商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變異體。如本領域中已知，伊匹木單抗係指抗CTLA-4抗體，一種來源於具有編碼重鏈及輕鏈之人類基因以產生功能性人類譜系之轉殖基因小

鼠的完全人類IgG1κ抗體。伊匹木單抗亦可藉由其CAS登記號477202-00-9及在PCT公開案第WO 01/14424中提及，該公開案出於所有目的以全文引用之方式併入。其以抗體10DI之形式揭示。特定言之，伊匹木單抗含有輕鏈可變區及重鏈可變區(具有包含SEQ ID NO:211之輕鏈可變區且具有包含SEQ ID NO:210之重鏈可變區)。伊匹木單抗之醫藥組合物包括含有伊匹木單抗及一或多種稀釋劑、媒劑或賦形劑的所有醫藥學上可接受之組合物。含有伊匹木單抗之醫藥組合物之實例描述於國際專利申請公開案第WO 2007/67959號中。伊匹木單抗可靜脈內(IV)投與。

【1754】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含SEQ ID NO:208所載之重鏈及SEQ ID NO:209所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些

實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1755】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含伊匹木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:210中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:211中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1756】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:213及SEQ ID NO:214中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216及SEQ ID NO:217中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕

鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1757】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考伊匹木單抗核准之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。伊匹木單抗之胺基酸序列闡述於表23中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含

的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。

表 23. 依匹木單抗之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:208 伊匹木單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
SEQ ID NO:209 伊匹木單抗輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
SEQ ID NO:210 伊匹木單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:211 伊匹木單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
SEQ ID NO:212 伊匹木單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYT 8
SEQ ID NO:213 伊匹木單抗重鏈 CDR2	TFISYDGNNK 10
SEQ ID NO:214 伊匹木單抗重鏈 CDR3	ARTGWLGPFD Y 11
SEQ ID NO:215 伊匹木單抗輕鏈 CDR1	QSVGSSY 7
SEQ ID NO:216 伊匹木單抗輕鏈 CDR2	GAF 3
SEQ ID NO:217 伊匹木單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT 9

【1758】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10

mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1759】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，其中伊匹木單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約 500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1760】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與伊匹木單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1761】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約mg/kg投與伊匹木單抗，持續最多4次劑量以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1762】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約10 mg/kg投與伊匹木單抗，持續4次劑量，然後每12週投與10 mg/kg，持續至多3年，以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1763】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每3週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗，緊接著在同一天投與3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，可根據標準給藥方案針對晚期腎細胞癌及/或腎細胞癌以單一試劑形式投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在

一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1764】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約1 mg/kg靜脈內投與伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投與3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，在完成組合物之4次劑量之後，如根據標準給藥方案所推薦針對高微衛星不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌以單一試劑形式投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1765】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約3 mg/kg靜脈內投與伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投與1 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，根據標準給藥方案針對肝細胞癌以單一試劑形式投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在

一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1766】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗且每2週投與3 mg/kg納武單抗，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗，加上每3週360 mg納武單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1767】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗且每3週投與360 mg納武單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【1768】曲美單抗(亦稱為CP-675,206)為完全人類IgG2單株抗體且CAS編號為745013-59-6。曲美單抗以抗體11.2.1形式揭示於美國專利第6,682,736號(以引用之方式併入本文中)中。曲美單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列分別

闡述於SEQ IND NO:218及219中。已在臨床試驗中針對治療包括黑色素瘤及乳癌之各種腫瘤研究了曲美單抗；其中每4或12週以0.01與15 mg/kg之間的劑量範圍呈單次劑量或多次劑量靜脈內投與曲美單抗。在本發明提供之方案中，局部投與，尤其係皮內或皮下投與曲美單抗。皮內或皮下投與之曲美單抗的有效量通常在每人5-200毫克/劑的範圍內。在一些實施例中，曲美單抗之有效量在每人每劑10-150毫克/劑的範圍內。在一些特定實施例中，曲美單抗之有效量為每人約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175或200毫克/劑。

【1769】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含SEQ ID NO:218所載之重鏈及SEQ ID NO:219所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些

實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1770】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含曲美單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:220中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:221中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1771】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:222、SEQ ID NO:223及SEQ ID NO:224中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226及SEQ ID NO:227中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕

鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1772】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考曲美單抗核准之抗CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。曲美單抗之胺基酸序列闡述於表24中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑

相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。

表 24. 曲美單抗之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:218 曲美單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:219 曲美單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:220 曲美單抗可變重鏈	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
SEQ ID NO:221 曲美單抗可變輕鏈	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
SEQ ID NO:222 曲美單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYGMH 10
SEQ ID NO:223 曲美單抗重鏈 CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
SEQ ID NO:224 曲美單抗重鏈 CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV 16
SEQ ID NO:225 曲美單抗輕鏈 CDR1	RASQSINSYL D 11
SEQ ID NO:226 曲美單抗輕鏈 CDR2	AASSLQS 7
SEQ ID NO:227 曲美單抗輕鏈 CDR3	QQYYSTPFT 9

【1773】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5

mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投與。

【1774】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，其中曲美單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投與。

【1775】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與曲美單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣本之前)1、2或3週開始曲美單抗投與。

【1776】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為來自

Agenus之澤弗利單抗或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變異體。澤弗利單抗為完全人類單株抗體。澤弗利單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號2148321-69-9且亦稱為亦稱為AGEN1884。澤弗利單抗之製備及特性描述於美國專利第10,144,779號及美國專利申請公開案第US2020/0024350 A1號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1777】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含SEQ ID NO:228所載之重鏈及SEQ ID NO:229所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【1778】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含澤弗利單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:230中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:231中所示之序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【1779】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:233及SEQ ID NO:234中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236及SEQ ID NO:237中所闡述之序列及其保守胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【1780】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考澤弗利單抗核准之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺作用及截短。澤弗利單抗之胺基酸序列闡述於表25中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。

表 25. 澤弗利單抗之胺基酸序列。

識別符	序列 (單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:228 澤弗利單抗重鏈	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:229 澤弗利單抗輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:230 澤弗利單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS	60 118
SEQ ID NO:231 澤弗利單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:232 澤弗利單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYS	8
SEQ ID NO:233 澤弗利單抗重鏈 CDR2	ISSSSSYI	8
SEQ ID NO:234 澤弗利單抗重鏈 CDR3	ARVGLMGPFD I	11
SEQ ID NO:235 澤弗利單抗輕鏈 CDR1	QSVSRY	6
SEQ ID NO:236 澤弗利單抗輕鏈 CDR2	GAS	3
SEQ ID NO:237 澤弗利單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT	9

【1781】另外的抗CTLA-4抗體之實例包括但不限於：AGEN1181、BMS-986218、BCD-145、ONC-392、CS1002、REGN4659及ADG116，其為本領域一般熟習此項技術者已知。

【1782】在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為揭示於以下專利公開案中之任一者中的抗CTLA-4抗體：US 2019/0048096 A1；US 2020/0223907；US 2019/0201334；US 2019/0201334；US 2005/0201994；EP 1212422 B1；WO 2018/204760；WO 2018/204760；WO 2001/014424；WO 2004/035607；WO 2003/086459；WO 2012/120125；

WO 2000/037504；WO 2009/100140；WO 2006/09649；WO2005092380；WO 2007/123737；WO 2006/029219；WO 2010/0979597；WO 2006/12168；及WO1997020574，其中之每一者以引用的方式併入本文中。另外的CTLA-4抗體描述於以下中：美國專利第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號；以及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號；及/或美國專利第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號，其中之每一者以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為例如揭示於以下中之彼等抗體：WO 98/42752；美國專利第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，**1998,** *95,* 10067-10071 (1998)；Camacho等人,《臨床腫瘤學雜誌》**2004,** 22, 145(摘要第2505號 (2004) (抗體CP-675206)；或Mokyr等人，《癌症研究(*Cancer Res.*)》，**1998,** 58, 5301-5304 (1998)，其中之每一者以引用的方式併入本文中。

【1783】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為如WO 1996/040915(以引用之方式併入本文中)中所揭示之CTLA-4配體。

【1784】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為CTLA-4表現之核酸抑制劑。舉例而言，抗CTLA-4 RNAi分子可呈描述於以下之分子的形式：PCT公開案第WO 1999/032619

號及第WO 2001/029058號；美國公開案第2003/0051263號、第2003/0055020號、第2003/0056235號、第2004/265839號、第2005/0100913號、第2006/0024798號、第2008/0050342號、第2008/0081373號、第2008/0248576號及第2008/055443號；及/或美國專利第6,506,559號、第7,282,564號、第7,538,095號及第7,560,438號(以引用之方式併入本文中)。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈在歐洲專利第EP 1309726號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈在美國專利第7,056,704號及第7,078,196號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為PCT公開案第WO 2004/081021號(以引用之方式併入本文中)中所描述之適體。

【1785】在其他實施例中，本發明之抗CTLA-4 RNAi分子為在美國專利第5,898,031號、第6,107,094號、第7,432,249號及第7,432,250號以及歐洲申請案第EP 0928290號(以引用之方式併入本文中)中描述之RNA分子。

3. 患者之淋巴球耗盡預調節

【1786】在一些實施例中，本發明包括一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本揭示案之TIL之前經非骨髓清除式化療預治療。在一些實施例中，本發明包括用於治療已用非骨髓清除式化療預治療之患者之癌

症的TIL群體。在一些實施例中，TIL群體係藉由輸注投與。在一些實施例中，非骨髓清除式化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m^2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，在根據本揭示案之非骨髓清除式化療及TIL輸注(第0天)之後，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2(阿地介白素，可以PROLEUKIN商購)之靜脈內輸注以達到生理耐受。在某些實施例中，TIL群體用於與IL-2組合治療癌症，其中IL-2係在TIL群體之後投與。

【1787】實驗發現表明，在授受性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗盡藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(『細胞介素庫』)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【1788】一般而言，使用氟達拉濱或環磷醯胺(活性形式稱作馬磷醯胺)及其組合之投與實現淋巴球耗乏。此類方法描述於Gassner等人，《癌症免疫學及免疫治療》**2011**, *60*, 75-85、Muranski等人，《自然臨床實踐腫瘤學》,**2006,** *3*, 668-681、Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26*, 5233-5239及Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2005**, *23*, 2346-2357中，所有該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

【1789】在一些實施例中，氟達拉濱係以0.5 μg/mL至

10 μg/mL氟達拉濱之濃度投與。在一些實施例中，氟達拉濱係以1 μg/mL氟達拉濱之濃度投與。在一些實施例中，投與氟達拉濱治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，氟達拉濱係以10 mg/kg/天、15 mg/kg/天、20 mg/kg/天、25 mg/kg/天、30 mg/kg/天、35 mg/kg/天、40 mg/kg/天或45 mg/kg/天之劑量投與。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35 mg/kg/天投與2至7天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35 mg/kg/天投與4至5天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以25 mg/kg/天投與4至5天。

【1790】在一些實施例中，藉由投與環磷醯胺獲得濃度為0.5 μg/mL至10 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，藉由投與環磷醯胺獲得濃度為1 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，投與環磷醯胺治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，環磷醯胺係以100 mg/m^2/天、150 mg/m^2/天、175 mg/m^2/天、200 mg/m^2/天、225 mg/m^2/天、250 mg/m^2/天、275 mg/m^2/天或300 mg/m^2/天之劑量投與。在一些實施例中，環磷醯胺係靜脈內(亦即i.v.)投與。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以35 mg/kg/天投與2至7天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250 mg/m^2/天靜脈內投與4至5天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250 mg/m^2/天靜脈內投與4天。

【1791】在一些實施例中，藉由將氟達拉濱及環磷醯

胺一起投與給患者進行淋巴球耗盡。在一些實施例中，經4天以25 mg/m^2/天靜脈內投與氟達拉濱且以250 mg/m^2/天靜脈內投與環磷醯胺。

【1792】在一些實施例中，藉由以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡。

【1793】在一些實施例中，藉由以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1794】在一些實施例中，藉由以約50 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1795】在一些實施例中，藉由以約50 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約20 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1796】在一些實施例中，藉由以約40 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約20 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1797】在一些實施例中，藉由以約40 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約15 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉

濱五天來進行淋巴球耗盡，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗盡。

【1798】在一些實施例中，藉由以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天來進行淋巴球耗盡。

【1799】在一些實施例中，環磷醯胺與美司鈉一起投與。在一些實施例中，美司鈉係以15 mg/kg投與。在一些實施例中，輸注美司鈉，且若連續輸注，則歷經24小時，伴隨各自環磷醯胺劑量開始，美司鈉可經大約2小時與環磷醯胺一起輸注(第-5天及/或第-4天)，隨後在剩餘22小時以3 mg/kg/小時之速率輸注。

【1800】在一些實施例中，淋巴球耗盡包含以下步驟：始於在向患者投與第三TIL群體之後當天，用IL-2方案治療患者。

【1801】在一些實施例中，淋巴球耗盡包含以下步驟：始於向患者投與第三TIL群體當天，用IL-2方案治療患者。

【1802】在一些實施例中，淋巴球耗盡包含5天之預調節治療。在一些實施例中，天數指示為第-5天至第-1天，或第0天至第4天。在一些實施例中，該方案包含第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包含第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包含第-5天及

第-4天(亦即第0天及第1天)的60 mg/kg靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，環磷醯胺與美司鈉一起投與。在一些實施例中，該方案進一步包含氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。

【1803】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【1804】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【1805】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【1806】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25

mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【1807】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續一天。

【1808】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【1809】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【1810】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表26投與。

表26. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X								
美司鈉 (按需要)	X	X								
氟達拉濱 25 mg/m^2/天	X	X	X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1811】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表27投與。

表 27. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X							
美司鈉 (按需要)	X	X							
氟達拉濱 25 mg/m^2/天	X	X	X	X					
TIL 輸注					X				

【1812】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表28投與。

表 28. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X						
美司鈉 (按需要)	X	X						
氟達拉濱 25 mg/m^2/天	X	X	X					
TIL 輸注				X				

【1813】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表29投與。

表 29. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 60 mg/kg	X	X								
美司鈉 (按需要)	X	X								
氟達拉濱 25 mg/m^2/天			X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1814】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表30投與。

表 30. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X								
美司鈉 (按需要)	X	X								
氟達拉濱 30 mg/m^2/天	X	X	X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1815】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表31投與。

表 31. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X							
美司鈉 (按需要)	X	X							
氟達拉濱 30 mg/m^2/天	X	X	X	X					
TIL 輸注					X				

【1816】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表32投與。

表 32. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X						
美司鈉 (按需要)	X	X						
氟達拉濱 30 mg/m^2/天	X	X	X					
TIL 輸注				X				

【1817】在一些實施例中，非骨髓清除式淋巴球耗盡方案係根據表33投與。

表 33. 例示性淋巴球耗盡及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺 300 mg/kg	X	X								
美司鈉 (按需要)	X	X								
氟達拉濱 30 mg/m^2/天			X	X	X					
TIL 輸注						X				

【1818】在一些實施例中，與骨髓清除式淋巴球耗盡方案之前述實施例一起使用之TIL輸注可為本文所描述之任何TIL組合物，以及添加IL-2方案及投與如本文所描述之協同療法(諸如PD-1及PD-L1抑制劑)。

4. IL-2方案

【1819】在一些實施例中，IL-2方案包含高劑量IL-2方案，其中高劑量IL-2方案包含阿地介白素或其生物類似物或變異體，其在投與治療性TIL群體之治療有效部分之後當天開始靜脈內投與，其中阿地介白素或其生物類似物或變異體係每八小時使用15分鐘推注靜脈內輸注以0.037 mg/kg或0.044 mg/kg IU/kg(患者體重)之劑量投與直至耐受，最多為14個劑量。在休止9天後，可重複此時程再投與14次劑量，最多總計28次劑量。在一些實施例中，IL-2係以1、2、3、4、5或6次劑量投與。在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投與。

【1820】在一些實施例中，IL-2方案包含遞減IL-2方案。遞減IL-2方案已描述於O'Day等人，《臨床腫瘤學雜誌》**1999**, *17*, 2752-61及Eton等人，《癌症》**2000**, *88*,

1703-9，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遞減IL-2方案包含經6小時靜脈內投與18×10^6 IU/m^2，然後經12小時靜脈內投與18×10^6 IU/m^2，然後經24小時靜脈內投與18×10^6 IU/m^2，然後經72小時靜脈內投與4.5×10^6 IU/m^{2}阿地介白素或其生物類似物或變異體。此治療週期可每28天重複，達最多四個週期。在一些實施例中，遞減IL-2方案包含第1天18,000,000 IU/m^2，第2天9,000,000 IU/m^2 以及第3天及第4天4,500,000 IU/m^2。

【1821】在一些實施例中，IL-2方案包含低劑量IL-2方案。可使用本領域中已知之任何低劑量IL-2方案，包括Dominguez-Villar及Hafler，《自然免疫學(*Nat. Immunology*)》**2000,** *19,* 665-673；Hartemann等人，《柳葉刀糖尿病與內分泌學(*Lancet Diabetes Endocrinol.*)》**2013**, *1*, 295-305；及Rosenzwaig等人，《風濕病年鑒(*Ann. Rheum. Dis.*)》**2019,** *78,* 209-217中所描述之低劑量IL-2方案，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，低劑量IL-2方案包含每24小時18×10^6 IU/m^{2}之阿地介白素或其生物類似物或變異體，以連續輸注形式投與5天；之後2至6天不投與IL-2療法；視情況之後再靜脈內投與阿地介白素或其生物類似物或變異體5天，以每24小時連續輸注18×10^6 IU/m^{2}之形式；視情況在之後3週不投與IL-2療法，其後可進行另外週期之投與。

【1822】在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投與。在一些實施例中，高劑量IL-2方案適用於

小兒用途。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為600,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為400,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為300,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為200,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為100,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。

【1823】在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10 mg/天至50 mg/天之劑量投與聚乙二醇化IL-2。在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10 mg/天至50 mg/天之劑量投與貝培阿地介白素或其片段、變異體或生物類似物。

【1824】在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10 mg/天至50 mg/天之劑量投與THOR-707或其片段、變異體或生物類似物。

【1825】在一些實施例中，IL-2方案包含在投與TIL之後投與奈瓦紐金α或其片段、變異體或生物類似物。在某些實施例中，每1、2、4、6、7、14或21天以0.10 mg/天

至50 mg/天之劑量向患者投與奈瓦紐金。

【1826】在一些實施例中，IL-2方案包含投與移植至抗體主鏈上之IL-2片段。在一些實施例中，IL-2方案包含投與結合IL-2低親和力受體之抗體細胞介素移植蛋白。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該IL-2分子為突變蛋白，且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10 mg/天至50 mg/天之劑量投與抗體或其片段、變異體或生物類似物，該抗體包含選自由SEQ ID NO:29及SEQ ID NO:38組成之群組之重鏈及選自由SEQ ID NO:37及SEQ ID NO:39組成之群組之輕鏈。

【1827】在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素(Proleukin®)或可比分子)長。

5. 另外之治療方法

【1828】在另一實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之上文段落中任一項中所描述之治療性TIL群體。

【1829】在另一實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之上文段落中任一項中所描述之TIL組合物。

【1830】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中在分別投與治療有效劑量的如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體及TIL組合物之前，已向個體投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1831】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【1832】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其進一步包含在向個體投與TIL細胞後當天開始用高劑量IL-2方案治療個體之步驟。

【1833】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸

注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1834】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為實體腫瘤。

【1835】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤。

【1836】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為兒科高突變癌症。

【1837】在另一實施例中，本發明提供如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包含向個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【1838】在另一實施例中，本發明提供如上任何前述段落中描述的TIL組合物，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包含向個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【1839】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上任何前述段落中描述的TIL組合物，其中在向個體投與治療有效劑量之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上任何前述段落中描述的TIL組合物之前，已向個體投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案。

【1840】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【1841】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其進一步包含以下步驟：始於在向患者投與TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【1842】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【1843】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為實體腫瘤。

【1844】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤。

【1845】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為高突變癌症。

【1846】在另一實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中

癌症為兒科高突變癌症。

【1847】在另一實施例中，本發明提供如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【1848】在另一實施例中，本發明提供如上任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向該個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【1849】在另一實施例中，本發明提供如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向個體投與非骨髓清除式淋巴球耗盡方案且隨後向個體投與治療有效劑量之如上任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上任何前述段落中描述的TIL組合物。

實例

【1850】現參考以下實例描述本文中涵蓋之實施例。此等實例僅出於說明之目的提供且本揭示案決不應理解為限於此等實例，而應理解為涵蓋由於本文提供之教示而變得顯而易見的任何及所有變化形式。

實例1：製備用於預REP及REP過程之培養基

【1851】此實例描述用於製備適用於涉及來源於各種

實體腫瘤之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之培養的方案之組織培養基的程序。此培養基可用於製備本申請案及實例中所描述之任一TIL。

【1852】製備CM1。自冷藏庫取出以下試劑並使其在37℃水浴中升溫：(RPMI1640、人類AB血清、200 mM L-麩醯胺酸)。根據下表34，藉由將每一成分添加至適於待過濾體積之0.2 μm過濾器單元的頂部來製備CM1培養基。儲存於4℃下。

表34. 製備CM1

成分	最終濃度	最終體積500 mL	最終體積IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
人類AB血清，加熱不活化10%	50 mL	100 mL	
200mM L-麩醯胺酸	2 mM	5 mL	10 mL
55mM BME	55 μM	0.5 mL	1 mL
50mg/mL硫酸建它黴素	50 μg/mL	0.5 mL	1 mL

【1853】使用當天，將所需量之CM1在37℃水浴中預熱並添加6000 IU/mL IL-2。

【1854】根據表35，可按需要進行額外補充。

表35. 按需要對CM1之另外補充。

補充	**儲備液濃度**	**稀釋**	**最終濃度**
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
青黴素/鏈黴素	10,000 U/mL 青黴素 10,000 μg/mL 鏈黴素	1:100	100 U/mL 青黴素 100 μg/mL 鏈黴素
雙性黴素B	250 μg/mL	1:100	2.5 μg/mL

製備CM2

【1855】自冰箱取出已製備之CM1或製備新鮮CM1。自冰箱取出AIM-V®，且藉由在無菌培養基瓶中混合已製備之CM1與等體積AIM-V®來製備所需量之CM2。在使用當天向CM2培養基中添加3000 IU/mL IL-2。在使用當天用3000 IU/mL IL-2製成足夠量之CM2。將CM2培養基瓶標記上名稱、製備者名字縮寫、過濾/製備日期、兩週之過期日期，且在需要用於組織培養之前儲存於4℃下。

製備CM3

【1856】在需要使用的當天，製備CM3。CM3與AIM-V®培養基相同，但在使用當天補充3000 IU/mL IL-2。藉由向AIM-V瓶或袋中直接添加IL-2儲備液，製備滿足實驗需求之量的CM3。藉由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IU/mL IL-2」。若存在過量CM3，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、製備者名字縮寫、製備培養基之日期及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

製備CM4

【1857】CM4與CM3相同，但另外補充2 mM GlutaMAX™(最終濃度)。每1L CM3添加10 mL之200 mM GlutaMAX™。藉由向AIM-V瓶或袋直接添加IL-2儲備液及GlutaMAX™儲備液，製備滿足實驗需求之量的CM4。藉

由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IL/mL IL-2及GlutaMAX」。若存在過量CM4，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、「GlutaMAX」及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下超過7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

實例2：IL-2、IL-15及IL-21細胞介素混合物之用途

【1858】此實例描述其充當其他T細胞生長因子之IL-2、IL-15及IL-21細胞介素與本文實例中之任一者之TIL過程之用途。

【1859】使用本文所描述之過程，TIL可在實驗的一個組中在IL-2存在的情況下自腫瘤中生長，且在培養開始時，可在另一個組中使用IL-2、IL-15及IL-21之組合來代替IL-2。在預REP完成時，評估培養物之擴增、表型、功能(CD107a+及IFN-γ)及TCRVβ譜系。IL-15及IL-21在本文別處及於Santegoets等人，《轉化醫學雜誌(*J. Transl. Med.*)》, **2013**, *11*, 37中描述。

【1860】結果可以表明，相對於僅IL-2條件，可觀測到在IL-2、IL-15及IL-21處理條件下，$CD4^+$及$CD8^+$細胞中的TIL擴增增強(>20%)。相對於僅IL-2培養物，從IL-2、IL-15及IL-21處理的培養物獲得之TIL中，出現了以CD8+群體為主的傾斜，TCRVβ譜系亦有所傾斜。與僅IL-2處理之TIL相比，經IL-2、IL-15及IL-21處理之TIL中的IFN-γ及CD107a升高。

實例3：對單個批次之γ照射的周邊單核細胞進行鑑定

【1861】本實施例描述了用於鑑定在本文所描述之例示性方法中用作同種異體飼養細胞的單個批次的經γ照射的周邊單核細胞(PBMC，亦稱為單核細胞或MNC)的簡化程序。

【1862】各經照射之MNC飼養細胞批次均由個體供體製備。在存在經純化之抗CD3(純系OKT3)抗體及介白素-2(IL-2)的情況下，針對各批次或供體在REP中擴增TIL的能力進行單獨篩選。此外，各批次飼養細胞都在不添加TIL之情況下進行測試，以驗證所接收之γ照射劑量足以使其不能夠複製。

【1863】TIL之REP需要經γ照射之生長停滯的MNC飼養細胞。飼養細胞MNC上的膜受體與抗CD3(純系OKT3)抗體結合並與REP培養瓶中的TIL交聯，刺激TIL擴展。飼養細胞批次由採集自個體供體的全血的白血球清除術製備。將白血球清除術產物在Ficoll-Hypaque上進行離心、洗滌、照射且在GMP條件下冷凍保存。

【1864】重要的係，接受TIL療法之患者不輸注活飼養細胞，因為此可能導致移植物抗宿主病(GVHD)。因此，飼養細胞之生長受到γ照射抑制，導致雙股DNA斷裂及在重新培養時MNC細胞細胞存活率之損失。

【1865】飼養細胞批次根據兩個準則進行評估：(1)其在共培養中擴展TIL的能力>100倍及(2)其複製能力不

足。

【1866】利用在立式T25組織培養瓶中生長的兩個主要預REP TIL株系，以微REP格式測試飼養細胞批次。飼養細胞批次針對兩個不同的TIL株系進行了測試，因為各TIL株系在其響應於REP中活化而增殖之能力方面係獨特的。作為對照，與測試批次一起運行了許多歷來已證明滿足上述準則的經照射的MNC飼養細胞。

【1867】為確保在單一實驗中測試的所有批次都接受等效測試，可使用相同預REP TIL株系的足夠儲備液來測試所有條件及所有飼養細胞批次。

【1868】對於測試的各批次飼養細胞，總共存在六個T25培養瓶：預REP TIL株系#1(2個培養瓶)；預REP TIL株系#2(2個培養瓶)；及飼養細胞對照組(2個培養瓶)。含有TIL株系#1及#2的培養瓶評估了飼養細胞批次擴展TIL的能力。飼養細胞對照組培養瓶評估飼養細胞批次的複製能力不足。

A.實驗方案

【1869】第-2/3天，TIL株系解凍。在37℃水浴中製備CM2培養基及溫CM2。製備40 mL補充有3000 IU/mL IL-2之CM2。保持溫熱直至使用。將20 mL不含IL-2之預熱CM2置放於兩個50 mL錐形管中之每一者中，用所用TIL株系之名稱標記。自LN2儲存移除兩個指定的預REP TIL株系且將小瓶轉移至組織培養室。藉由將其放入之經密封拉

鏈儲存袋中於37℃水浴中解凍直至保留少量冰。

【1870】使用無菌移液管，將各小瓶之內容物立即轉移至所製備的50 mL錐形管中之20 mL CM2中。補足至40mL，使用不含IL-2的CM2來洗滌細胞，且在400×CF下離心5分鐘。抽吸上清液且再懸浮於補充有3000 IU/mL IL-2之5 mL溫熱CM2中。

【1871】使用自動化細胞計數器一式兩份地移出小等分試樣(20 μL)用於細胞計數。記錄計數。在計數時，將具有TIL細胞之50 mL錐形管置放於潮濕的37℃ 5% CO_2培育箱中，其中蓋鬆開以允許氣體交換。測定細胞濃度，且TIL在補充有3000 IU/mL IL-2之CM2中稀釋至1×10^6個細胞/mL。

【1872】將24孔組織培養盤的2 mL/孔在潮濕的37℃培育箱中按需要多孔培養，直至微REP的第0天。不同TIL株系在單獨的24孔組織培養盤中培養以避免混淆及潛在的交叉污染。

【1873】第0天，起始微REP。針對待測試之飼養細胞批次之數目製備足夠CM2培養基。(例如，為了一次測試4個飼養細胞批次，製備800 mL CM2培養基)。將上述製備之CM2的一部分等分，且其補充3000 IU/mL IL-2用於細胞培養。(例如，為了一次測試4個飼養細胞批次，製備具有3000 IU/mL IL-2之500 mL CM2培養基)。

【1874】用各TIL株系獨立地工作以防止交叉污染，自保溫箱移除具有TIL培養物之24孔盤，且轉移至BSC。

【1875】使用無菌移液管或100-1000 μL移液器及吸頭，自待使用之TIL之各孔移除約1 mL培養基，並將其置於24孔組織培養盤之未使用孔中。

【1876】使用新鮮的無菌移液管或100-1000 μL移液器及吸頭，將剩餘培養基與孔中的TIL混合以再懸浮細胞，且隨後將細胞懸浮液轉移至標有TIL批次的50 mL錐形管中並記錄體積。

【1877】用保留的培養基清洗孔且將該體積轉移至相同的50 mL錐形管中。以400×CF旋轉細胞以收集細胞離心塊。抽吸培養基上清液，且將細胞離心塊再懸浮在2-5 mL含有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基中，使用體積取決於收集的孔數目及離心塊的大小-體積應足以確保濃度>1.3×10^6個細胞/mL。

【1878】使用血清移液管將細胞懸浮液徹底混合且記錄體積。使用自動化細胞計數器移除200 μL以進行細胞計數。在計數時，將具有TIL細胞之50 mL錐形管置放於潮濕的5% CO_2 37℃培育箱中，其中蓋鬆開以允許氣體交換。記錄計數。

【1879】移出含有來自培育箱中之TIL細胞的50 mL錐形管，且使其細胞以1.3×10^6個細胞/mL之濃度再懸浮於補充有3000 IU/mL IL-2之溫熱CM2中。將50 mL錐形管放回至具有鬆散蓋子之培育箱中。

【1880】對於第二TIL株系重複以上步驟。

【1881】僅在將TIL接種至用於實驗之T25培養瓶中之

前，如下所示將TIL按1:10稀釋成最終濃度為1.3×10^5個細胞/mL。

【1882】製備MACS GMP CD3純(OKT3)工作溶液。自4℃冰箱中取出OKT3之儲備溶液(1 mg/mL)且置放於BSC中。最終濃度為30 ng/mL OKT3用於微REP之培養基中。

【1883】對於各實驗之T25培養瓶中，20 mL需要600 ng OKT3；此相當於各20 mL需要60 µL的10 µg/mL溶液，或者各飼養細胞批次的所有6個測試培養瓶需要360 µL。

【1884】對於各測試的飼養細胞批次，製備400 µL 1:100稀釋度之1 mg/mL OKT3，工作濃度為10 µg/mL(例如，一次測試4個飼養細胞批次，製備1600 µL 1:100稀釋度之1 mg/mL OKT3：16 µL 1 mg/mL OKT3+1.584 mL具有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基。)

【1885】製備T25培養瓶。在製備飼養細胞之前用CM2培養基標記各培養瓶及填充培養瓶。將培養瓶置放於37℃潮濕的5% CO_2培育箱中以保持培養基溫暖，同時等待添加其餘組分。在製備飼養細胞後，將組分添加至各培養瓶中之CM2中。

【1886】其他資訊提供於表36中。

表 36. 溶液資訊。

組分	共培養物培養瓶中之體積	對照 (僅飼養系胞) 培養瓶中之體積
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18 mL	19 mL
MNC: 1.3×10^7/mL in CM2 + 3000 IU IL-2 (最終濃度 1.3×10^7/培養瓶)	1 mL	1 mL
OKT3: 10 μL/mL 於 CM2 = 3000 IU IL-2	60 μL	60 μL
TIL: 1.3×10^5/mL 於具有 3000 IU IL-2 之 CM2 (最終濃度 1.3×10^5/培養瓶)	1 mL	0

【1887】製備飼養細胞。對於此方案每次測試之批次需要最少78×10^6個飼養細胞。由SDBB冷凍之各1 mL小瓶在冷凍時具有100×10^6個活細胞。假設從液態N_2儲存解凍後回收率為50%，建議每批次至少解凍兩個1 mL小瓶之飼養細胞，各REP估計有100×10^6個活細胞。或者，若供應於1.8 mL小瓶中，則僅一個小瓶提供足夠的飼養細胞。

【1888】在解凍飼養細胞之前，對於待測試之各飼養細胞批次預溫熱約50 mL不含IL-2之CM2。自LN2儲存器移除指定飼養細胞批次小瓶，置放於拉鏈儲存袋中，且置放於冰上。藉由浸沒於37℃水浴中，使小瓶在封閉的拉鏈儲存袋中解凍。自拉鏈袋移除小瓶，用70% EtOH噴塗或擦拭，並轉移至BSC。

【1889】使用移液管，將飼養細胞小瓶之內容物立即轉移至50 mL錐形管中之30 mL溫熱CM2中。用小體積之CM2洗滌小瓶以移除小瓶中之任何殘餘細胞且在400×CF下

離心5分鐘。抽吸上清液且再懸浮於外加3000 IU/mL IL-2之4 mL溫熱CM2中。使用自動化細胞計數器移除200 μL進行細胞計數。記錄計數。

【1890】將細胞以1.3×10^7個細胞/mL再懸浮於外加3000 IU/mL IL-2之溫熱CM2中。將1.3×10^6個細胞/mL稀釋至1.3×10^5個細胞/mL。

【1891】建立共培養物將1.3×10^6個細胞/mL稀釋至1.3×10^5個細胞/mL。將4.5 mL CM2培養基添加至15 mL錐形管。自培育箱中移除TIL細胞且使用10 mL血清移液管充分再懸浮。自1.3×10^6個細胞/mL TIL懸浮液移除0.5 mL細胞且添加至15 mL錐形管中之4.5 mL培養基中。將TIL儲備液瓶返回至培育箱。充分混合。重複第二TIL株系。

【1892】將具有預溫熱培養基之培養瓶自培育箱轉移至BSC中用於單次飼養細胞批料。藉由用1 mL移液器吸頭上下移液數次來混合飼養細胞，且然後將1 mL(1.3×10^7個細胞)轉移至該飼養細胞批次的各培養瓶中。向各培養瓶中添加60 μL OKT3工作儲備液(10 μg/mL)。將兩個對照培養瓶返回至培育箱。

【1893】將各TIL批次的1 mL(1.3×10^5)轉移至相應標記的T25培養瓶中。將培養瓶返回至培育箱中且直立培育。直到第5天才干預。對於所測試之所有飼養細胞批次重複此程序。

【1894】第5天，培養基更換。用3000 IU/mL IL-2製備CM2。各培養瓶需要10 mL。藉由10 mL移液管，將具有

3000 IU/mL IL-2之10 mL溫熱CM2轉移至各培養瓶。將培養瓶返回至培育箱中且直立培育至第7天。對所有測試的飼養細胞批次重複。

【1895】第7天，收集。自培育箱中移出培養瓶且轉移至BSC，注意以免干擾培養瓶底部上之細胞層。在不干擾培養瓶底部生長之細胞的情況下，自各測試培養瓶移除10 mL培養基且自對照培養瓶中之每一者移除15 mL培養基。

【1896】使用10 mL血清移液管，將細胞再懸浮於中剩餘的培養基中且充分混合以打散任何細胞凝集塊。藉由移液充分混合細胞懸浮液之後，移除200 μL以用於細胞計數。結合自動細胞計數器設備使用適當標準操作程序對TIL進行計數。第7天記錄之計數。對於所測試之所有飼養細胞批次重複此程序。

【1897】評估飼養細胞對照培養瓶之複製能力不足，且第0天開始評估含有TIL的培養瓶的擴增倍數。

【1898】第7天，繼續飼養細胞對照培養瓶至第14天。在第7天完成飼養細胞對照培養瓶計數後，將15 mL含有3000 IU/mL IL-2的新鮮CM2培養基添加至對照培養瓶中之每一者。將對照培養瓶返回至培育箱中且在直立位置培育直至第14天。

【1899】第14天，延長非增殖之飼養細胞對照培養瓶。自培育箱中移出培養瓶且轉移至BSC，注意以免干擾培養瓶底部上的細胞層。在不干擾培養瓶底部生長之細胞

的情況下，自各對照培養瓶移除大約17 mL培養基。使用5 mL血清移液管，將細胞再懸浮於中剩餘的培養基中且充分混合以打散任何細胞凝集塊。記錄各培養瓶之體積。

【1900】藉由移液充分混合細胞懸浮液之後，移除200 μL用於細胞計數。使用適當標準操作程序結合自動細胞計數器設備對TIL進行計數且記錄計數。對於所測試之所有飼養細胞批次重複此程序。

B.結果及驗收準則方案

【1901】結果。γ輻射之劑量足以使飼養細胞複製無法勝任。預期所有批次符合評估準則且亦展現相比於第0天，REP培養第7天剩餘之飼養細胞之總活細胞數目減少。預計到REP培養的第7天，所有飼養細胞批次都將滿足TIL增長100倍擴增的評估準則。預計第14天的飼養對照培養瓶計數將持續第7天所看到的非增殖趨勢。

【1902】驗收準則對於各批次飼養細胞測試之各複本TIL株系滿足以下驗收準則。驗收準則為兩倍的，如下文表37中所展示。

表37. 驗收準則之實施例。

測試	驗收準則
MNC之照射及複製無能	在7天及14天未觀測到生長
TIL擴增	各TIL至少擴增100倍 (最小 1.3×10^7 個活細胞)

【1903】當在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養時，評估照射劑量是否足以使MNC飼養細胞無

法複製。如藉由在REP的第7天及第14天藉由自動細胞計數測定的總活細胞計數(TVC)來評估複製無能。

【1904】驗收準則為「無生長」意謂在第7天及第14天，總活細胞數目尚未自REP第0天投入培養的初始活細胞數目增加。

【1905】評估飼養細胞支持TIL擴增之能力。自REP之第0天開始培養至REP至第7天，根據活細胞的倍數擴增來量測TIL生長。在第7天，如藉由自動細胞計數所評估，TIL培養物達成最小100倍擴增(亦即超過REP第0天投入培養物中之總活TIL細胞數目的100倍)。

【1906】不符合驗收準則的MNC飼養細胞批次的應急測試。在MNC飼養細胞批次不滿足以上概述之驗收準則中之任一者的情況下，將採取以下步驟重新測試批次，以排除簡單的實驗者錯誤作為其原因。

【1907】若存在該批次之兩個或更多個剩餘衛星測試小瓶，則再測試該批次。若批次中存在一個或不存在剩餘衛星測試小瓶，則根據上文所列之驗收準則該批次不合格。

【1908】為了合格，所討論批次及對照批次必須達成以上驗收準則。在符合此等準則之後，釋放批次以供使用。

實例4：製備IL-2儲備溶液

【1909】此實例描述將經純化之凍乾重組人類介白素

-2溶解於適合用於其他組織培養方案(包括本申請案及實例中所描述之所有彼等方案)之儲備樣本中的過程，包括涉及使用rhIL-2之彼等過程。

【1910】程序。製備0.2%乙酸溶液(HAc)。將29 mL無菌水轉移至50 mL錐形管中。向50 mL錐形管中添加1 mL 1N乙酸。藉由倒轉管2至3次進行充分混合。藉由使用Steriflip過濾器對HAc溶液進行滅菌。

【1911】在PBS中製備1% HSA。在150 mL無菌過濾器單元中，向96 mL PBS中添加4 mL 25%HSA儲備溶液。過濾溶液。儲存於4℃下。針對製備的每一小瓶rhIL-2，填寫表格。

【1912】製備rhIL-2儲備液(6×10^6 IU/mL最終濃度)。每一批次之rhIL-2不同，且所需資訊見於製造商之分析證書(COA)，諸如：1)每小瓶rhIL-2之質量(mg)、2)rhIL-2之比活性(IU/mg)及3)推薦0.2% HAc復原體積(mL)。

【1913】使用以下公式計算rhIL-2批次所需的1% HSA之體積：

$$\left(\frac{\text{小瓶質量}(mg)\ x\ \text{生物活性}\left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\text{體積}(mL) = 1\%\ HSA\text{體積}(mL)$$

【1914】舉例而言，根據rhIL-2批次10200121(Cellgenix)之COA，1 mg小瓶之比活性為25×10^6 IU/mg。推薦於2 mL 0.2% HAc中復原rhIL-2。

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\frac{IU}{mg}}{6x10^6\frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【1915】用酒精擦拭物擦拭IL-2小瓶之橡膠塞。使用連接於3 mL注射器之16G針頭，將推薦體積之0.2% HAc注入小瓶中。請小心不要在拔出針頭時取開塞子。將小瓶倒轉3次且旋動直至所有粉末溶解為止。小心地取下塞子並擱置於酒精擦拭物上。向小瓶中添加所計算體積之1% HSA。

【1916】儲存rhIL-2溶液。對於短期儲存(< 72小時)，將小瓶儲存於4℃下。對於長期儲存(> 72小時)，將小瓶等分成較小體積，且在準備使用之前儲存於-20℃下之冷凍小瓶中。避免冷凍/解凍循環。在製備日期之後6個月結束。Rh-IL-2標籤包括供應商及目錄號、批號、過期日期、操作員首字母縮寫、濃度及等分體積。

實例5：冷凍保存過程

【1917】此實例描述使用CryoMed受控速率冷凍機型號7454(Thermo Scientific)對利用本文所描述之程序製備的TIL進行冷凍保存過程的方法。

【1918】所用設備如下：鋁製卡盒支架(與CS750冷凍袋相容)、用於750 mL袋的冷凍盒、低壓(22 psi)液氮罐、冰箱、熱電偶感測器(帶式袋)及CryoStore CS750冷凍袋(OriGen Scientific)。

【1919】冷凍過程在自成核至-20℃之間提供0.5℃速率且在至-80℃終點溫度之間提供1℃/分鐘之冷卻速率。程式參數如下：步驟1-在4℃下等待；步驟2：1.0℃/min(樣本溫度)達至-4℃；步驟3：20.0℃/min(箱室溫度)達至-45℃；步驟4：10.0℃/min(箱室溫度)達至-10.0℃；步驟5：0.5℃/min(箱室溫度)達至-20℃；且步驟6：1.0℃/min(樣本溫度)達至-80℃。

實例6：利用確定培養基之腫瘤擴增過程

【1920】用相應確定培養基(例如CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM，賽默飛世爾，包括例如DM1及DM2)替代CM1及CM2培養基來進行揭示於以上之過程。

實例7：冷凍保存TIL細胞療法之例示性GEN 2生產

【1921】此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current Good Tissue Practices)及當前優良製造規範(current Good Manufacturing Practices)在G-REX培養瓶中進行Iovance Biotherapeutics公司的TIL細胞療法過程的cGMP製造。此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current Good Tissue Practices)及當前優良製造規範(current Good Manufacturing Practices)在G-Rex培養瓶中進行TIL細胞療法過程的例示性cGMP製造。

表 38. 過程擴增例示性計劃。

估計天數 (接種後)	活性	目標準則	預期容器	估計總體積 (mL)
0	腫瘤分割	每 G-REX-100MCS ≤ 50 個所需腫瘤碎片	G-REX-100MCS 1 培養瓶	≤1000
11	REP 接種	每 G-REX-500MCS 5- 200 × 10^6 個活細胞	G-REX-500MCS 1 培養瓶	≤5000
16	REP 分瓶	每 G-REX-500MCS 1 × 10^9 個活細胞	G-REX-500MCS ≤5 培養瓶	≤25000
22	收集	可獲得細胞總數	3 至 4 個 CS-750 袋	≤530

表 39. 培養瓶體積。

培養瓶類型	工作 體積/培養瓶 (mL)
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【1922】第0天CM1培養基製備。在BSC中，向RPMI 1640培養基瓶添加試劑。添加以下試劑t，每瓶添加：加熱不活化人類AB血清(100.0 mL)；GlutaMax™(10.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL(1.0 mL)；2-巯基乙醇(1.0 mL)

【1923】自BSC取出不必要之材料。自BSC分發培養基試劑，將硫酸建它黴素及HBSS保留在BSC以用於調配洗滌培養基製備。

【1924】解凍IL-2等分試樣。解凍一個1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。記錄IL-2：批號及有效期

【1925】將IL-2儲備液轉移至培養基中。在BSC中，將1.0 mL IL-2儲備液轉移至準備之CM1第0天培養基瓶中。添加CM1第0天培養基1瓶及IL-2(6×10^6 IU/mL)1.0 mL。

【1926】將G-REX100MCS傳遞至BSC中。將G-REX100MCS(W3013130)無菌傳遞至BSC中。

【1927】將所有完全CM1第0天培養基泵吸至G-REX100MCS培養瓶中。組織碎片錐形管或GRex100MCS。

【1928】第0天腫瘤洗滌培養基製備。在BSC中，將5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)添加至1x500 mL HBSS培養基(W3013128)瓶中。每瓶添加：HBSS(500.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL(5.0 mL)。經由1L 0.22微米過濾器單元(W1218810)製備含有建它黴素之經過濾HBSS。

【1929】第0天腫瘤處理。獲得腫瘤試樣且立即轉移至2-8℃下之套件中進行處理。等分腫瘤洗滌培養基。使用8''鑷子(W3009771)進行腫瘤洗滌1。自試樣瓶移出腫瘤且轉移至所製備之「洗滌1」培養皿中。此隨後為腫瘤洗滌2及腫瘤洗滌3。量測且評估腫瘤。評定是否觀測到整個腫瘤面積之> 30%壞死及/或為脂肪組織。在適用時清潔解剖。若腫瘤較大且觀測到>30%組織外表壞死/為脂肪，則藉由使用解剖刀及/或鑷子之組合移除壞死/脂肪組織並同時保留腫瘤內部結構來進行「清除分割」。解剖腫瘤。使用解剖刀及/或鑷子之組合，將腫瘤試樣切割成偶數個適當大小之碎片(至多6個中間碎片)。轉移中間腫瘤碎片。將腫瘤碎片分割成大小大致為3x3x3 mm之片。儲存中間碎片以防脫水。重複中間碎片分割。測定收集之小塊數目。若僅保留所需組織，則自「有利中間碎片」6孔盤選擇另

外的有利腫瘤碎片來填充丟棄碎片，使得最多達50個碎片。

【1930】準備錐形管。將腫瘤片轉移至50 mL錐形管中。製備用於G-REX100MCS之BSC。自培育箱移除G-REX100MCS。將G-REX100MCS培養瓶無菌傳遞至BSC中。將腫瘤碎片添加至G-REX100MCS培養瓶中。使小塊均勻分佈。

【1931】按以下參數使G-REX100MCS保溫：使G-REX培養瓶保溫：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。計算：保溫時間；下限=保溫時間+252小時；上限=保溫時間+276小時。

【1932】過程完成後，捨棄所有剩餘已升溫培養基並解凍IL-2之等分試樣。

【1933】第11天-培養基製備監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。

【1934】在培育箱中使3×1000 mL RPMI 1640培養基(W3013112)瓶及3×1000 mL AIM-V(W3009501)瓶升溫≥30分鐘。自培育箱移除RPMI 1640培養基瓶。準備RPMI 1640培養基瓶。過濾培養基。解凍3×1.1 mL IL-2等分試樣(6×106 IU/mL)(BR71424)。自培育箱中取出AIM-V培養基。將IL-2添加至AIM-V中。將10 L Labtainer袋及中繼泵轉移裝置無菌轉移至BSC中。

【1935】準備10 L Labtainer培養基袋。準備Baxa泵。

準備10L Labtainer培養基袋。將培養基泵吸至10 L Labtainer中。自Labtainer袋取下自動泵吸管。

【1936】混合培養基。輕緩地揉按袋子以進行混合。依據取樣計劃對培養基進行取樣。移除20.0 mL培養基並置於50 mL錐形管中。製備細胞計數稀釋液管。在BSC中，向四個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。將試劑自BSC轉移至2至8℃下。準備1 L轉移包。在BSC外部，將1L轉移包熔接(依據過程註釋5.11)至附接於所準備的「完全CM2第11天培養基」袋的轉移裝置上。準備飼養細胞轉移包。培育完全CM2第11天培養基。

【1937】第11天-TIL收集預處理表格。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱移除G-REX100MCS。準備300 mL轉移包。將轉移包熔接至G-REX100MCS。

【1938】準備用於TIL收集之培養瓶且起始TIL收集。收集TIL。使用GatheREX，透過血液過濾器將細胞懸浮液轉移至300 mL轉移包中。檢查膜上之黏附細胞。

【1939】沖洗培養瓶膜。閉合G-REX100MCS上之夾子。確保所有夾子閉合。熱封TIL及「上清液」轉移包。計算TIL懸浮液之體積。準備用於取樣之上清液轉移包。

【1940】抽取Bac-T樣本。在BSC中，自1L「上清液」轉移包中吸取約20.0 mL上清液，並分配至無菌的50 mL錐形管中。

【1941】依據取樣計劃接種BacT。使用適當大小之注射器自準備的標記有BacT之50 mL錐形管移除1.0 mL樣本且接種於厭氧瓶。

【1942】培育TIL。在需要之前將TIL轉移包置於培育箱中。進行細胞計數及演算。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。存活率÷2。活細胞濃度÷2。測定計數之上限及下限。下限：活細胞濃度平均值×0.9。上限：活細胞濃度平均×1.1。確認兩個計數在可接受界限內。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。

【1943】調整TIL懸浮液之體積：計算移除細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積(A)。取出的細胞計數樣本之體積(4.0 mL)(B)經調整TIL細胞總體積C = A - B。

【1944】計算活TIL細胞總數。平均活細胞濃度*：總體積；活細胞總數：C = A×B。

【1945】流動式細胞測量術之計算：若活TIL細胞總計數為≥4.0×10^7，則計算獲得用於流動式細胞測量術樣本的1.0×10^7個細胞的體積。

【1946】流動式細胞測量術所需之活細胞總數：1.0×10^7個細胞。流動式細胞測量術所需之細胞體積：活細胞濃度除以1.0×10^7個細胞A。

【1947】計算等於2.0×10^8個活細胞的TIL懸浮液之體積。按需要，計算待取出的過量TIL細胞體積，且取出過

量TIL並按需要將TIL置於培育箱中。計算按需要取出之過量TIL總量。

【1948】將以供冷凍之目標細胞濃度添加至過量TIL細胞的CS-10培養基之計算量為1.0×10^8個細胞/mL。按需要使過量TIL離心。觀測錐形管並添加CS-10。

【1949】填充小瓶。將1.0 mL細胞懸浮液等分至適當大小之冷凍小瓶中。將剩餘體積等分至適當大小之冷凍小瓶中。如果體積≤0.5 mL，將CS10添加至小瓶中，直至體積為0.5 mL。

【1950】計算獲得用於冷凍保存之1×10^7個細胞所需之細胞體積。取出樣本以進行冷凍保存。將TIL置於培育箱中。

【1951】樣本之冷凍保存。觀測錐形管，且緩慢添加CS-10且記錄添加0.5 mL CS10之體積。

【1952】第11天-飼養細胞獲得飼養細胞。自LN2冷凍機獲得至少兩個不同批號的3袋飼養細胞。在準備解凍之前將細胞保存於乾冰上。準備水浴或cryotherm。在37.0±2.0℃於水浴或cytotherm處解凍飼養細胞約3至5分鐘或直至冰剛好消失為止。自培育箱移除培養基。合併解凍之飼養細胞。將飼養細胞添加至轉移包。將飼養細胞自注射器分配至轉移包中。對合併飼養細胞進行混合，且標記轉移包。

【1953】計算轉移包中之飼養細胞懸浮液之總體積。移除細胞計數樣本。針對各樣本使用單獨的3 mL注射器，

使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包抽吸4×1.0 mL細胞計數樣本。將每個樣本等分至經標記之冷凍小瓶中。進行細胞計數，且判定乘數選定方案且輸入乘數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上部及下限，並確認其在界限內。

【1954】調整飼養細胞懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。計算活飼養細胞總數。按需要獲得另外的飼養細胞。按需要解凍另外的飼養細胞。將第4飼養細胞袋置於拉鏈袋中，且在37.0±2.0℃水浴或cytotherm中解凍約3至5分鐘並合併另外的飼養細胞。量測體積。量測注射器中飼養細胞之體積並記錄在下面(B)。計算飼養細胞之新的總體積。將飼養細胞添加至轉移包。

【1955】按需要製備稀釋液，將4.5 mL AIM-V培養基添加至四個15 mL錐形管中。準備細胞計數。針對各樣本使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包取出4×1.0 mL細胞計數樣本。進行細胞計數及演算。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。調整飼養細胞懸浮液之體積，且計算取出細胞計數樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。飼養細胞總體積減去取出之4.0 mL。計算獲得$5x10^9$個活飼養細胞所需的飼養細胞懸浮液之體積。計算過量飼養細胞體積。計算待取出之過量飼養細胞之體積。取出過量飼養細胞。

【1956】使用1.0 mL注射器及16G針頭，吸取0.15 mL

OKT3且添加OKT3。熱封飼養細胞懸浮液轉移包。

【1957】第11天G-REX填充及接種設置G-REX500MCS。自培育箱移除「完全CM2第11天培養基」並將培養基泵吸至G-REX500MCS中。將4.5 L培養基泵吸至G-REX500MCS中，填充至培養瓶上標示之線處。按需要熱封並使培養瓶保溫。將飼養細胞懸浮液轉移包熔接至G-REX500MCS。將飼養細胞添加至G-REX500MCS。熱封。將TIL懸浮液轉移包熔接至培養瓶。將TIL添加至G-REX500MCS。熱封。將G-REX500MCS在37.0±2.0℃下保溫，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。

【1958】計算保溫範圍。進行計算以確定在第16天自培育箱取出G-REX500MCS的適當時間。下限：保溫時間+108小時。上限：保溫時間+132小時。

【1959】第11天過量TIL冷凍保存。適用：冷凍過量TIL小瓶。確證在冷凍前已設定CRF。進行冷凍保存。將小瓶自速率受控冷凍機轉移至適當儲存件中。完成冷凍後，將小瓶自CRF轉移至適當儲存容器。將小瓶轉移至適當儲存件中。記錄在LN2中的儲存位置。

【1960】第16天培養基製備預熱AIM-V培養基。針對培養基袋1、2及3計算使培養基升溫的時間。確保所有袋子已升溫12至24小時之持續時間。設定用於上清液之10L Labtainer。使用魯爾接頭將流體泵轉移裝置之較大直徑端附接至10L Labtainer袋之一個凹形端口。設定用於上清液之10L Labtainer並進行標記。設定用於上清液之10L

Labtainer。確保在自BSC之前取出前閉合所有夾子。注意：在TIL收集期間使用上清液袋，該TIL收集可與培養基製備並行地進行。

【1961】解凍IL-2。每袋CTS AIM V培養基解凍5x1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。等分100.0 mL GlutaMax™。向GlutaMax™中添加IL-2。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。多級Baxa泵。準備調配培養基。將GlutaMax™ +IL-2泵吸至袋中。監測參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使完全CM4第16天培養基升溫。製備稀釋液。

【1962】第16天 REP分瓶。監測培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱移除G-REX500MCS。準備1 L轉移包且標記為TIL懸浮液並稱重為1 L。

【1963】G-REX500MCS之體積減少。將約4.5 L培養上清液自G-REX500MCS轉移至10 L Labtainer。

【1964】準備用於TIL收集之培養瓶。取出上清液後，閉合通向紅色管線之所有夾子。

【1965】起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以使細胞剝離，且確保所有細胞剝落。

【1966】TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液轉移包之所有夾子。使用GatheRex，將細胞懸浮液轉移至TIL懸浮液轉移包中。注意：確保維持邊緣傾斜，直至收集到所有細胞

及培養基為止。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-REX500MCS上之夾子。熱封含有TIL之轉移包。熱封含有上清液之10L Labtainer。記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算懸浮液體積。準備用於樣本取出之轉移包。自細胞上清液取出測試樣本。

【1967】無菌及BacT測試取樣。自製備之15 mL錐形標記之BacT移除1.0 mL樣本。移除細胞計數樣本。在BSC中，針對各樣本使用單獨的3 mL注射器，自「TIL懸浮液」轉移包移除4×1.0 mL細胞計數樣本。

【1968】移除黴漿菌樣本。使用3 mL注射器，自TIL懸浮液轉移包移除1.0 mL並置於準備的標記有「黴漿菌稀釋劑」之15 mL錐形管中。

【1969】準備用於接種之轉移包。將TIL置於培育箱中。自BSC取出細胞懸浮液，且在需要之前置於培育箱中。進行細胞計數及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣本進行稀釋，得到稀釋度為1:10。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：稀釋可以根據預期的細胞濃度進行調整。自進行的所有四次計數中確定平均活細胞濃度。調整TIL懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積減去取出以用於測試之5.0 mL。

【1970】計算活TIL細胞總數。計算待接種之培養瓶之總數目。注意：待接種的G-REX500MCS培養瓶之最大

數目為五。若計算的待接種培養瓶之數目超過五，則使用可用的所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。

【1971】計算用於繼代培養之培養瓶數目。計算除所準備之袋子以外還需要之培養基袋的數目。按計算需要每兩個G-REX-500M培養瓶準備一個10 L「CM4第16天培養基」袋。繼續接種第一GREX-500M培養瓶，同時準備另外的培養基並使其升溫。準備確定的所計算數目之其他培養基袋並使其升溫。填充G-REX500MCS。準備泵吸培養基並將4.5 L培養基泵吸至G-REX500MCS中。熱封。重複填充。使培養瓶保溫。計算待添加至新G-REX500MCS培養瓶中的TIL懸浮液之目標體積。若計算之培養瓶數目超過五，則使用所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。準備用於接種之培養瓶。自培育箱移除G-REX500MCS。準備用於泵吸之G-REX500MCS。除較大過濾器管線外，閉合所有夾子。自培育箱取出TIL。製備用於接種之細胞懸浮液。將「TIL懸浮液」轉移包無菌熔接(依據過程註釋5.11)至泵入口管線。將TIL懸浮液袋置於稱上。

【1972】用TIL懸浮液接種培養瓶。泵吸所計算體積之TIL懸浮液至培養瓶中。熱封。填充剩餘培養瓶。

【1973】監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使培養瓶保溫。

【1974】測定在第22天自培育箱移除G-REX500MCS的時間範圍。

【1975】第22天洗滌緩衝液製備。準備10L Labtainer袋。在BSC中，經由魯爾接頭將4''血漿轉移裝置附接至10L Labtainer袋。準備10L Labtainer袋。在轉移出BSC之前，閉合所有夾子。注意：為待進行收集之每兩個G-REX500MCS培養瓶準備一個10L Labtainer袋。將Plasmalyte泵吸至3000 mL袋中，且藉由翻轉泵及操控袋子之位置來自3000 mL Origen袋去除空氣。將25%的人類白蛋白添加至3000 mL袋中。獲得最終體積為120.0 mL的人類白蛋白25%。

【1976】製備IL-2稀釋劑。使用10 mL注射器，使用LOVO洗滌緩衝液袋上之無針注入口移除5.0 mL LOVO洗滌緩衝液。將LOVO洗滌緩衝液分配至50 mL錐形管中。

【1977】等分CRF空白袋LOVO洗滌緩衝液。使用100 mL注射器，自無針注入口吸取70.0 mL LOVO洗滌緩衝液。

【1978】解凍一份1.1 mL IL-2(6×106 IU/mL)，直至所有冰融化為止。將50 μL IL-2儲備液(6×10^6 IU/mL)添加至標記為「IL-2稀釋劑」的50 mL錐形管中。

【1979】冷凍保存準備。將5個冷凍盒置於2至8℃下，以對其進行預處理，以便用於最終產物冷凍保存。

【1980】製備細胞計數稀釋液。在BSC中，向4個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。準備細胞計數。將4個冷凍小瓶標記上小瓶編號(1至4)。將小瓶保存在BSC以供使

用。

【1981】第22天TIL收集。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37±2.0℃，CO_2百分比：5%±1.5%。自培養箱中移除G-REX500MCS培養瓶。準備TIL收集袋並進行標記。封閉額外之接頭。體積減少：將約4.5 L上清液自G-REX500MCS轉移至上清液袋。

【1982】準備用於TIL收集之培養瓶。起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以剝離細胞。確保所有細胞已剝落。起始TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液收集袋之所有夾子。TIL收集。使用GatheREX，將TIL懸浮液轉移至3000 mL收集袋中。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G- Rex500MCS上之夾子，並確保閉合所有夾子。將細胞懸浮液轉移至LOVO來源袋中。閉合所有夾子。熱封。移除4x1.0 mL細胞計數樣本

【1983】進行細胞計數。利用NC-200及過程註釋5.14進行細胞計數及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣本進行稀釋。得到1:10稀釋度。測定進行細胞計數之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。測定計數之上限及下限。測定進行細胞計數之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。稱量LOVO來源袋。計算活TIL細胞總數。計算成核細胞總數。

【1984】製備黴漿菌稀釋劑。經由魯爾樣本口自一個上清液袋移除10.0 mL並置於15 mL錐形管中。

【1985】進行「TIL G-REX收集」方案並測定最終產物目標體積。裝載一次性套組。取出濾液袋。輸入濾液容量。將濾液容器置於實驗台上。附接PlasmaLyte。確證已附接PlasmaLyte，且觀測到PlasmaLyte正在移動。將來源容器附接至導管，且確證已附接來源容器。確認PlasmaLyte正在移動。

【1986】最終調配及填充。目標體積/袋子計算。計算待調配於空白袋中之CS-10及LOVO洗滌緩衝液的體積。準備CRF空白袋。

【1987】計算待添加至最終產物的IL-2之體積。所需最終IL-2濃度(IU/mL)-300IU/mL。IL-2工作儲備：6×10^4 IU/mL。組裝連接設備。將4S-4M60無菌熔接至CC2單元接頭。將CS750冷凍袋無菌熔接至製備之線束上。將CS-10袋熔接至4S-4M60之尖端上。用IL-2製備TIL。使用適當大小之注射器，自「IL-2 6×10^4」等分試樣取出所測定量之IL-2。標記經調配TIL袋。將經調配TIL袋添加至設備。添加CS10。切換注射器。將約10 mL空氣吸取至100 mL注射器中並替換設備上之60 mL注射器。添加CS10。準備CS-750袋。分配細胞。

【1988】自最終產物袋移除空氣並獲得保留物。一旦已填充最後一個最終產物袋，即閉合所有夾子。將10 mL空氣吸取至新的100 mL注射器中且更換設備上的注射器。將保留物分配至50 mL錐形管中，且將管標記為「保留物」及批號。針對每個袋子重複空氣移除步驟。

【1989】準備用於冷凍保存之最終產物，包括目視檢查。在冷凍保存之前將冷凍袋保存於降溫包上或2至8℃下。

【1990】移除細胞計數樣本。使用適當大小之移液管，取出2.0 mL保留物並置於15 mL錐形管中以用於細胞計數。進行細胞計數及演算。注意：僅將一個樣本稀釋至確證稀釋度足夠的適當稀釋度。將另外的樣本稀釋至適當稀釋因數並繼續進行計數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。測定活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。計算IFN-γ。熱封最終產物袋。

【1991】依據以下例示性取樣計劃標記並收集樣本。

表40. 樣本計劃。

樣本	容器之數目	各添加之樣本體積	容器類型
*黴漿菌	1	1.0 mL	15 mL 錐形管
內毒素	2	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
革蘭氏染色	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
IFN-γ	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
流動式細胞測量術	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T 瓶
QC 保留物	4	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
衛星小瓶	10	0.5 mL	2 mL 冷凍小瓶

【1992】無菌及BacT測試。測試取樣。在BSC中，自

使用適當大小之注射器收集的保留細胞懸浮液中移除1.0 mL樣本，並接種厭氧瓶。對好氧瓶重複以上操作。

【1993】最終產物冷凍保存準備速率受控冷凍機(CRF)。確證已設定CRF。設定CRF探針。將最終產物及樣本置於CRF中。測定要達至4℃ ±1.5℃所需的時間並繼續進行CRF運行。完成CRF並儲存。完成運行後停止CRF。自CRF取出盒子及小瓶。將盒子及小瓶轉移至氣相LN2進行儲存。記錄儲存位置。

【1994】最終藥品之處理及分析包括以下測試：(第22天)藉由流動式細胞測量術測定第22天REP天之CD3+細胞；(第22天)革蘭氏染色方法(GMP)；(第22天)藉由凝膠凝塊LAL分析(GMP)進行細菌內毒素測試；(第16天)BacT無菌性分析(GMP)；(第16天)TD-PCR(GMP)檢測黴漿菌DNA；可接受外觀特質；(第22天)BacT無菌分析(GMP)(第22天)；(第22天)IFN-γ分析。如本文所描述之其他效力分析亦用於分析TIL產物。

實例8：GEN 3擴增平台之例示性實施例

第0天

【1995】製備的腫瘤洗滌培養基。培養基在開始前加熱。將5 mL建它黴素(50 mg/mL)添加至500 mL HBSS瓶中。將5mL腫瘤洗滌培養基添加至15 mL錐形瓶中，用於OKT3稀釋。準備飼養細胞袋。將飼養細胞無菌轉移到飼養細胞袋中且儲存在37℃下直至使用或冷凍。若在37℃

下，計數飼養細胞。若冷凍，則解凍然後計數飼養細胞。

【1996】飼養細胞濃度之最佳範圍在5×10^4及5×10^6個細胞/mL之間。製備具有4.5 mL AIM-V之四個錐形管。添加0.5 mL細胞分數用於各細胞計數。若總活飼養細胞數≥1×10^9個細胞，則進行調節飼養細胞濃度。計算自第一飼養細胞袋中移除的飼養細胞體積，以便將1×10^9個細胞添加至第二飼養細胞袋中。

【1997】使用p1000微量移液管，將900 μL的腫瘤洗滌培養基轉移至OKT3等分試樣(100 μL)中。使用注射器及無菌技術，抽取0.6 mL之OKT3且添加至第二飼養細胞袋中。調整培養基體積至2 L之總體積。將第二飼養細胞袋轉移至培育箱。

【1998】OKT3調配物詳情：OKT3可等分且冷凍於100 μL等分試樣中之小瓶(1 mg/mL)之原始儲備濃度中。每1 mL小瓶約10x等分試樣。儲存於-80℃下第0天：15 μg/培養瓶，亦即30 ng/mL在500 mL-60 μL最大約1等分試樣中。

【1999】將5 mL腫瘤洗滌培養基添加至標記為多餘腫瘤塊的6孔盤的所有孔中。保存腫瘤洗滌培養基，以進一步用於在分割過程中保持腫瘤水分。將50 mL腫瘤洗滌培養基添加至各100 mm皮氏培養皿中。

【2000】在解剖培養皿蓋下用直尺作為參考，將腫瘤分割成大約27 mm^3之碎片(3x3x3 mm)。解剖中間碎片，直到達到60個碎片。根據所產生之最終碎片之數目(每個培養瓶通常60個碎片)對最終碎片之總數目進行計數且製備

G-REX-100MCS培養瓶。

【2001】在標記為碎片管1至碎片管4的錐形管中保留有利的組織碎片。根據發起的碎片管的計數要接種飼養細胞懸浮液之G-REX-100MCS培養瓶的數目。

【2002】自培育箱中移除飼養細胞袋且接種G-REX-100MCS。標記為D0(第0天)。

【2003】在G-REX-100 MCS中向培養物中添加腫瘤碎片。在無菌條件下，擰開標有腫瘤碎片培養物(D0)1的 G-REX-100MCS及標有碎片管的50 mL錐形管的蓋子。旋轉打開的碎片管1，且同時輕輕抬起G-REX100MCS的蓋子。在旋轉的同時將帶有碎片的培養基添加至G-REX100MCS。記錄轉移至G-REX100MCS的碎片數目。

【2004】一旦碎片位於GREX培養瓶底部，吸取7 mL培養基且創建七個1 mL等分試樣-5 mL用於擴展表徵，以及2 mL用於無菌樣本。將5等分試樣(最終碎片培養上清液)儲存在-20℃下進行擴展表徵，直至需要為止。

【2005】分別在一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶中各灌輸1 mL最終碎片培養上清液。對取樣的各培養瓶進行重複。

在第7-8天

【2006】準備飼養細胞袋。當冷凍時在37℃水浴中解凍飼養袋3至5分鐘。若冷凍，則計數飼養細胞。飼養細胞濃度之最佳範圍在5×10^4及5×10^6個細胞/mL之間。製備具

有4.5 mL AIM-V之四個錐形管。將各細胞計數的0.5 mL細胞分數添加至新的冷凍小瓶管中。將樣本充分混合並進行細胞計數。

【2007】若總活飼養細胞數≥2×10^9個細胞，則進行下一步驟以調節飼養細胞濃度。計算自第一飼養細胞袋中移除的飼養細胞體積，以便將2×10^9個細胞添加至第二飼養細胞袋中。

【2008】使用p1000微量移液管，將900 μL的HBSS轉移至100μL OKT3等分試樣中。藉由上下移液3次進行混合。製備兩個等分試樣。

【2009】OKT3調配物詳情：OKT3可等分且冷凍於100 μL等分試樣中之小瓶(1 mg/mL)之原始儲備濃度中。每1 mL小瓶約10x等分試樣。儲存於-80℃下第7/8天：30 μg/培養瓶，亦即60 ng/mL在500 mL-120 μl最大約2等分試樣中。

【2010】使用注射器及無菌技術，抽取0.6 mL之OKT3且添加至飼養細胞袋中，確保全部添加。將培養基體積調整為2 L的總體積。用第二OKT3等分試樣重複且添加至飼養細胞袋中。將第二飼養細胞袋轉移至培育箱。

【2011】用飼養細胞懸浮液製備G-REX100MCS培養瓶。根據第0天生成之G-REX培養瓶之數目記錄要處理的G-REX-100MCS培養瓶的數目。自培育箱中移除G-REX培養瓶且從培育箱中移除第二飼養細胞袋。

【2012】在添加飼養細胞懸浮液之前移除上清液。將

一個10 mL注射器連接至G-REX100培養瓶且抽取5 mL培養基。創建五個1 mL等分試樣-5 mL用於擴展表徵，且將5個等分試樣(最終碎片培養上清液)儲存在-20℃用於擴展表徵，直至發起人提出要求。對各G-REX100培養瓶進行標記及重複。

【2013】5-20×1 mL樣本用於表徵，取決於培養瓶的數目：

- 5 mL = 1個培養瓶
- 10 mL = 2個培養瓶
- 15 mL = 3個培養瓶
- 20 mL = 4個培養瓶

【2014】繼續將飼養細胞接種至G-REX100 MCS中，且針對各G-REX100 MCS培養瓶重複。使用無菌轉移方法，將500 mL的第二飼養細胞袋按重量(假設1 g=1 mL)重力轉移至各G-REX-100MCS培養瓶中且記錄量。標記為第7天培養且對各G-REX100培養瓶進行重複。將G-REX-100MCS培養瓶轉移至培育箱。

第10-11天

【2015】移除第一個G-REX-100MCS培養瓶，且在無菌條件下使用10 mL注射器移除7 mL預處理培養上清液。產生七個1 mL等分試樣-5 mL用於擴展表徵且2 mL用於無菌樣本。

【2016】小心地混合培養瓶且使用新的10 mL注射器

移除10 mL上清液且轉移至標記為D10/11黴漿菌上清液的15 mL管中。

【2017】小心地混合培養瓶且使用新注射器根據待處理的培養瓶數量移除以下體積：

- 1個培養瓶 = 40 mL
- 2個培養瓶 = 20 mL/培養瓶
- 3個培養瓶 = 13.3 mL/培養瓶
- 4個培養瓶 = 10 mL/培養瓶

【2018】應自所有培養瓶中取出總共40 mL，且彙集在標有「第10/11天QC樣本」的50 mL錐形管中，且儲存在培育箱中直至需要。進行細胞計數且分配細胞。

【2019】將5等分試樣(預處理培養上清液)儲存在≤-20℃下進行擴展表徵，直至需要為止。分別在一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶中各灌輸1 mL預處理培養上清液。

【2020】繼續將細胞懸浮液轉移至G-REX-500MCS且針對各G-REX-100MCS進行重複。使用無菌條件，將各G-REX-100MCS之內容物轉移至G-REX-500MCS中，每次監測約100 mL液體轉移。當G-REX-100MCS之體積減小至500 mL時停止轉移。

【2021】在轉移步驟期間，使用10 mL注射器且自G-REX-100MCS抽吸10 mL細胞懸浮液至注射器中。根據培養瓶的數目按照說明書進行操作。若僅1個培養瓶：總共使用兩個注射器移除20 mL。若2個培養瓶：每培養瓶移除

10 mL。若3個培養瓶：每培養瓶移除7 mL。若4個培養瓶：每培養瓶移除5 mL。將細胞懸浮液轉移至一個常見的50 mL錐形管。保持在培育箱中直至細胞計數步驟及QC樣本。QC所需之細胞總數目為約20e6個細胞：4×0.5 mL細胞計數(細胞計數首先未稀釋)。

【2022】分析所需之細胞量如下：

1. 最少10×10^6個細胞用於效力分析，諸如本文所描述之彼等分析，或用於IFN-γ或顆粒酶B分析

2. 1×10^6個細胞用於黴漿菌

3. 5×10^6個細胞用於CD3+/CD45+的流動式細胞測量術

【2023】將G-REX-500MCS培養瓶轉移至培育箱。

【2024】製備QC樣本。在此實施例中，分析需要至少15×10^8個細胞。分析包括：細胞計數及存活率；黴漿菌(1×10^6個細胞/平均存活濃度)；流動式細胞測量術(5×10^6個細胞/平均存活濃度)；及IFN-g分析(5×10^6個細胞-1×10^6個細胞；8-10×10^6個細胞為IFN-γ分析所需。

【2025】計算10×10^6個細胞/mL之冷凍保存之細胞分數的體積，且計算用以製備之小瓶的數目

第16-17天

【2026】洗滌緩衝液製備(1% HSA Plasmalyte A)。將HSA及Plasmalyte轉移至5 L袋中以製作LOVO洗滌緩衝液。使用無菌條件將總體積為125 mL的25% HSA轉移至5

L袋中。移除且將10 mL或40 mL洗滌緩衝液轉移至「IL-2 6×10^4 IU/mL管」中(若預先製備IL-2，則為10 mL，或若新鮮製備IL-2，則為40 mL)。

【2027】計算添加至Plasmalyte+1% HSA中的經復原IL-2的體積：經復原IL-2的體積=(IL-2的最終濃度×最終體積)/IL-2的比活性(基於標準分析)。IL-2之最終濃度為6×10^4 IU/mL。最終體積為40 mL。

【2028】移除了復原IL-2所需的IL-2的計算初始體積，且轉移至「IL-2 6×10^4 IU/mL」管中。將來自預先製備之等分試樣的100 µL IL-2 6x10^6 IU/mL添加至含有10 mL LOVO洗滌緩衝液之標記為「IL-2 6×10^4 IU/mL」的管中。

【2029】自G-REX-500MCS培養瓶移除約4500 mL上清液。旋轉剩餘的上清液且將細胞轉移至細胞收集池袋中。對所有G-REX-500MCS培養瓶重複。

【2030】移除60 mL上清液且添加至上清液試管中用於品質對照分析，包括黴漿菌偵測。儲存於+2-8℃。

【2031】細胞收集計數細胞。用4.5 mL的AIM-V製備四個15 mL錐形管。此等可預先準備。最佳範圍=介於5×10^{4}及5×10^{6}個細胞/mL之間。(推薦1:10稀釋度)。對於1:10稀釋度，向先前製備之4500 µL AIM V，添加500 µL CF。記錄稀釋因數。

計算預LOVO(存活+死亡)的TC(總細胞)=

平均總細胞

濃度(預LOVO TC濃度)

(存活+死亡)

X

源袋之體積

計算預LOVO(存活)的TVC(總活細胞)=

平均總活細胞

濃度(預LOVO TVC)

(存活)

X

LOVO源袋之體積

【2032】當總細胞(TC)數目> 5×10^9時，移除5×10^8個細胞以冷凍保存為MDA保留樣本。5×10^8÷平均TC濃度(步驟14.44)=待移除之體積。

【2033】當總細胞(TC)數目≤5×10^9，移除4×10^6個細胞以冷凍保存為MDA保留樣本。4×10^6÷總TC濃度=待移除之體積。

【2034】當測定總細胞數目時，移除細胞數目應允許保留150×10^9個活細胞。確認預LOVO的TVC 5×10^8或4×10^6或不適用。計算移除的細胞體積。

【2035】計算袋中剩餘的剩餘總細胞。計算預LOVO的TC(總細胞)。[平均總細胞濃度X剩餘體積=TC預LOVO剩餘]

【2036】根據剩餘的細胞之總數目，選擇表41中之對應過程。

表41. 細胞總數目。

總細胞：	*保留物(mL)*
$0 < 總細胞 \leq 31 \times 10^9$	115
$31 \times 10^9 < 總細胞 \leq 71 \times 10^9$	165
$71 \times 10^9 < 總細胞 \leq 110 \times 10^9$	215
$110 \times 10^9 < 總細胞 \leq 115 \times 10^9$	265

【2037】選擇與所用過程相對應的IL-2添加的體積。體積計算為：保留物體積×2×300 IU/mL=所需IL-2的IU。所需IL-2的IU/6×10^4 IU/mL=LOVO袋後添加的IL-2體積。記錄所有添加之體積。在冷凍小瓶中獲得樣本用於進一步分析。

【2038】充分混合細胞產物。密封所有袋以用於進一步處理，適當時包括冷凍保存。

【2039】按需要對獲得的冷凍小瓶樣本進行內毒素、IFN-γ、無菌及其他分析。

實例9：GEN 2及GEN 3例示性過程

【2040】此實例展示Gen 2及Gen 3過程。過程Gen 2及Gen 3 TIL通常由來自個別患者(經由手術切除腫瘤)的自體TIL構成，且然後離體擴增。Gen 3過程之初始第一擴增步驟為在介白素-2(IL-2)及單株抗體OKT3存在下進行細胞培養，該單株抗體OKT3靶向經照射周邊血液單核細胞(PBMC)之支架上的T細胞共受體CD3。

【2041】Gen 2 TIL產品之製造由兩個階段組成：1)預快速擴增(預REP)及2)快速擴增方案(REP)。在預REP期間，將切除的腫瘤切成≤50個各維度為2-3 mm的碎片，此等碎片用含血清的培養基(含有10% HuSAB的RPMI 1640培養基)及6,000 IU/mL之介白素-2(IL-2)培養11天之時段。在第11天，收集TIL且將其引入大規模二級REP擴增中。REP由以下組成：自在5×10^9個經照射的同種異體PBMC飼養細胞的共培養物中活化≤200×10^6個來自預REP的活細胞，該等飼養細胞在5 L體積的補充有3000 IU/mL rhIL-2的CM2中負載有150 μg單株抗CD3抗體(OKT3)持續5天。在第16天，培養物體積減少90%且將細胞部分以≥1×10^9活淋巴球/培養瓶分種至多個G-REX-500培養瓶中，且用CM4補足至5 L。TIL再培育6天。REP在第22天收集，洗滌，調配且冷凍保存，隨後在-150℃下運送至臨床站點進行輸注。

【2042】Gen 3 TIL產品之製造由三個階段組成：1)初始第一擴增方案；2)快速第二擴增方案(亦稱作快速擴增階段或REP)；及3)繼代培養物分種。為了實現初始第一擴增TIL增殖，將切除之腫瘤切成≤120個各維度為2-3 mm的碎片。在初始第一擴增之第0天，在3個100 MCS容器中之每一者中，在大約100 cm^2的表面區域上建立了大約2.5×10^8個同種異體照射的PBMC飼養細胞的飼養層，該等飼養細胞負載有OKT-3。腫瘤碎片分佈在3個100 MCS容器中，各容器用含有500 mL含血清的CM1培養基及6,000 IU/mL的介白素-2(IL-2)及15 ug OKT-3培養7天之時段。在第7天，

REP藉由以下來起始：將約5×10^8個負載有OKT-3之同種異體照射的PBMC飼養細胞的額外飼養細胞層併入至三個100 MCS容器中之每一者的腫瘤碎斷培養階段中且用500 mL CM2培養基及6,000 IU/mL IL-2及30 μg OKT-3培養。藉由使用密閉系統流體將負載OKT3之飼養細胞轉移至100MCS容器中，活化同一容器中的整個初始第一擴增培養物來增強REP起始。對於Gen 3，TIL規模擴大或分裂涉及處理步驟，其中整個細胞培養物經由密閉系統流體轉移而按比例調整至較大容器且轉移(自100 M培養瓶轉移至500 M培養瓶)且添加額外4 L CM4培養基。REP在第16天收集，洗滌，調配且冷凍保存，隨後在-150℃下運送至臨床站點進行輸注。

【2043】總體而言，3過程係一個更短、更可調式且易於修改的擴增平台，將適應穩健製造及過程可比性。

表 50. 例示性**Gen 2** 及例示性**Gen 3** 製造過程之比較。

步驟	過程 (Gen 2)	過程 (Gen 3)
預 REP- 第 0 天	多達 50 個碎片，1 G-REX-100MCS，11 天 在 1 L 之 CM1 培養基中 + IL-2 (6000 IU/mL)	整個腫瘤多達 120 個碎片，均勻分佈在多達 3 個培養瓶中。1 個培養瓶：1-60 個碎片 2 個培養瓶：61-89 個碎片 3 個培養瓶：90-120 個碎片 在 500 mL CM1 培養基中 7 天 + IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 個飼養細胞/培養瓶 15 ug OKT-3/培養瓶
REP 起始	直接用於 REP，第 11 天， <200×10^6 個 TIL (1)G-REX-500MCS 於 5L CM2 培養基中 IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^9 個飼養細胞 150ug OKT-3	直接用於 REP，第 7 天，所有細胞，同一 G-REX-100MCS 添加 500 CM2 培養基 IL-2 (6000 IU/mL) 5×10^8 個飼養細胞/培養瓶 30ug OKT-3/培養瓶
TIL 增殖或規模擴大	體積減少且將細胞分數分裂為至多 5 個 G-REX-500MCS 4.5L CM4 培養基+ IL-2 (3000 IU/mL) $\geq 1\times10^9$ 個 TVC /培養瓶 第 16 天分種	將各 G-REX-100MCS(1L) 轉移至 1 G-REX-500MCS 體積 4L CM4 培養基+IL-2 (3000 IU/mL) 在第 9 天至第 11 天規模擴大
收集	在第 22 天收集， LOVO-自動細胞洗滌器	在第 16 天收集 LOVO-自動細胞洗滌器
最終調配物	冷凍保存產物 300 IU/mL IL2- CS10 於 LN_2 中，多個等分試樣	冷凍保存產物 300 IU/mL IL-2-CS10 於 LN_2 中，多個等分試樣
處理時間	**22 天**	**16 天**

【2044】在第0天，對於兩種過程，腫瘤洗滌3次且將碎片隨機分組且分成兩個池；每個過程一個池。對於Gen 2過程，將碎片轉移至一個具有含有6,000IU/mL rhIL-2的1 L CM1培養基的GREX 100MCS培養瓶中。對於Gen 3過程，將碎片轉移至一個具有含有6,000IU/mL rhIL-2、15 ug

OKT-3及2.5×10^8個飼養細胞的500 mL CM1培養基的G-REX-100MCS培養瓶中。Rep起始天之TIL的接種根據各過程在不同天發生。對於Gen 2過程，其中G-REX-100MCS培養瓶的體積減少了90%，將收集的細胞懸浮液轉移至新的G-REX-500MCS中，以在第11天在含有IL-2(3000 IU/mL)，外加5×10^9個飼養細胞及OKT-3(30 ng/mL)的CM2培養基中開始REP起始。每個方案中細胞在第16天擴增且分裂至多個G-REX-500 MCS培養瓶中，各培養瓶中具有含有IL-2(3000 IU/mL)的CM4培養基。然後在每個方案中的第22天收集培養物且冷凍保存。對於Gen 3過程，REP起始發生在第7天，其中同一G-REX-100MCS用於REP起始。簡言之，向各培養瓶中添加500 mL含有IL-2(6000 IU/mL)及5×10^8個飼養細胞及30 ug OKT-3之CM2培養基。在第9-11天，規模擴大培養物。將整個體積的G-REX100M(1 L)轉移至G-REX-500MCS中，且添加4 L含有IL-2(3000 IU/mL)的CM4。將培養瓶培育5天。收集培養物且在第16天冷凍保存。

【2045】比較中包括三種不同的腫瘤，兩種肺腫瘤(L4054及L4055)及一種黑色素瘤(M1085T)。

【2046】CM1(培養基1)、CM2(培養基2)及CM4(培養基4)培養基係預先製備的，且保持在4℃下用於L4054及L4055。CM1及CM2培養基未經過濾製備，以比較具有及不具有培養基過濾的細胞生長。

【2047】對於L4055腫瘤，在REP起始及規模擴大

時，將培養基在37℃下溫熱至多24小時。

【2048】結果.Gen 3的結果為在Gen 2實現的總活細胞數的30%以內。Gen 3最終產物展現再刺激之後較高之IFN-γ的產量。如藉由存在之總獨特CDR3序列所量測，Gen 3最終產物展現增加的純系多樣性。Gen 3最終產物展現較長平均端粒長度。

【2049】Gen 2及Gen 3過程之預REP及REP擴增遵循上文所描述之程序。對於各腫瘤，兩個池含有相等數目之碎片。歸因於腫瘤之較小尺寸，無法達成每個培養瓶之最大碎片數目。在Gen 2過程的第11天及Gen 3過程的第7天收集且計數總預REP細胞(TVC)。為比較兩個預REP組，將細胞計數除以培養物中所提供之碎片之數目，以計算每個碎片之活細胞之平均值。如以下表51中所指示，與Gen 3過程相比，Gen 2過程每碎片始終生長更多細胞。第11天Gen 3過程預期的TVC數目的外推計算，計算方法係將預REP TVC除以7，且隨後再乘以11。

表 51. 預REP細胞計數

腫瘤 ID	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
預 REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
碎片的數目	21	21	24	24	16	16
預 REP 每個碎片的平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
Gen 3 在預 REP 第 11 天的外推值	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

* L4055，未過濾的培養基。

【2050】對於Gen 2及Gen 3過程，根據過程條件對

TVC進行計數，且在過程之每天產生活細胞百分比。收集時，收集第22天(Gen 2)及第16天(Gen 3)細胞且建立TVC計數。然後將TVC除以第0天提供之碎片數目，以計算每個碎片的活細胞的平均值。藉由將收集TVC除以超過REP起始TVC來計算倍數擴增。如表52所示，比較Gen 2及Gen 3，L4054的倍數擴增相似；在L4055之情況下，Gen 2過程的倍數擴增更高。具體而言，在此情況下，在REP起始日之前使培養基升溫24。在Gen 3中亦觀測到M1085T之較高倍數擴增。第22天Gen 3過程預期的TVC數目的外推計算，計算方法係將REP TVC除以16，且隨後再乘以22。

表 52. TIL最終產物之總活細胞計數及倍數擴增。

腫瘤 ID	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
# 碎片	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC /碎片(在收集時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 起始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
規模擴大	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
收集	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍數擴增收集/ REP 起始	**468.4**	**425.9**	**2056.8**	**634.6**	**925.0**	**2197.2**
Gen 3 在 REP 收集第 22 天的外推值	**N/A**	**2.53E+10**	**N/A**	**1.20E+10**	**N/A**	**1.06E+10**

* L4055，未過濾的培養基。

【2051】表53：TIL最終產物之存活率%：在收集時，將最終TIL REP產物與存活率%的放行準則進行比較。Gen 2及Gen 3過程之所有條件都超過70%的存活率準則，且在過程及腫瘤方面具有可比性。

【2052】在收集後，將最終TIL REP產物與存活率%的放行準則進行比較。Gen 2及Gen 3過程之所有條件都超過70%的存活率準則，且在過程及腫瘤方面具有可比性。

表 53. REP 之存活率% (TIL 最終產物)

腫瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
過程	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 起始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
規模擴大	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
收集	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【2053】由於每個培養瓶之碎片數目低於最大所需數目，故針對各腫瘤計算收集時所估計之細胞計數。該評估係基於以下預期：臨床腫瘤在第0天足夠大以接種2個或3個培養瓶。

表 54. 將估計細胞計數外推至 Gen 3 過程的全尺寸 2 及 3 培養瓶上。

腫瘤 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen 3 過程	2 個培養瓶	3 個培養瓶	2 個培養瓶	3 個培養瓶	2 個培養瓶	3 個培養瓶
估計收集	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【2054】免疫表型-TIL最終產物之表型標記比較。三種腫瘤L4054、L4055及M1085T在Gen 2及Gen 3過程中均經歷TIL擴增。收集後，對REP TIL最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。對於所有條件，TCR a/b+細胞之百分比超過90%。

【2055】與自Gen 2過程收集的TIL相比，自Gen 3過程收集的TIL顯示出更高的CD8及CD28表現。Gen 2過程顯示較高百分比之CD4+。

【2056】與自Gen 2過程收集的TIL相比，自Gen 3過

程收集的TIL顯示出更高的中樞記憶室表現。

【2057】在來自兩個腫瘤L4054及L4055之TIL中分析活化及耗盡標誌物，以比較來自Gen 2及Gen 3 TIL擴增過程的最終TIL產物。Gen 2及Gen 3過程之間的活化及耗盡標記物具有可比性。

【2058】再刺激時的干擾素γ分泌。在收集日，即Gen 2的第22天及Gen 3的第16天，TIL使用L4054及L4055之經塗佈之抗CD3盤進行隔夜再刺激。使用抗CD3、CD28及CD137珠粒對M1085T進行再刺激。在所有條件下再刺激24小時後收集上清液且冷凍上清液。同時使用相同ELISA盤對來自兩種過程之上清液評估藉由ELISA進行之IFNγ分析。在所分析之三個腫瘤中觀測到來自Gen 3過程之較高的IFNγ產生。

【2059】培養基中IL-2含量之量測。為了比較Gen 2及Gen 3過程之間的IL-2消耗，在REP起始、規模擴大及收集日，在腫瘤L4054及L4055上收集細胞上清液。細胞培養物上清液中IL-2的量藉由R&D的Quantitate ELISA套組量測。一般趨勢指示當相比於Gen 2過程時，IL-2濃度在Gen 3過程中保持較高。這可能係由於Gen 3的REP起始時較高濃度的IL-2(6000 IU/mL)以及整個過程中培養基的殘留。

【2060】代謝基質及代謝物分析。代謝底物諸如D-葡萄糖及L-麩醯胺酸的含量經量測為整體培養基消耗的代替物。量測其互逆代謝物，諸如乳酸及氨。葡萄糖係培養基中的一種單糖，粒線體利用其以ATP的形式產生能量。當

葡萄糖經氧化時，會產生乳酸(乳酸係乳酸鹽)。在細胞指數生長期期間強烈產生乳酸鹽。高含量之乳酸鹽會對細胞培養過程產生負面影響。

【2061】L4054及L4055的消耗之培養基在Gen 2及Gen 3過程的REP起始、規模擴大及收集日進行收集。對於Gen 2在第11天、第16天及第22天收集消耗之培養基；對於Gen 3在第7天、第11天及第16天收集消耗之培養基。在CEDEX生物分析儀上分析上清液中葡萄糖、乳酸、麩醯胺酸、GlutaMax™及氨的濃度。

【2062】L-麩醯胺酸係細胞培養基調配物中所需的一種不穩定的必需胺基酸。麩醯胺酸含有一種胺，及此醯胺結構基團可向細胞輸送及遞送氮。當L-麩醯胺酸氧化時，細胞會產生有毒的氨副產物。為了抵消L-麩醯胺酸的降解，Gen 2及Gen 3過程之培養基添加了GlutaMax™，其在水溶液中更穩定且不會自發降解。在兩個腫瘤株系中，Gen 3組在此過程中顯示出L-麩醯胺酸及GlutaMax™的減少，以及整個REP中氨的增加。在Gen 2組中，L-麩醯胺酸及GlutaMax™的濃度恆定，且觀測到氨產生略有增加。Gen 2及Gen 3過程在收集日時的氨具有可比性，且L-麩醯胺酸降解略有不同。

【2063】藉由Flow-FISH重複端粒。Flow-FISH技術用於量測Gen 2及Gen 3過程下L4054及L4055上端粒重複的平均長度。使用端粒PNA套組/FITC計算相對端粒長度(RTL)的測定，以用於來自DAKO的流動式細胞測量術分析。

Gen 3顯示出與Gen 2相當的端粒長度。

【2064】CD3分析。為了確定各過程中產生的細胞產物的純系多樣性，對L4054及L4055收集的TIL最終產物進行取樣，且經由T細胞受體之CDR3部分的測序進行純系多樣性的分析。

【2065】表55顯示了Gen 2及Gen 3之間在TIL收集的細胞產物上的L4054上共享獨特CDR3序列百分比的比較。Gen 3及Gen 2最終產物共享199個序列，相當於Gen 2前80%的獨特CDR3序列中的97.07%與Gen 3最終產物共享。

表55. L4054上Gen 2與Gen 3過程之間的共享uCDR3序列之比較。

# uCDR3 (重疊%)	所有uCDR3之		前80%的uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

【2066】表56顯示了Gen 2及Gen 3之間在TIL收集的細胞產物上的L4055上共享獨特CDR3序列百分比的比較。Gen 3及Gen 2最終產物共享1833個序列，相當於Gen 2前80%的獨特CDR3序列中的99.45%與Gen 3最終產物共享。

表56.L4055上Gen 2與Gen 3過程之間的共享uCDR3序列之比較。

# uCDR3 (重疊%)	所有uCDR3之		前80%的uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

【2067】CM1及CM2培養基未經過濾預先製備且保持在4℃，直至用於腫瘤L4055以用於Gen 2及Gen 3過程。

【2068】對於L4055腫瘤，在REP起始日時，將培養基在37℃下溫熱24小時以用於Gen 2及Gen 3過程。

【2069】在過程中收集的上清液中未量測LDH。

【2070】M1085T TIL細胞計數使用K2 cellometer細胞計數器進行。

【2071】在腫瘤M1085T上，樣本不可用，諸如用於代謝分析的上清液、用於活化及耗盡標誌物分析的TIL產物、端粒長度及CD3-TCR vb分析。

【2072】結論。此實例比較了3個獨立供體腫瘤組織的功能品質屬性，外加Gen 2及Gen 3過程之間的擴展表型表徵及培養基消耗。

【2073】Gen 2及Gen 3預REP及REP擴增比較根據所產生之總活細胞及總有核細胞群體之存活率來評估。收集日時之TVC細胞劑量在Gen 2(22天)與Gen 3(16天)之間無可比性。Gen 3細胞劑量低於Gen 2，約在收集時收集的總活細胞的40%左右。

【2074】假設預REP收集發生在第11天而不係第7天，REP收集發生在第22天而不係第16天，則計算Gen 3過程的外推細胞數目。在這兩種情況下，與Gen 2過程相比，Gen 3在TVC上顯示出更接近的數目，表明早期活化增強型TIL增長。

【2075】在Gen 3過程中額外培養瓶(2或3)的外推值的情況下，假設處理的腫瘤尺寸更大，且達到如所描述之每個過程所需的最大碎片數目。觀測到，與在第22天之Gen

2過程相比，Gen 3過程在第16天收集之TVC上可達類似劑量。此觀測結果為重要的，且指示培養物之早期活化降低TIL處理時間。

【2076】Gen 2及Gen 3預REP及REP擴增比較根據所產生之總活細胞及總有核細胞群體之存活率來評估。收集日時之TVC細胞劑量在Gen 2(22天)與Gen 3(16天)之間無可比性。Gen 3細胞劑量低於Gen 2，約在收集時收集的總活細胞的40%左右。

【2077】就表型表徵而言，與Gen 2過程相比，在Gen 3過程中之三個腫瘤上觀測到較高的CD8+及CD28+表現。

【2078】與Gen 2過程相比，Gen 3過程顯示出較高的中樞記憶隔室。

【2079】儘管Gen 3過程的持續時間較短，但Gen 2及Gen 3過程顯示出相當的活化及耗盡標記物。

【2080】相較於所分析之三個腫瘤中的Gen 2，Gen 3最終產物上之IFN gamma(IFNγ)產量高出3倍。此資料表明，與Gen 2過程相比，Gen 3過程產生了功能強大且更有效的TIL產物，此可能係由於Gen 3上CD8及CD28的表現更高。表型表徵表明，與Gen 2過程相比，Gen 3在三個腫瘤上的CD8+、CD28+表現呈陽性趨勢。

【2081】Gen 2與Gen 3之間的TIL最終產物之端粒長度相當。

【2082】Gen 2及Gen 3最終產物之間的葡萄糖及乳酸鹽含量相當，這表明Gen 3過程的培養基上的營養含量未

受到影響，因為與Gen 2相比，在過程的每一天都沒有執行減量移除，而且過程中的培養基體積較小。

【2083】與Gen 2過程相比，Gen 3過程的總體處理時間減少了近兩倍，此將顯著降低由Gen 3過程擴展的TIL產物的商品成本(COG)。

【2084】IL-2消耗表明Gen 2過程中IL-2消耗的一般趨勢，而在Gen 3過程中，由於未移除舊培養基，因此IL-2較高。

【2085】藉由CDR3 TCRab序列分析，Gen 3過程顯示出較高的純系多樣性。

【2086】在預REP的第0天添加飼養細胞及OKT-3允許TIL的早期活化並允許使用Gen 3過程進行TIL生長。

【2087】表57描述與當前的Gen 2過程相比的Gen 3過程之各種實施例及結果。

表 57. 例示性 Gen 3 過程特徵。

步驟	過程 Gen 2 實施例	過程 Gen 3 實施例
預 REP-第 0 天	≤50 個碎片 1X G-REX-100MCS 1 L 培養基 IL-2 (6000 IU/mL) 11 天	≤240 個碎片 ≤60 個碎片/培養瓶 ≤4 培養瓶 ≤2L 培養基(500 mL/培養瓶) IL-2 (6000 IU/mL) $2.5x10^8$ 個飼養細胞/培養瓶 15ug OKT3/培養瓶
REP 起始	新鮮 TIL 直接用於 REP 第 11 天 ≤$200e^6$ 個活細胞 $5×10^9$ 個飼養細胞 G-REX-500MCS 5L CM2 培養基 + IL-2 (3000 IU/mL) 150 μg OKT3	新鮮 TIL 直接用於 REP 第 7 天 活化整個培養物 $5×10^8$ 個飼養細胞 30 μg OKT3/培養瓶 G-REX-100MCS 500 mL 培養基+ IL-2 (6000 IU/mL)
TIL 繼代培養物或規模擴大	≤5 G-REX-500MCS ≤1x10 個活細胞/培養瓶 5 L/培養瓶 第 16 天	≤4 G-REX-500MCS 規模擴大整個培養物 4 L/培養瓶 第 10-11 天
收集	在第 22 天收集， LOVO-自動細胞洗滌器 2 個洗滌週期	在第 16 天收集 LOVO-自動細胞洗滌器 5 個洗滌週期
最終調配物	冷凍保存產物 300 IU/mL IL2- CS10 於 LN_2 中，多個等分試樣	冷凍保存產物 300 IU/mL IL-2-CS10 於 LN_2 中，多個等分試樣
處理時間	22 天	16 天

實例 10：例示性 GEN 3 過程(亦稱為 GEN 3.1)

【2088】此實例描述關於「Gen 2與Gen 3程序之間針對TIL擴增的可比較性」的其他研究。Gen 3過程經修改以在該過程早期包括活化步驟，其目標為增加最終總活細胞(TVC)輸出，同時維持表型及功能概況。如下文所描述，

Gen 3實施例經修改為另一實施例且在本文中在此實例中被稱作Gen 3.1。

【2089】在一些實施例中，Gen 3.1 TIL製造過程具有四個操作員介入：

1.腫瘤碎片分離及活化：在該過程之第0天，解剖腫瘤且產生各自為約3×3 mm之最終碎片(總計多大240個碎片)且在1至4個G-REX100MCS培養瓶中培養。各培養瓶含有至多60個碎片、500 mL CM1或DM1培養基，且補充有6,000 IU rhIL-2、15 μg OKT3及2.5×10^8個經照射之同種異體單核細胞。將培養物在37℃下培育6至8天。

2. TIL培養再活化：在第7至8天，在兩種情況下培養物經由緩慢添加補充有6,000 IU rhIL-2、30 μg OKT3及5×10^8個經照射之同種異體單核細胞之CM2或DM1培養基補充。注意不要干擾培養瓶底部處之現有細胞。將培養物在37℃下培育3至4天。

3.培養規模擴大：發生在第10至11天。在培養規模擴大期間，將G-REX100MCS之全部內容物轉移至含有在兩種情況下補充有3,000 IU/mL IL-2之CM4或DM2的4 L G-REX500MCS培養瓶中。將培養瓶在37℃下培育5至6天直至收集。

4.收集/洗滌/調配：在第16至17天，培養瓶體積減小且彙集。將細胞濃縮且用含有1% HSA之PlasmaLyte A pH 7.4洗滌。經洗滌之細胞懸浮液與CryoStor10以1:1的比例調配，且補充rhIL-2至最終濃度為300 IU/mL。

【2090】DP以受控速率冷凍進行冷凍保存且儲存在氣相液氮中。*完整標準TIL培養基1、2或4(CM1、CM2、CM4)可替代CTS™ OpTmizer™ T細胞無血清擴增培養基，其稱為確定培養基(DM1或DM2)，如上文所提及。

【2091】過程描述。在第0天，將腫瘤洗滌3次，然後碎斷成3x3x3的最終碎片。整個腫瘤經碎斷後，隨後將最後碎片同等地隨機化且分成三個池。將一個隨機化碎片池引入各組，每個三個實驗矩陣添加相同數目之碎片。

【2092】在整個TIL擴增過程中，使用標準培養基進行腫瘤L4063擴增，且用確定培養基(CTS OpTmizer)進行腫瘤L4064擴增。培養基之組分描述於本文中。

【2093】CM1完整培養基1：RPMI+麩醯胺酸，補充有2 mM GlutaMax™、10%人類AB血清、建它黴素(50 ug/mL)、2-巯基乙醇(55 uM)。補充有6000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2094】CM2完整培養基2：50% CM1培養基+50% AIM-V培養基。補充有6000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2095】CM4完整培養基4：補充有GlutaMax™(2 mM)之AIM-V。補充有3000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2096】CTS OpTmizer CTS™OpTmizer™T細胞擴增基礎培養基補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)。

【2097】DM1：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及CTS™免疫細胞SR(3%)與GlutaMax™(2 mM)之CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。補充有6,000 IU/mL IL-2之最終調配物。

【2098】DM2：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及CTS™免疫細胞SR(3%)與GlutaMax™(2 mM)之CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。補充有3,000 IU/mL IL-2之最終調配物。

【2099】預先製備所有類型之所用培養基，亦即完整(CM)及確定(DM)培養基，在4℃下保持直至使用前一天，且在培育箱中在37℃下在處理日之前提前升溫長達24小時。

【2100】針對兩種腫瘤在第7天發生TIL培養再活化。規模擴大針對L4063在第10天及針對L4064在第11天出現。收集兩種培養物且在第16天冷凍保存。

【2101】達成的結果。確定了Gen 3.0及Gen 3.1過程的細胞計數及存活率%。在所有條件中擴增遵循描述於此實例中之細節。

【2102】對於各腫瘤，碎片分成三個相等數目的池。歸因於腫瘤之較小尺寸，無法達成每個培養瓶之最大碎片數目。對於三個不同的過程，評估各條件的總活細胞及細胞存活率。細胞計數確定為第7天用於再活化的TVC，第10天(L4064)或第11天(L4063)用於規模擴大的TVC，以及第16/17天收集的TVC。

【2103】第7天及第10/11天的細胞計數視為FIO。藉由將收集日第16/17 TVC除以第7天再活化TVC來計算倍數擴增。為了比較三組，收集日之TVC除以在第0天添加至培養物中之碎片的數目，以便計算每個碎片之活細胞的平均值。

【2104】對L4063及L4064進行細胞計數及存活率分析。在兩個腫瘤上，Gen 3.1測試過程每個碎片產生的細胞比Gen 3.0過程多。

【2105】總活細胞計數及倍數擴增；該過程期間之存活率%。在再活化時、規模擴大及收集的存活率百分比在所有條件下進行。在第16/17天收集時，將最終TIL與存活率%的釋放準則進行比較。所有條件都超過70%的存活率準則，且在過程及腫瘤方面具有可比性。

【2106】免疫表型-TIL最終產物之表型表徵。對最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。在所有條件下，TCRα/β、CD4+及CD8+細胞的百分比群體都係一致的。

【2107】進行了REP TIL的擴展表型分析。在兩個腫瘤中TIL產物顯示，與Gen 3.0相比，Gen 3.1條件下CD4+細胞的百分比較高，且在兩種條件下，與Gen 3.1條件相比，Gen 3.0中來自CD8+群體的CD28+細胞百分比較高。

【2108】自Gen 3.0及Gen 3.1過程中收集的TIL顯示出與CD4+及CD8+細胞上的CD27及CD56表現相當的表型標記物，以及CD4+閘控細胞群上相當的CD28表現。對TIL

最終產物之記憶標記物比較：

【2109】將第16天收集之冷凍TIL樣本進行染色以用於分析。TIL記憶狀態在Gen 3.0與Gen 3.1過程之間相當。對TIL最終產物之活化及耗盡標記物比較：

【2110】活化及耗盡標記物在CD4+及CD8+細胞上閘控的Gen 3.0及Gen 3.1過程之間具有可比性。

【2111】再刺激時的干擾素γ分泌。收集的TIL使用L4063及L4064之經塗佈之抗CD3盤進行隔夜再刺激。在所分析之兩個腫瘤中，與Gen 3.0過程相比，觀測到來自Gen 3.1過程之較高的IFNγ產生。

【2112】培養基中IL-2含量之量測。為比較所有條件與過程之間的IL-2消耗含量，在第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模擴大及第16天/第17天收集日收集細胞上清液，且冷凍。隨後將上清液解凍且接著分析。細胞培養物上清液中IL-2的量藉由製造商方案量測。

【2113】在同一培養基條件下評估的整個過程中，Gen 3及Gen 3.1的總體過程就IL-2消耗而言具有可比性。對收集之L4063及L4064消耗之培養基的IL-2濃度(pg/mL)分析。

【2114】代謝物分析。對於每種條件，在第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模擴大及在L4063及L4064之第16天/第17天收集日收集來自L4063及L4064之消耗之培養基上清液。在CEDEX生物分析儀上分析上清液中葡萄糖、乳酸鹽、麩醯胺酸、GlutaMax™及氨

之濃度。

【2115】與完整培養基(2 g/L)相比，確定培養基之葡萄糖濃度更高，為4.5 g/L。總體而言，各培養基類型中Gen 3.0及Gen 3.1過程的葡萄糖濃度及消耗量相當。

【2116】觀測到乳酸鹽增加，且乳酸鹽增加在Gen 3.0與Gen 3.1條件之間及在用於再活化擴增之兩個培養基(完整培養基及確定培養基)之間相當。

【2117】在一些情況下，標準基礎培養基含有2 mM L-麩醯胺酸且補充有2 mM GlutaMax™以補償在培養條件下L-麩醯胺酸自然降解為L-麩胺酸及氨的情況。

【2118】在一些情況下，所使用之確定(無血清)培養基在基礎培養基上不含L-麩醯胺酸，且僅補充有GlutaMax™至最終濃度為2 mM。GlutaMax™係L-丙胺酸及L-麩醯胺酸之二肽，在水溶液中比L-麩醯胺酸更穩定，且不會自發降解為麩胺酸及氨。相反，二肽逐漸分解成單個胺基酸，從而保持較低但足夠濃度的L-麩醯胺酸，以維持穩健的細胞生長。

【2119】在一些情況下，麩醯胺酸及GlutaMax™之濃度在規模擴大日略有下降，但在收集日顯示出與再活化日相比增加至類似或更接近的含量。對於L4064，在整個過程期間，麩醯胺酸及GlutaMax™濃度在不同條件下以相似的速率出現輕微降解。

【2120】氨濃度係在含有2 mM麩醯胺酸+2 mM GlutaMax™的標準培養基中生長的樣本比在含有2 mM

GlutaMax™的確定培養基中生長的樣本更高。此外，如所預期，在培養過程內，氨逐漸增加或累積。在三種不同測試條件，在氨濃度方面不存在差異。

【2121】藉由Flow-FISH重複端粒。Flow-FISH技術用於量測Gen 3及Gen 3.1過程下L4063及L4064上端粒重複的平均長度。使用端粒PNA套組/FITC計算相對端粒長度(RTL)的測定，以用於來自DAKO的流動式細胞測量術分析。進行端粒測定。將樣本中的端粒長度與對照細胞株系(1301白血病)進行比較。對照細胞株系係具有允許計算相對端粒長度之長穩定端粒的四倍體細胞株系。在兩種腫瘤中評估之Gen 3及Gen 3.1過程顯示出相當的端粒長度。

TCRVβ譜系分析

【2122】為了確定各過程中產生之細胞產物的純系多樣性，經由對T細胞受體之CDR3部分進行測序來分析TIL最終產物之純系多樣性分析。

【2123】在三個條件之間比較三個參數：

- 獨特CDR3(uCDR3)之多樣性指數
- 共享uCDR3 %
- 對於uCDR3的前80%：
  - 比較共享uCDR3複本%
  - 比較獨特純系型之頻率

【2124】對照及Gen 3.1測試，在TIL收集的細胞產物上共享獨特CDR3序列的百分比：975個序列在Gen 3及Gen

3.1測試最終產物之間共享，等效於與Gen 3.1共享的來自Gen 3獨特CDR3序列的前80%的88%。

【2125】對照及Gen 3.1測試，在TIL收集的細胞產物上共享獨特CDR3序列的百分比：2163個序列在Gen 3及Gen 3.1測試最終產物之間共享，等效於與Gen 3.1共享的來自Gen 3獨特CDR3序列的前80%的87%。

【2126】來自收集第16天收集的1×10^6個細胞中鑑別的獨特CD3序列的數目，用於不同的過程。基於樣本中獨特肽CDR的數量，Gen 3.1測試條件顯示出與Gen 3.0相比略高的純系多樣性。

【2127】夏儂熵(Shannon entropy)多樣性指數係一個可靠且常用的比較度量，因為兩種腫瘤的Gen 3.1條件顯示出略高於Gen 3過程的多樣性，表明Gen 3.1測試條件的TCRVβ譜系比Gen 3.0過程更具多株性。

【2128】此外，Gen 3.1測試條件的TCRVβ譜系與Gen 3.0過程的相應譜系在腫瘤L4063及L4064上顯示超過87%的重疊。

【2129】Gen 3.1測試L4064在再活化日消耗之培養基上的IL-2濃度值低於預期值(類似於Gen 3.1對照及Gen 3.0條件)。

【2130】低值可能係由於移液錯誤造成的，但由於採集的樣本很少，因此不可能重複分析。

【2131】結論。與Gen 3.0及Gen 3.1對照相比，第0天的Gen 3.1測試條件(包括飼養細胞及OKT-3)在收集第16天

顯示出細胞劑量的較高TVC。Gen 3.1測試條件下最終產物的TVC比Gen 3.0高約2.5倍。

【2132】對於所測試之兩個腫瘤樣本，在第0天添加OKT-3及飼養細胞之Gen 3.1測試條件在收集時達到培養瓶的最大容量。在此等條件下，若在第0天起始最多4個培養瓶，則最終細胞劑量可在80至100×10^9個TIL之間。

【2133】在Gen 3.1測試及Gen 3.0過程之間保持所有品質屬性，例如表型表徵，包括最終TIL產物的純度、耗盡、活化及記憶標記物。

【2134】在所分析之兩個腫瘤中，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1上的最終TIL產物的IFN-γ產生比Gen 3.0高3倍，表明Gen 3.1過程產生有效的TIL產物。

【2135】在測試條件下葡萄糖或乳酸鹽含量未觀測到差異。在不同培養基條件下，Gen 3.0及Gen 3.1過程之間的麩醯胺酸及氨未觀測到差異。培養基上之較低含量之麩醯胺酸不限制細胞生長，且表明僅在培養基中添加GlutaMax™就足以給予細胞增殖所需之營養。

【2136】在第11天及第10天分別規模擴大，且在過程之收集日所達到之細胞數目方面未顯示出重大差異，且在整個過程期間兩種情況下，代謝物消耗都具有可比性。此觀測結果表明Gen 3.0最佳化過程可在處理天數上具有靈活性，藉此促進過程排程之靈活性。

【2137】與Gen 3.0相比，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1過程顯示出較高的純系多樣性，藉由

CDR3 TCRab序列分析量測。

【2138】圖32描述Gen 3過程(Gen 3最佳化過程)之實施例。標準培養基及CTS Optimizer無血清培養基可用於Gen 3最佳化過TIL擴增。在使用CTS Optimizer無血清培養基之情況下，建議將培養基上的GlutaMax™增加至最終濃度未4 mM。

實例11：GEN 3擴增平台第16-17天之例示性實施例

洗滌緩衝液製備(1% HAS PLASMALYTE A)。

【2139】將HAS及PLasmalyte轉移至5 L袋中以製作LOVO洗滌緩衝液。使用無菌條件將總體積為125 mL的25% HSA轉移至5 L袋中。在室溫下儲存。

【2140】移除且將10 mL或40 mL洗滌緩衝液轉移至「IL-2 6×10^4 IU/mL管」中(若預先製備IL-2，則為10 mL，或若新鮮製備IL-2，則為40 mL)。

【2141】計算添加至Plasmalyte+1% HSA中的經復原IL-2的體積：經復原IL-2的體積=(IL-2的最終濃度×最終體積)/IL-2的比活性(基於標準分析)。IL-2之最終濃度為6×10^4 IU/mL。最終體積為40 mL。

【2142】移除了復原IL-2所需的IL-2的計算初始體積，且轉移至「IL-2 6×10^4 IU/mL」管中。將來自預先製備之等分試樣的100 µL IL-2 6x10^6 IU/mL添加至含有10 mL LOVO洗滌緩衝液之標記為「IL-2 6×10^4 IU/mL」的管中。

【2143】自G-Rex 500MCS培養瓶移除約4500 mL上清

液。旋轉剩餘的上清液且將細胞轉移至細胞收集池袋中。對所有G-Rex 500MCS培養瓶重複。

【2144】移除60 mL上清液且添加至上清液試管中用於品質對照分析，包括黴漿菌偵測。儲存於+2-8℃。

【2145】細胞收集

【2146】計數細胞。用4.5 mL的AIM-V製備四個15 mL錐形管。此等可預先準備。最佳範圍=介於5×10^4及5×10^6個細胞/mL之間。(推薦1:10稀釋度)。對於1:10稀釋度，向先前製備之4500 µL AIM V，添加500 µL CF。記錄稀釋因數。

計算預LOVO(存活+死亡)的TC(總細胞)=

平均總細胞

濃度(預LOVO TC濃度)

(存活+死亡)

X

源袋之體積

計算預LOVO(存活)的TVC(總活細胞)=

平均總活細胞

濃度(預LOVO TVC)

(存活)

X

LOVO源袋之體積

【2147】當總細胞(TC)數目> 5×10^9時，移除5×10^8個細胞以冷凍保存為MDA保留樣本。5×10^8÷平均TC濃度(步

驟14.44)=待移除之體積。

【2148】當總細胞(TC)數目≤5×10^9，移除4×10^6個細胞以冷凍保存為MDA保留樣本。4×10^6÷總TC濃度=待移除之體積。

【2149】使用適當大小的注射器自LOVO源袋中移除所需體積。在冷凍保存步驟之前保存於培育箱中。

【2150】當測定總細胞數目時，移除細胞數目應允許保留150×10^9個活細胞。確認預LOVO的TVC 5×10^8或4×10^6或不適用。計算移除的細胞體積。

【2151】計算袋中剩餘的剩餘總細胞。計算預LOVO的TC(總細胞)。[平均總細胞濃度X剩餘體積=TC預LOVO剩餘]

【2152】根據剩餘的細胞之總數目，在下表中選擇相應過程。

表38. 細胞總數目。

總細胞：	*保留物(mL)*
$0 <$ 總細胞 $\leq 31 \times 10^9$	**115**
$31 \times 10^9 <$ 總細胞 $\leq 71 \times 10^9$	**165**
$71 \times 10^9 <$ 總細胞 $\leq 110 \times 10^9$	**215**
$110 \times 10^9 <$ 總細胞 $\leq 115 \times 10^9$	**265**

【2153】選擇與所用過程相對應的IL-2添加的體積。體積計算為：保留物體積×2×300 IU/mL=所需IL-2的IU。所需IL-2的IU/6×10^4 IU/mL=LOVO袋後添加的IL-2體積。

記錄所有添加之體積。在冷凍小瓶中獲得樣本用於進一步分析。

【2154】充分混合細胞產物。密封所有袋以用於進一步處理，適當時包括冷凍保存。

【2155】按需要對獲得的冷凍小瓶樣本進行內毒素、IFN-γ、無菌及其他分析。

實例12：例示性GEN 3過程(亦稱為GEN 3.1)

目的

【2156】此實例描述關於「Gen 2與Gen 3程序之間針對TIL擴增的可比較性」的其他研究。Gen 3過程經修改以在該過程早期包括活化步驟，其目標為增加最終總活細胞(TVC)輸出，使其與Gen 2相當(或更好)，同時維持表型及功能概況。

【2157】範疇

【2158】經由在第0天對經培養的腫瘤碎片引入活化步驟來評估TVC輸出。

【2159】在兩個獨立患者腫瘤上，證實Gen 3標準組以及對照組在功能性及擴展表型表徵上具有可比較性。

【2160】分析培養基消耗及代謝物產生以確定處理參數維持在生理條件下。

【2161】此實例之所有操作均在全尺寸平台進行，使用市售供體腫瘤組織作為起始材料。

資訊

【2162】過程Gen 3實施例經修改為另一實施例且在本文中在此實例中被稱作Gen 3.1。

Gen 3.1 TIL製造概念具有四個操作員介入：

1.腫瘤碎片分離及活化：在該過程之第0天，解剖腫瘤且產生各自為約3×3 mm之最終碎片(總計多大240個碎片)且在1至4個G-Rex100MCS培養瓶中培養。各培養瓶含有至多60個碎片、500 mL CM1或DM1培養基，且補充有6,000 IU rhIL-2、15 μg OKT3及2.5×10^8個經照射之同種異體單核細胞。將培養物在37℃下培育6至8天。

2. TIL培養再活化：在第7至8天，在兩種情況下培養物經由緩慢添加補充有6,000 IU rhIL-2、30 μg OKT3及5×10^8個經照射之同種異體單核細胞之CM2或DM1培養基補充。注意不要干擾培養瓶底部處之現有細胞。將培養物在37℃下培育3至4天。

3.培養規模擴大：發生在第10至11天。在培養規模擴大期間，將G-Rex100MCS之全部內容物轉移至含有在兩種情況下補充有3,000 IU/mL IL-2之CM4或DM2的4 L G-Rex500MCS培養瓶中。將培養瓶在37℃下培育5至6天直至收集。

4.收集/洗滌/調配：在第16至17天，培養瓶體積減小且彙集。將細胞濃縮且用含有1% HSA之PlasmaLyte A pH 7.4洗滌。經洗滌之細胞懸浮液與CryoStor10以1:1的比例

調配，且補充rhIL-2至最終濃度為300 IU/mL。

【2163】DP以受控速率冷凍進行冷凍保存且儲存在氣相液氮中。*完整標準TIL培養基1、2或4(CM1、CM2、CM4)可替代CTS™OpTmizer™ T細胞無血清擴增培養基，其稱為確定培養基(DM1或DM2)，如上文所提及。

過程描述

【2164】在第0天，將腫瘤洗滌3次，然後碎斷成3x3x3的最終碎片。整個腫瘤經碎斷後，隨後將最後碎片同等地隨機化且分成三個池。將一個隨機化碎片池引入各組，每個三個實驗矩陣添加相同數目之碎片。

【2165】在整個TIL擴增過程中，使用標準培養基進行腫瘤L4063擴增，且用確定培養基(CTS OpTmizer)進行腫瘤L4064擴增。培養基之組分描述於本文中。

【2166】CM1完整培養基1：RPMI+麩醯胺酸，補充有2 mM Glutamax、10%人類AB血清、建它黴素(50 ug/mL)、2-巯基乙醇(55 uM)。補充有6000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2167】CM2完整培養基2：50% CM1培養基+50% AIM-V培養基。補充有6000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2168】CM4完整培養基4：補充有GlutaMax(2 mM)之AIM-V。補充有3000 IU/mL IL-2之最終培養基調配物。

【2169】CTS OpTmizer CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增

基礎培養基補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)。

【2170】DM1：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及CTS™免疫細胞SR(3%)與GlutaMax(2 mM)之CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。補充有6,000 IU/mL IL-2之最終調配物。

【2171】DM2：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)及CTS™免疫細胞SR(3%)與GlutaMax(2 mM)之CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。補充有3,000 IU/mL IL-2之最終調配物。

【2172】預先製備所有類型之所用培養基，亦即完整(CM)及確定(DM)培養基，在4℃下保持直至使用前一天，且在培育箱中在37℃下在處理日之前提前升溫長達24小時。

【2173】針對兩種腫瘤在第7天發生TIL培養再活化。規模擴大針對L4063在第10天及針對L4064在第11天出現。收集兩種培養物且在第16天冷凍保存。

預期結果

【2174】與Gen 3.0相比，Gen 3.1在第16-17天收集時可能達到更高的總活細胞數。

【2175】與Gen 3.0相比，Gen 3.1可能會在再刺激後產生相似含量的IFNɣ。

【2176】Gen 3.1及Gen 3.0可能具有相似的純系多樣

性，其藉由最終TIL產物中存在的總獨特CDR3序列來量測。

【2177】Gen 3.1過程中之表型表徵可能與Gen 3.0相似。

達成的結果

【2178】確定了Gen 3.0及Gen 3.1過程的細胞計數及存活率%。在所有條件中擴增遵循描述於此實例中之細節。

【2179】總活細胞計數及倍數擴增

【2180】對於各腫瘤，碎片分成三個相等數目的池。歸因於腫瘤之較小尺寸，無法達成每個培養瓶之最大碎片數目。對於三個不同的過程，評估各條件的總活細胞及細胞存活率。細胞計數確定為第7天用於再活化的TVC，第10天(L4064)或第11天(L4063)用於規模擴大的TVC，以及第16/17天收集的TVC。

【2181】第7天及第10/11天的細胞計數視為FIO。藉由將收集日第16/17 TVC除以第7天再活化TVC來計算倍數擴增。為了比較三組，收集日之TVC除以在第0天添加至培養物中之碎片的數目，以便計算每個碎片之活細胞的平均值。

【2182】對L4063及L4064進行細胞計數及存活率分析。在兩個腫瘤上，Gen 3.1測試過程每個碎片產生的細胞比Gen 3.0過程多。

在過程期間總活細胞計數及倍數擴增存活率%

【2183】在再活化時、規模擴大及收集的存活率百分比在所有條件下進行。在第16/17天收集時，將最終TIL與存活率%的釋放準則進行比較。所有條件都超過70%的存活率準則，且在過程及腫瘤方面具有可比性。

免疫表型分型

【2184】TIL最終產物之表型表徵。

【2185】對最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。在所有條件下，TCRα/β、CD4+及CD8+細胞的百分比群體都係一致的。

【2186】進行了REP TIL的擴展表型分析。在兩個腫瘤中TIL產物顯示，與Gen 3.0相比，Gen 3.1條件下CD4+細胞的百分比較高，且在兩種條件下，與Gen 3.1條件相比，Gen 3.0中來自CD8+群體的CD28+細胞百分比較高。

【2187】自Gen 3.0及Gen 3.1過程中收集的TIL顯示出與CD4+及CD8+細胞上的CD27及CD56表現相當的表型標記物，以及CD4+閘控細胞群上相當的CD28表現。對TIL最終產物之記憶標記物比較：

【2188】將第16天收集之冷凍TIL樣本進行染色以用於分析。TIL記憶狀態在Gen 3.0與Gen 3.1過程之間相當。對TIL最終產物之活化及耗盡標記物比較：

【2189】活化及耗盡標記物在CD4+及CD8+細胞上閘

控的Gen 3.0及Gen 3.1過程之間具有可比性。

【2190】再刺激時的干擾素γ分泌：

【2191】收集的TIL使用L4063及L4064之經塗佈之抗CD3盤進行隔夜再刺激。在所分析之兩個腫瘤中，與Gen 3.0過程相比，觀測到來自Gen 3.1過程之較高的IFNγ產生。

培養基中IL-2含量之量測

【2192】為比較所有條件與過程之間的IL-2消耗含量，在第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模擴大及第16天/第17天收集日收集細胞上清液，且冷凍。隨後將上清液解凍且接著分析。細胞培養物上清液中IL-2的量藉由製造商方案量測。

【2193】在同一培養基條件下評估的整個過程中，Gen 3及Gen 3.1的總體過程就IL-2消耗而言具有可比性。對收集之L4063及L4064消耗之培養基的IL-2濃度(pg/mL)分析。

代謝物分析

【2194】對於每種條件，在第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模擴大及在L4063及L4064之第16天/第17天收集日收集來自L4063及L4064之消耗之培養基上清液。在CEDEX生物分析儀上分析上清液中葡萄糖、乳酸鹽、麩醯胺酸、glutamax及氨之濃度。

【2195】與完整培養基(2 g/L)相比，確定培養基之葡萄糖濃度更高，為4.5 g/L。總體而言，各培養基類型中Gen 3.0及Gen 3.1過程的葡萄糖濃度及消耗量相當。

【2196】在所有測試條件下，L4063及L4064兩種腫瘤均觀測到乳酸鹽增加。乳酸鹽增加在Gen 3.0與Gen 3.1條件之間及在用於再活化擴增之兩個培養基(L4063的完整培養基及L4064的確定培養基)之間相當。

【2197】在L4063的情況下，標準基礎培養基含有2 mM L-麩醯胺酸且補充有2 mM glutamax以補償在培養條件下L-麩醯胺酸自然降解為L-麩胺酸及氨的情況。

【2198】對於L4064腫瘤，所使用之確定(無血清)培養基在基礎培養基上不含L-麩醯胺酸，且僅補充有glutamax至最終濃度為2 mM。Glutamax係L-丙胺酸及L-麩醯胺酸之二肽，在水溶液中比L-麩醯胺酸更穩定，且不會自發降解為麩胺酸及氨。相反，二肽逐漸分解成單個胺基酸，從而保持較低但足夠濃度的L-麩醯胺酸，以維持穩健的細胞生長。

【2199】對於L4063，麩醯胺酸及glutamax之濃度在規模擴大日略有下降，但在收集日顯示出與再活化日相比增加至類似或更接近的含量。對於L4064，在整個過程期間，麩醯胺酸及glutamax濃度在不同條件下以相似的速率出現輕微降解。

【2200】如所預期，L4063(在含有2 mM麩醯胺酸+2 mM glutamax的標準培養基中生長)的氨濃度高於L4064(在

含有2 mM glutamax的確定培養基中生長)。此外，如所預期，在培養過程內，氨逐漸增加或累積。在三種不同測試條件，在氨濃度方面不存在差異。

藉由Flow-FISH重複端粒：

【2201】Flow-FISH技術用於量測Gen 3及Gen 3.1過程下L4063及L4064上端粒重複的平均長度。使用端粒PNA套組/FITC計算相對端粒長度(RTL)的測定，以用於來自DAKO的流動式細胞測量術分析。進行端粒測定。

【2202】將L4063及L4064樣本中的端粒長度與對照細胞株系(1301白血病)進行比較。對照細胞株系係具有允許計算相對端粒長度之長穩定端粒的四倍體細胞株系。在兩種腫瘤中評估之Gen 3及Gen 3.1過程顯示出相當的端粒長度。TCRVβ譜系分析

【2203】為了確定各過程中產生之細胞產物的純系多樣性，經由對T細胞受體之CDR3部分進行測序來分析TIL最終產物之純系多樣性分析。

【2204】在三個條件之間比較三個參數：

- 獨特CDR3(uCDR3)之多樣性指數
- 共享uCDR3 %
- 對於uCDR3的前80%：
  - o 比較共享uCDR3複本%
  - o 比較獨特純系型之頻率

【2205】對照及Gen 3.1測試，在TIL收集的細胞產物

上L4063上的共享獨特CDR3序列的百分比：975個序列在Gen 3及Gen 3.1測試最終產物之間共享，等效於與Gen 3.1測試最終產物共享的來自Gen 3獨特CDR3序列的前80%的88%。

【2206】對照及Gen 3.1測試，在TIL收集的細胞產物上L4064上的共享獨特CDR3序列的百分比：2163個序列在Gen 3及Gen 3.1測試最終產物之間共享，等效於與Gen 3.1測試最終產物共享的來自Gen 3獨特CDR3序列的前80%的87%。

【2207】來自收集第16天收集的1×10^6個細胞中鑑別的獨特CD3序列的數目，用於不同的過程。基於樣本中獨特肽CDR的數量，Gen 3.1測試條件顯示出與Gen 3.0相比略高的純系多樣性。

【2208】夏儂熵(Shannon entropy)多樣性指數係一個更可靠且常用的比較度量，因為兩種腫瘤的Gen 3.1條件顯示出略高於Gen 3過程的多樣性，表明Gen 3.1測試條件的TCRVβ譜系比Gen 3.0過程更具多株性。

【2209】此外，Gen 3.1測試條件的TCRVβ譜系與Gen 3.0過程的相應譜系在腫瘤L4063及L4064上顯示超過87%的重疊。

額外資訊

【2210】Gen 3.1測試L4064在再活化日消耗之培養基上的IL-2濃度值低於預期值(類似於Gen 3.1對照及Gen 3.0

條件)。

【2211】低值可能係由於移液錯誤造成的，但由於採集的樣本很少，因此不可能重複分析。

【2212】樣本L4064之規模放大第10/11天的消耗之培養基未進行收集，且不包括在對上清液的IL-2濃度分析及代謝物分析中。

結論

【2213】與Gen 3.0及Gen 3.1對照相比，第0天的Gen 3.1測試條件(包括飼養細胞及OKT-3)在收集第16天顯示出細胞劑量的較高TVC。Gen 3.1測試條件下最終產物的TVC比Gen 3.0高約2.5倍。

【2214】對於腫瘤L4063及L4064，在第0天添加OKT-3及飼養細胞之Gen 3.1測試條件在收集時達到培養瓶的最大容量。在此等條件下，若在第0天起始最多4個培養瓶，則最終細胞劑量可在80至100E+09個TIL之間。

【2215】在Gen 3.1測試及Gen 3.0過程之間保持所有品質屬性且具有可比性，例如表型表徵，包括最終TIL產物的純度、耗盡、活化及記憶標記物。TIL最終產物之端粒長度及消耗之培養基上的IL-2消耗量在Gen 3.0及Gen 3.1過程之間相當。

【2216】在所分析之兩個腫瘤中，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1上的最終TIL產物的IFN-γ產生比Gen 3.0高3倍，表明Gen 3.1過程產生有效的TIL產物。

【2217】在測試條件下葡萄糖或乳酸鹽含量未觀測到差異。在不同培養基條件下，Gen 3.0及Gen 3.1過程之間的麩醯胺酸及氨未觀測到差異。培養基上之較低含量之麩醯胺酸不限制細胞生長，且表明僅在培養基中添加glutamax就足以給予細胞增殖所需之營養。

【2218】L4063及L4064之規模擴大日分別為第11天及第10天，且在過程之收集日所達到之細胞數目方面未顯示出重大差異，且在整個過程期間兩種情況下，代謝物消耗都具有可比性。此觀測結果表明Gen 3.0最佳化過程可在處理天數上具有靈活性，藉此促進過程排程之靈活性。

【2219】與Gen 3.0相比，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1過程顯示出較高的純系多樣性，藉由CDR3 TCRab序列分析量測。

【2220】圖32描述Gen 3過程(Gen 3最佳化過程)之實施例。標準培養基及CTS Optimizer無血清培養基可用於Gen 3最佳化過TIL擴增。在使用CTS Optimizer無血清培養基之情況下，建議將培養基上的glutamax增加至最終濃度為4 mM。

可行性及可比較性：

可行性：

【2221】為所有實驗中的所有研究條件建立可行性。在所有實驗及條件以及供體腫瘤組織之間，所有實驗均使用相同批次的關鍵原材料進行，諸如IL-2、人類血清AB、

同種異體飼養細胞、OKT-3。

【2222】可比較性：

【2223】根據LFP-002自體腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)冷凍保存第22天，藉由研究的任何組滿足吾人之臨床產品發行準則的能力來確定可比較性。

實例13：利用確定培養基之腫瘤擴增過程。

【2224】用根據本發明之確定培養基(例如CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM，賽默飛世爾，包括例如DM1及DM2)替代CM1及CM2培養基來進行揭示於實例7至實例12中所揭示之過程。

實例14：冷凍保存TIL細胞療法之例示性生產

【2225】此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current Good Tissue Practices)及當前優良製造規範(current Good Manufacturing Practices)在G-Rex培養瓶中進行TIL細胞療法過程的例示性cGMP製造。

表44：過程擴增例示性計劃

估劑天數(接種後)	活性	目標準則	預期容器	估計總體積(mL)
0	腫瘤分割	每 G-Rex100MCS ≤ 50 個所需腫瘤碎片	G-Rex100MCS 1 培養瓶	≤1000
11	REP 接種	每 G-Rex500MCS $5 – 200 \times 10^6$ 個活細胞	G-Rex500MCS 1 培養瓶	≤5000
16	REP 分瓶	每 G-Rex500MCS 1×10^9 個活細胞	G-Rex500MCS ≤5 培養瓶	≤25000
22	收集	可獲得細胞總數	3 至 4 個 CS-750 袋	≤530

表 45 ：培養瓶體積

培養瓶類型	工作 體積/培養瓶 (mL)
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

初始過程資訊

第0天CM1培養基製備。

【2226】在BSC中，向RPMI 1640培養基瓶添加試劑。添加以下試劑t，每瓶添加：加熱不活化人類AB血清(100.0 mL)；GlutaMax(10.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL(1.0 mL)；2-巯基乙醇(1.0 mL)

【2227】自BSC取出不必要之材料。自BSC分發培養基試劑，將硫酸建它黴素及HBSS保留在BSC以用於調配洗滌培養基製備。

【2228】解凍IL-2等分試樣。解凍一個1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。記錄IL-2：批號及有效期

【2229】將IL-2儲備液轉移至培養基中。在BSC中，將1.0 mL IL-2儲備液轉移至準備之CM1第0天培養基瓶中。添加CM1第0天培養基1瓶及IL-2(6×10^6 IU/mL)1.0 mL。

【2230】將G-Rex100MCS傳遞至BSC中。將G-Rex100MCS(W3013130)無菌傳遞至BSC中。

【2231】將所有完全CM1第0天培養基泵吸至G-Rex100MCS培養瓶中。組織碎片錐形管或GRex100MCS。

第0天腫瘤洗滌培養基製備

【2232】在BSC中，將5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)添加至1×500 mL HBSS培養基(W3013128)瓶中。每瓶添加：HBSS(500.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/ml(5.0 mL)。經由1L 0.22微米過濾器單元(W1218810)製備含有建它黴素之經過濾HBSS。

第0天腫瘤處理

【2233】獲得腫瘤。自QAR獲得腫瘤試樣且立即轉移至2-8℃下之套件中進行處理。

等分腫瘤洗滌培養基。

【2234】腫瘤洗滌1，使用8''鑷子(W3009771)，自試樣瓶移出腫瘤且轉移至所製備之「洗滌1」培養皿中。隨後為腫瘤洗滌2及腫瘤洗滌3。

【2235】量測腫瘤。評估腫瘤。評定是否觀測到整個腫瘤面積之> 30%壞死及/或為脂肪組織。若適用時：清潔解剖。若腫瘤較大且觀測到>30%組織外表壞死/為脂肪，則藉由使用解剖刀及/或鑷子之組合移除壞死/脂肪組織並同時保留腫瘤內部結構來進行「清除分割」。

【2236】解剖腫瘤 使用解剖刀及/或鑷子之組合，將

腫瘤試樣切割成偶數個適當大小之碎片(至多6個中間碎片)。轉移中間腫瘤碎片。將腫瘤碎片分割成大小大致為3×3×3 mm之片。儲存中間碎片以防脫水。

【2237】重複中間碎片分割。測定收集之小塊數目。若僅保留所需組織，則自「有利中間碎片」6孔盤選擇另外的有利腫瘤碎片來填充丟棄碎片，使得最多達50個碎片。

【2238】準備錐形管。將腫瘤片轉移至50 mL錐形管中。製備用於G- REX100MCS之BSC。自培育箱移除G-REX100MCS。將G-Rex100MCS培養瓶無菌傳遞至BSC中。將腫瘤碎片添加至G-Rex100MCS培養瓶中。使小塊均勻分佈。

【2239】按以下參數使G-Rex100MCS保溫：使G-Rex培養瓶保溫：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。計算：保溫時間；下限=保溫時間+252小時；上限=保溫時間+276小時。

【2240】過程完成後，捨棄所有剩餘已升溫培養基並解凍IL-2之等分試樣。

第11天-培養基製備

【2241】監測培育箱。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。

【2242】在培育箱中使3×1000 mL RPMI 1640培養基(W3013112)瓶及3×1000 mL AIM-V(W3009501)瓶升溫≥30

分鐘。自培育箱移除RPMI 1640培養基瓶。準備RPMI 1640培養基瓶。過濾培養基。解凍3x1.1 mL IL-2等分試樣(6x 10^6 IU/mL)(BR71424)。自培育箱中取出AIM-V培養基。將IL-2添加至AIM-V中。將10 L Labtainer袋及中繼泵轉移裝置無菌轉移至BSC中。

【2243】準備10L Labtainer培養基袋。準備Baxa泵。準備10L Labtainer培養基袋。將培養基泵吸至10 L Labtainer中。自Labtainer袋取下自動泵吸管。

【2244】混合培養基。輕緩地揉按袋子以進行混合。依據取樣計劃對培養基進行取樣。移除20.0 mL培養基並置於50 mL錐形管中。製備細胞計數稀釋液管 在BSC中，向四個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。將試劑自BSC轉移至2至8℃下。製備1 L轉移包。在BSC外部，將1L轉移包熔接(依據過程註釋5.11)至附接於所準備的「完全CM2第11天培養基」袋的轉移裝置上。準備飼養細胞轉移包。培育完全CM2第11天培養基。

第11天-TIL收集

【2245】預處理表格。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱移除G-Rex100MCS。準備300 mL轉移包。將轉移包熔接至G-Rex100MCS。

【2246】準備用於TIL收集之培養瓶且起始TIL收集。

收集TIL。使用GatheRex，透過血液過濾器將細胞懸浮液轉移至300 mL轉移包中。檢查膜上之黏附細胞。

【2247】沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex100MCS上之夾子。確保所有夾子閉合。熱封TIL及「上清液」轉移包。計算TIL懸浮液之體積。準備用於取樣之上清液轉移包。

【2248】抽取Bac-T樣本。在BSC中，自1L「上清液」轉移包中吸取約20.0 mL上清液，並分配至無菌的50 mL錐形管中。

【2249】依據取樣計劃接種BacT。使用適當大小之注射器自準備的標記有BacT之50 mL錐形管移除1.0 mL樣本且接種於厭氧瓶。

【2250】培育TIL。在需要之前將TIL轉移包置於培育箱中。進行細胞計數及演算。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。存活率÷2。活細胞濃度÷2。測定計數之上限及下限。下限：活細胞濃度平均值×0.9。上限：活細胞濃度平均×1.1。確認兩個計數在可接受界限內。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。

【2251】調整TIL懸浮液之體積 計算移除細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積(A)。取出的細胞計數樣本之體積(4.0 ml)(B)經調整TIL細胞總體積C = A - B。

【2252】計算活TIL細胞總數。平均活細胞濃度*：總體積；活細胞總數：C = A×B。

【2253】流動式細胞測量術之計算：若活TIL細胞總計數為≥4.0×10^7，則計算獲得用於流動式細胞測量術樣本的1.0×10^7個細胞的體積。

【2254】流動式細胞測量術所需之活細胞總數：1.0×10^7個細胞。流動式細胞測量術所需之細胞體積：活細胞濃度除以1.0×10^7個細胞A。

【2255】計算等於2.0×10^8個活細胞的TIL懸浮液之體積。按需要，計算待取出的過量TIL細胞體積，且取出過量TIL並按需要將TIL置於培育箱中。計算按需要取出之過量TIL總量。

【2256】將以供冷凍之目標細胞濃度添加至過量TIL細胞的CS-10培養基之計算量為1.0×10^8個細胞/ml。按需要使過量TIL離心。觀測錐形管 並添加CS-10。

【2257】填充小瓶。將1.0 mL細胞懸浮液等分至適當大小之冷凍小瓶中。根據SOP-00242將剩餘體積等分至適當大小之冷凍小瓶中。若體積≤0.5mL，將CS10添加至小瓶中，直至體積為0.5 mL。

樣本之TIL冷凍保存。

【2258】計算獲得用於冷凍保存之1×10^7個細胞所需之細胞體積。取出樣本以進行冷凍保存。將TIL置於培育箱中。

樣本之冷凍保存。

【2259】觀測錐形管，且緩慢添加CS-10且記錄添加0.5 mL CS10之體積。

第11天-飼養細胞

【2260】獲得飼養細胞。自LN2冷凍機獲得至少兩個不同批號的3袋飼養細胞。在準備解凍之前將細胞保存於乾冰上。準備水浴或Cryotherm。在37.0±2.0℃水浴或cytotherm處解凍飼養細胞約3至5分鐘或直至冰剛好消失為止。自培育箱移除培養基。合併解凍之飼養細胞。將飼養細胞添加至轉移包。將飼養細胞自注射器分配至轉移包中。對合併飼養細胞進行混合，且標記轉移包。

【2261】計算轉移包中之飼養細胞懸浮液之總體積。

【2262】移除細胞計數樣本。針對各樣本使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包抽吸4×1.0 mL細胞計數樣本。將每個樣本等分至經標記之冷凍小瓶中。進行細胞計數，且判定乘數選定方案且輸入乘數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上部及下限，並確認其在界限內。

【2263】調整飼養細胞懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。計算活飼養細胞總數。按需要獲得另外的飼養細胞。按需要解凍另外的飼養細胞。將第4飼養細胞袋置於拉鏈袋中，且在37.0±2.0℃水浴或cytotherm中解凍約3至5分鐘並合併另外的飼養細

胞。量測體積。量測注射器中飼養細胞之體積並記錄在下面(B)。計算飼養細胞之新的總體積。將飼養細胞添加至轉移包。

【2264】按需要製備稀釋液，將4.5 mL AIM-V培養基添加至四個15 mL錐形管中。準備細胞計數。針對各樣本使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包取出4×1.0 mL細胞計數樣本。進行細胞計數及演算。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。調整飼養細胞懸浮液之體積，且計算取出細胞計數樣本後飼養細胞懸浮液之經調整體積。飼養細胞總體積減去取出之4.0 mL。計算獲得5×10^9個活飼養細胞所需的飼養細胞懸浮液之體積。計算過量飼養細胞體積。計算待取出之過量飼養細胞之體積。取出過量飼養細胞。

【2265】使用1.0 mL注射器及16G針頭，吸取0.15 mL OKT3且添加OKT3。熱封飼養細胞懸浮液轉移包。

第11天G-REX填充及接種

【2266】設定G-Rex500MCS。自培育箱移除「完全CM2第11天培養基」並將培養基泵吸至G-Rex500MCS中。將4.5 L培養基泵吸至G-Rex500MCS中，填充至培養瓶上標示之線處。按需要熱封並使培養瓶保溫。將飼養細胞懸浮液轉移包熔接至G-Rex500MCS。將飼養細胞添加至G-Rex500MCS。熱封。將TIL懸浮液轉移包熔接至培養瓶。將TIL添加至G-Rex500MCS。熱封。將G-Rex500MCS在

37.0±2.0℃下保溫，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。

【2267】計算保溫範圍。進行計算以確定在第16天自培育箱取出G-Rex500MCS的適當時間。下限：保溫時間+108小時。上限：保溫時間+132小時。

第11天過量TIL冷凍保存

【2268】適用：冷凍過量TIL小瓶。確證在冷凍前已設定CRF。進行冷凍保存。將小瓶自速率受控冷凍機轉移至適當儲存件中。完成冷凍後，將小瓶自CRF轉移至適當儲存容器。將小瓶轉移至適當儲存件中。記錄在LN2中的儲存位置。

第16天 培養基製備

【2269】預熱AIM-V培養基。針對培養基袋1、2及3計算使培養基升溫的時間。確保所有袋子已升溫12至24小時之持續時間。設定用於上清液之10L Labtainer。使用魯爾接頭將流體泵轉移裝置之較大直徑端附接至10L Labtainer袋之一個凹形端口。設定用於上清液之10L Labtainer並進行標記。設定用於上清液之10L Labtainer。確保在自BSC之前取出前閉合所有夾子。注意：在TIL收集期間使用上清液袋，該TIL收集可與培養基製備並行地進行。

【2270】解凍IL-2。每袋CTS AIM V培養基解凍5x1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融

化為止。等分100.0 mL GlutaMax。將IL-2添加至GlutaMax。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。多級Baxa泵。準備調配培養基。將GlutaMax + IL-2泵吸至袋中。監測參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使完全CM4第16天培養基升溫。製備稀釋液。

第16天 REP分瓶

【2271】監測培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱移除G-Rex500MCS。準備1 L轉移包且標記為TIL懸浮液並稱重為1 L。

【2272】G-Rex500MCS之體積減少。根據SOP-01777將約4.5 L培養上清液自G-Rex500MCS轉移至10 L Labtainer。

【2273】準備用於TIL收集之培養瓶。取出上清液後，閉合通向紅色管線之所有夾子。

【2274】起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以使細胞剝離，以確保所有細胞剝落。

【2275】TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液轉移包之所有夾子。使用GatheRex，將細胞懸浮液轉移至TIL懸浮液轉移包中。注意：確保維持邊緣傾斜，直至收集到所有細胞及培養基為止。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-Rex500MCS上之夾子。熱封含有TIL之轉移包。熱封

含有上清液之10L Labtainer。記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算懸浮液體積。準備用於樣本取出之轉移包。自細胞上清液取出測試樣本。

【2276】無菌性及BacT測試取樣：自準備的標記有BacT之15mL錐形管取出1.0 mL樣本。移除細胞計數樣本。在BSC中，針對每個樣本使用單獨的3mL注射器，自「TIL懸浮液」轉移包移除4×1.0 mL細胞計數樣本。

【2277】移除黴漿菌樣本。使用3 mL注射器，自TIL懸浮液轉移包移除1.0 mL並置於準備的標記有「黴漿菌稀釋劑」之15 mL錐形管中。

【2278】準備用於接種之轉移包。將TIL置於培育箱中。自BSC取出細胞懸浮液，且在需要之前置於培育箱中。進行細胞計數及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣本進行稀釋，得到稀釋度為1:10。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。調整TIL懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣本後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積減去取出以用於測試之5.0 mL。

【2279】計算活TIL細胞總數。計算待接種之培養瓶之總數目。注意：待接種的G-Rex500MCS培養瓶之最大數目為五。若計算的待接種培養瓶之數目超過五，則使用可用的所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。

【2280】計算用於繼代培養之培養瓶數目。計算除所準備之袋子以外還需要之培養基袋的數目。按計算需要每兩個G-Rex-500M培養瓶準備一個10 L「CM4第16天培養基」袋。繼續接種第一GREX-500M培養瓶，同時準備另外的培養基並使其升溫。準備確定的所計算數目之其他培養基袋並使其升溫。填充G-Rex500MCS。準備泵吸培養基並將4.5 L培養基泵吸至G-Rex500MCS中。熱封。重複填充。使培養瓶保溫。計算待添加至新G-Rex500MCS培養瓶中的TIL懸浮液之目標體積。若計算之培養瓶數目超過五，則使用所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。準備用於接種之培養瓶。自培育箱移除G-Rex500MCS。準備用於泵吸之G-Rex500MCS。除較大過濾器管線外，閉合所有夾子。自培育箱取出TIL。製備用於接種之細胞懸浮液。將「TIL懸浮液」轉移包無菌熔接(依據過程註釋5.11)至泵入口管線。將TIL懸浮液袋置於稱上。

【2281】用TIL懸浮液接種培養瓶。泵吸所計算體積之TIL懸浮液至培養瓶中。熱封。填充剩餘培養瓶。

【2282】監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使培養瓶保溫。

【2283】測定在第22天自培育箱移除G-Rex500MCS的時間範圍。

第22天 洗滌緩衝液製備

【2284】準備10L Labtainer袋。在BSC中，經由魯爾接頭將4''血漿轉移裝置附接至10L Labtainer袋。準備10L Labtainer袋。在轉移出BSC之前，閉合所有夾子。注意：為待進行收集之每兩個G-Rex500MCS培養瓶準備一個10L Labtainer袋。將Plasmalyte泵吸至3000mL袋中，且藉由翻轉泵及操控袋子之位置來自3000mL Origen袋移除空氣。將25%的人類白蛋白添加至3000 mL袋中。獲得最終體積為120.0 mL的人類白蛋白25%。

【2285】製備IL-2稀釋劑。使用10 mL注射器，使用LOVO洗滌緩衝液袋上之無針注入口移除5.0 mL LOVO洗滌緩衝液。將LOVO洗滌緩衝液分配至50 mL錐形管中。

【2286】等分CRF空白袋LOVO洗滌緩衝液。使用100 mL注射器，自無針注入口吸取70.0 mL LOVO洗滌緩衝液。

【2287】解凍IL-2。解凍一份1.1 mL IL-2(6×10^6 IU/mL)，直至所有冰融化為止。IL-2製備。將50 µL IL-2儲備液(6×10^6 IU/mL)添加至標記為「IL-2稀釋劑」的50 mL錐形管中。

【2288】冷凍保存準備。將5個冷凍盒置於2至8℃下，以對其進行預處理，以便用於最終產物冷凍保存。

【2289】製備細胞計數稀釋液。在BSC中，向4個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。準備細胞計數。將4個冷凍小瓶標記上小瓶編號(1至4)。將小瓶保存在BSC以供使

用。

第22天 TIL收集

【2290】監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37±2.0℃，CO_2百分比：5%±1.5%。自培養箱中移除G-Rex500MCS培養瓶。準備TIL收集袋並進行標記。封閉額外之接頭。體積減少：將約4.5 L上清液自G-Rex500MCS轉移至上清液袋。

【2291】準備用於TIL收集之培養瓶。起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以剝離細胞。確保所有細胞剝落。起始TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液收集袋之所有夾子。TIL收集。使用GatheRex，將TIL懸浮液轉移至3000mL收集袋中。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G- Rex500MCS上之夾子，並確保閉合所有夾子。將細胞懸浮液轉移至LOVO來源袋中。閉合所有夾子。熱封。移除4x1.0 mL細胞計數樣本

【2292】進行細胞計數。利用NC-200及過程註釋5.14進行細胞計數及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣本進行稀釋。得到1:10稀釋度。測定進行細胞計數之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。測定計數之上限及下限。測定進行細胞計數之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。稱量LOVO來源袋。計算活TIL細胞總數。計算成核細胞總數。

【2293】製備黴漿菌稀釋劑。經由魯爾樣本口自一個上清液袋移除10.0 mL並置於15 mL錐形管中。

LOVO

【2294】進行「TIL G-Rex收集」方案並測定最終產物目標體積。裝載一次性套組。取出濾液袋。輸入濾液容量。將濾液容器置於實驗台上。附接PlasmaLyte。確證已附接PlasmaLyte，且觀測到PlasmaLyte正在移動。將來源容器附接至導管，且確證已附接來源容器。確認PlasmaLyte正在移動。

最終調配及填充

【2295】目標體積/袋子計算。計算待調配於空白袋中之CS-10及LOVO洗滌緩衝液的體積。準備CRF空白袋。

【2296】計算待添加至最終產物的IL-2之體積。所需最終IL-2濃度(IU/mL)-300IU/mL。IL-2工作儲備液：6 x 10^4 IU/mL。組裝連接設備。將4S-4M60無菌熔接至CC2單元接頭。將CS750冷凍袋無菌熔接(依據過程註釋5.11)至準備之集束上。將CS-10袋熔接至4S-4M60之尖端上。用IL-2製備TIL。使用適當大小之注射器，自「IL-2 6×10^4」等分試樣取出所測定量之IL-2。標記經調配TIL袋。將經調配TIL袋添加至設備。添加CS10。切換注射器。將約10 mL空氣吸取至100 mL注射器中並替換設備上之60 mL注射器。添加CS10。準備CS-750袋。分配細胞。

【2297】自最終產物袋移除空氣並獲得保留物。一旦已填充最後一個最終產物袋，即閉合所有夾子。將10 mL空氣吸取至新的100 mL注射器中並替換設備上之注射器。將保留物分配至50mL錐形管中並將管標記為「保留物」及批號。針對每個袋子重複空氣移除步驟。

【2298】準備用於冷凍保存之最終產物，包括目視檢查。在冷凍保存之前將冷凍袋保存於降溫包上或2至8℃下。

【2299】移除細胞計數樣本。使用適當大小之移液管，取出2.0 mL保留物並置於15 mL錐形管中以用於細胞計數。進行細胞計數及演算。注意：僅將一個樣本稀釋至確證稀釋度足夠的適當稀釋度。將另外的樣本稀釋至適當稀釋因數並繼續進行計數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。測定活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。計算IFN-γ。熱封最終產物袋。

【2300】依據以下例示性取樣計劃標記並收集樣本。

表 46 | 樣本時間

樣本	容器之數目	添加之樣本體積	容器類型
細胞團	1	10 mL	15 mL 錐形管
內毒素	2	10 mL	2 mL 冷凍小瓶
菌株及染色	1	10 mL	2 mL 冷凍小瓶
IDN-6	1	10 mL	2 mL 冷凍小瓶
流動式細胞測試組	1	10 mL	2 mL 冷凍小瓶
BacT 無菌性	2	10 mL	BacT 瓶
QC 保留物	4	10 mL	2 mL 冷凍小瓶
衛星小瓶	10	0.5 mL	2 mL 冷凍小瓶

[2301] 無菌性及 BacT。測試取樣。在 BSC 中，自使用適當大小之注射器收集的保留細胞懸浮液中移除 1.0 mL 樣本，並接種厭氣瓶。對好氣瓶重複以上操作。

最終產物冷凍保存

[2302] 準備速率受控冷凍機。確認已設定 CRF。設定 CRF 探針。將最終產物及樣本置於 CRF 中。測定要達至 4 ℃ ±1.5 ℃ 所需的時間並繼續進行 CRF 運行。完成 CRF 並儲存。完成運行後停止 CRF。自 CRF 取出盒子及小瓶。將盒子及小瓶轉移至氣相 LN2 進行儲存。記錄儲存位置。

後處理概述

後處理：最終藥品

(第 22 天)在第 22 天 REP 中藉由流動式細胞測量術測定 CD3+ 細胞

(第22天)革蘭氏染色法(GMP)

(第22天)藉由凝膠凝塊LAL分析(Gel Clot LAL Assay)進行細菌內毒素測試(GMP)

(第16天)BacT無菌性分析(GMP)

(第16天)藉由TD-PCR進行黴漿菌DNA偵測(GMP)

可接受的外觀屬性

(第22天)BacT無菌性分析(GMP)(第22天)

(第22天)IFN-γ分析

實例15：使用TIL外加伊匹木單抗及納武單抗的癌症療法

【2303】此實例提供一種治療癌症之方法的例示性概況，該方法包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中患者或個體已接受至少一種先前療法，其中該至少一種先前療法包括CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【2304】在切除前1至3週之間，向患者投與 伊匹木單抗，至多兩次劑量。伊匹木單抗可以標準劑量中之任一者投與，包括以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量或約200 mg至約500 mg之劑量進行投與。在一些情況下，伊匹木單抗可以1 mg/kg進行投與。在一些情況下，伊匹木單抗可以1 mg/kg IV Q6W進行投與。

【2305】在切除前1至3週之間，視情況向患者投與納武單抗。在一些情況下，患者在腫瘤收集前投與1次劑量及腫瘤收集後投與1次劑量。在一些情況下，患者在IL-2

投與後亦投與納武單抗。在一些情況下，IL-2以60,000 IU/kg進行投與。

【2306】如以下示意圖中所指示，環磷醯胺在TIL投與第-5天及第-4天(亦即，在TIL投與之前5天以及在TIL投與之前4天投與)投與。環磷醯胺可與美司鈉一起投與。環磷醯胺以60 mg/kg進行投與。

【2307】如以下示意圖中所指示，氟達拉濱在TIL投與第-5天、第-4天、第-3天、第-2天及第-1天(亦即，在TIL投與之前5天、4天、3天、2天及1天投與)投與。氟達拉濱以25 mg/m^2/天進行投與。

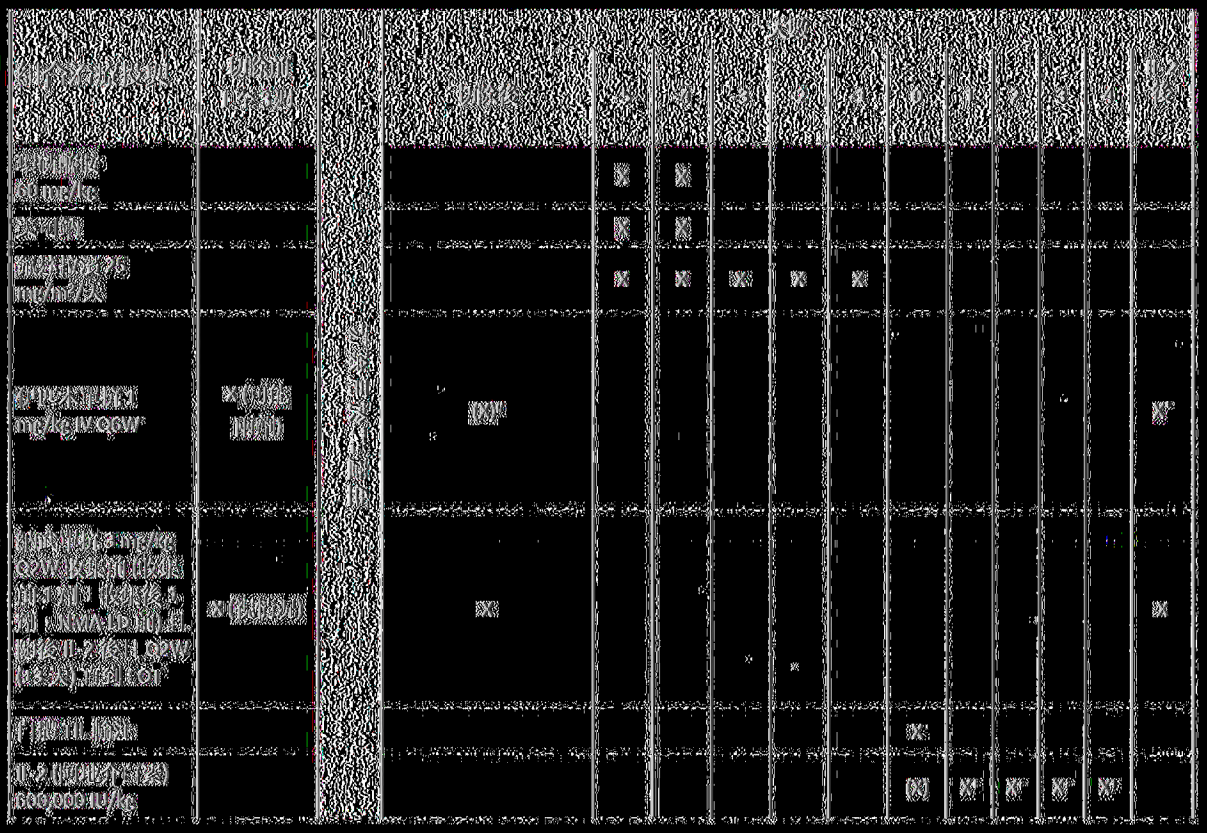
【2308】如以下示意圖中所指示，IL-2(例如阿地介白素)視情況與TIL一起投與。IL-2亦在TIL療法後第1、2、3及4天進行投與。

【2309】如以下示意圖中所指示，伊匹木單抗在IL-2投與後進行投與。伊匹木單抗可以標準劑量中之任一者投與，包括以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量或約200 mg至約500 mg之劑量進行投與。在一些情況下，伊匹木單抗可以1 mg/kg進行投與。在一些情況下，伊匹木單抗可以1 mg/kg IV Q6W進行投與。

【2310】如以下示意圖中所指示，納武單抗在IL-2投與後進行投與。在一些情況下，納武單抗在投與IL-2後1至3天進行投與。納武單抗可以標準劑量中之任一者投與，包括以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量或約200 mg至約500 mg之劑量進行投與。在一些情況下，納武單抗可以

1 mg/kg進行投與。在一些情況下，納武單抗可以3 mg/kg Q2W進行投與。在一些情況下，納武單抗可以480 mg Q4W進行投與。

表40：給藥方案



X：給與的劑量。

(X)：IL-2之第一劑必須在TIL輸注完成後3-24小時給與。

X*：間隔8-12小時注射IL-2的劑量，最多六劑；可視先前劑量之時序而延伸至第4天。

X*：與MDACC進行的初步設計討論沒有在TIL後繼續使用伊匹木單抗，若等值討論了在TIL收集前的單劑量伊匹木單抗；然而，為了申請濟在的IP，由於此係未知的，似乎謹慎的做法係在存在及不存在持續伊匹木單抗的情況下，對全部NSCLC劑量進行捕獲

(X)#：鑒於每週給藥6次，收集後進行第一劑，TIL前輸注係視情況選用的。

[2311] 提供上述實例以為一般熟習此項技術者提供如何製得並使用本發明之組合物、系統及方法之實施例的完整揭示及描述，且並不意欲限制本發明人定義其發明之範疇。本領域中熟習此項技術者顯而易見的進行本發明之上文所描述模式的修改意欲在以下申請專利範圍之範疇

內。本說明書中提及之所有專利及公開案指示本領域中熟習本發明所屬領域者之技能水準。

【2312】所有標題及章節名稱僅用於清晰及參考目的，且不應視為以任何方式具限制性。舉例而言，本領域中熟習此項技術者應瞭解根據本文所描述之本發明之精神及範疇按需要組合來自不同標題及章節之各種態樣的有用性。

【2313】本文中引用之所有參考文獻以全文引用之方式且出於所有目的併入本文中，其引用程度如同各個別公開案或專利或專利申請案經特定且個別地指示出於所有目的以全文引用的方式併入本文中一般。

【2314】如本領域中熟習此項技術者將顯而易見，可在不脫離本申請案之精神及範疇的情況下對其進行多種修改及改變。本文所描述之特定實施例及實例僅作為實例提供，且本申請案僅受隨附申請專利範圍之各項以及申請專利範圍授權之等效物之全部範疇限制。

實例16：自體腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)細胞療法以及帕博利珠單抗在未使用免疫檢查點抑制劑之晚期癌症患者中的2期療效及安全性

背景

【2315】免疫檢查點抑制劑(ICI)為治療多種晚期癌症的標準療法，包括黑色素瘤、HNSCC及子宮頸癌(Carlino MS等人，《柳葉刀(Lancet.)》2021;398(10304):1002-14；

Ferris RL等人，《新英格蘭醫學雜誌(N Engl J Med.)》2016;375(19):1856-67；Hsieh RW等人，《腫瘤學前沿(Frontiers in Oncology.)》2021;11:705614；Liu Y等人，《藥理學前沿(Frontiers in Pharmacology.)》2019;10:65；Minion LE等人，《婦科腫瘤學(Gynecologic Oncology.)》2018;148(3):609-21；Sarnaik AA等人，《臨床腫瘤學雜誌(J Clin Oncol.)》2021;39(24):2656-66；Jazaeri AA等人，《臨床腫瘤學雜誌》2019;37(增刊；摘要182))。Lifileucel(LN-144)及LN-145為使用TIL的一次性自體過繼細胞療法，在ICI治療失敗的晚期癌症患者中，作為單藥療法顯示出令人鼓舞的療效與可接受的安全性。需要新的早期組合療法來提高反應率及反應深度，並具有可控的長期安全性。探索了TIL細胞療法及帕博利珠單抗組合治療未使用ICI之黑色素瘤、HNSCC及子宮頸癌的患者。

研究設計及合格性

【2316】對於臨床研究IOV-COM-202(NCT03645928)：實體腫瘤患者之自體TIL的2期多中心研究，存在兩個組：組1A：不可切除或轉移性黑色素瘤未使用抗PD-1/PD-L1 Lifileucel+帕博利珠單抗，N=12；組2A：晚期、復發性或轉移性HNSCC未使用抗PD-1/PD-L1 LN-145+帕博利珠單抗，N=19。

【2317】對於臨床研究C-145-04(NCT03108495)：復發性、轉移性或持續性子宮頸癌患者之自體TIL的2期多中

心研究，存在一個組：組3：階段4b，持續性、復發性或轉移性子宮頸癌無先前療法(局部化學放射或手術除外)LN-145+帕博利珠單抗，N=24。

主要合格性準則

>1個用於TIL製造的可切除病變(切除後直徑>1.5cm)

>1個用於反應評估的可量測病變(根據RECIST v1.1藉由研究人員量測)

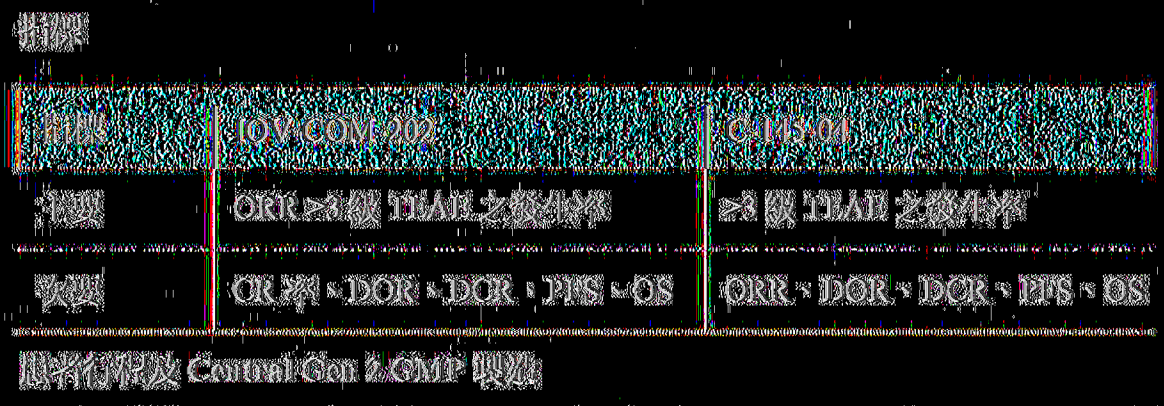
ECOG效能狀態0-1

方法

患者自2019年3月至2021年8月入選北美及EU之站點

不允許同時進行抗癌療法

根據RECIST v1.1評估反應



[2318] 圖34說明了製備TIL及其投與的示意性程序。Lifileucel及LN-145為冷凍保存之TIL輸注產品，其在中央GMP設施中使用22天Gen 2過程生產，類似於上述實例7及/或實例9中描述的Gen 2過程。

治療方案

[2319] 治療方案於圖35中說明。

【2320】治療包括：

【2321】用於TIL製造的腫瘤切除；在腫瘤切除後但在NMA-LD之前進行1劑量之帕博利珠單抗(200 mg*或400 mg)；NMA-LD(環磷醯胺60 mg/kg每日2劑及氟達拉濱25 mg/m2每日5劑)；TIL輸注(1×109至150×109個細胞)≤6次IL-2劑量(600,000 IU/kg)每8-12小時(TIL輸注完成後3-24小時)；每3週(200 mg)或6週(400 mg)持續使用帕博利珠單抗，持續≤24個月，C-145-04中所需的劑量為*200 mg；IOV-COM-202中允許200 mg或400 mg的劑量。

基線人口統計及臨床特徵

【2322】基線患者特徵與未使用ICI(黑色素瘤及HNSCC)或未進行治療(子宮頸癌)疾病的納入準則一致。

【2323】患者在基線時具有高腫瘤負荷。

【2324】在進入研究時已知疾病轉移狀態的子宮頸癌組中的所有患者均具有遠端癌轉移。

特徵	COM-202 組 1A：黑色素瘤(N=10)	COM-202 組 2A：HNSCC (N=15)	C-145-04 組 3：子宮頸癌(N=14)
性別，n (%)			
男性	8 (80.0)	13 (86.7)	0
女性	2 (20.0)	2 (13.3)	14 (100)
年齡，歲			
中位數	52.0	59.0	46.5
最小值，最大值	34, 68	24, 66	37, 73
既往接受過治療次數			
中位數	0	1.0	0
最小值，最大值	0, 2	0, 3	0, 6
既往接受治療，n (%)*			
化療	3 (60.0)	12 (66.7)	NA
放療	0	9 (60.0)	NA
抗EGFR單株抗體	0	2 (11.1)	NA
BRAF/MEKi	2 (20.0)	0	NA
其他†	1 (10.0)	0	NA
先前癌症，n (%)			
合適的子宮頸上皮內瘤變	NA	NA	9 (64.3)
原位癌	NA	NA	7 (50.0)
侵襲癌	NA	NA	3 (21.4)

*僅適用於黑色素瘤及HNSCC。†患者接受普賴松以及仁療(環磷醯胺、小紅莓、長春新鹼)。‡僅適用於子宮頸癌。

BRAFi/MEKi、BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑；HNSCC，頭頸部鱗狀細胞癌；ICI，免疫檢查點抑制劑；NA，不適用

特徵	COM-202 組 1A 黑色素瘤 (N=10)		COM-202 組 2A HNSCC (N=18)		C-145-04 組 3 子宮頸癌 (N=14)	
研究開始時的疾病癌轉移， n (%)						
	M0	1 (10.0)	M0	3 (16.7)	M0	0
	M1A	2 (20.0)	M1	13 (72.2)	M1	13 (92.9)
	M1C	7 (70.0)				
	未知	0	未知†	2 (11.1)	未知	1 (7.1)
腫瘤 PD-L1 表現，n (%)						
PD-L1 陰性	TPS <5%	4 (40.0)	CPS <20%	3 (16.7)	CPS <1%	1 (7.1)
PD-L1 陽性	TPS ≥5%	5 (50.0)	CPS ≥20%	11 (61.1)	CPS ≥1%	10 (71.4)
未知	缺失	1 (10.0)	缺失	4 (22.2)	缺失	3 (21.4)
目標病變 SOD, mm*						
平均值	99.4		65.9		68.8	
最小值，最大值	(32, 355)		(21, 134)		(16, 143)	
目標及非目標病變的數目						
中位數	4.0		5.5		7.0	
最小值，最大值	(2, 7)		(1, 8)		(1, 10)	

*SOD(1維目標病變的直徑總和)使用RECIST v1.1進行確定。†包括研究站點進入的1名MX患者。

CPS，組合陽性評分；HNSCC，頭頸部鱗狀細胞癌；NA，不適用；PD-1，計劃性細胞死亡蛋白-1；PD-L1，計劃性死亡配體-1；SOD，直徑總和；TPS，腫瘤比例評分。

治療引發之不良事件* (≥30%†)

TEAE，n (%)	COM-202 組 1A 黑色素瘤 (N=10)			COM-202 組 2A HNSCC (N=18)			C-145-04 組 3 子宮頸癌 (N=14)			總計 (N=42)		
	任何級別	級別 3/4	級別 5‡	任何級別	級別 3/4	級別 5‡	任何級別	級別 3/4	級別 5‡	任何級別	級別 3/4	級別 5‡
所有事件	10 (100)	10 (100)	1 (10.0)	18 (100)	17 (94.4)	4 (22.2)	14 (100)	13 (92.9)	0	42 (100)	40 (95.2)	5 (11.9)
發冷	9 (90.0)	1 (10.0)	0	14 (77.8)	1 (5.6)	0	13 (92.9)	1 (7.1)	0	36 (85.7)	3 (7.1)	0
發熱	9 (90.0)	4 (40.0)	0	15 (83.3)	4 (22.2)	0	9 (64.3)	0	0	33 (78.6)	8 (19.0)	0
噁心	6 (60.0)	0	0	13 (72.2)	1 (5.6)	0	12 (85.7)	1 (7.1)	0	31 (73.8)	2 (4.8)	0
疲勞	6 (60.0)	1 (10.0)	0	10 (55.6)	1 (5.6)	0	10 (71.4)	1 (7.1)	0	26 (61.9)	3 (7.1)	0
低血壓	2 (20.0)	0	0	15 (83.3)	6 (33.3)	0	9 (64.3)	2 (14.3)	0	26 (61.9)	8 (19.0)	0
血小板減少症	9 (90.0)	7 (70.0)	0	12 (66.7)	10 (55.6)	0	5 (35.7)	5 (35.7)	0	26 (61.9)	22 (52.4)	0
貧血	4 (40.0)	3 (30.0)	0	12 (66.7)	11 (61.1)	0	9 (64.3)	7 (50.0)	0	25 (59.5)	21 (50.0)	0
嘔吐	7 (70.0)	0	0	5 (27.8)	0	0	11 (78.6)	2 (14.3)	0	23 (54.8)	2 (4.8)	0
呼吸困難	4 (40.0)	0	0	8 (44.4)	1 (5.6)	0	8 (57.1)	0	0	20 (47.6)	1 (2.4)	0
腹瀉	2 (20.0)	0	0	12 (66.7)	1 (5.6)	0	4 (28.6)	0	0	18 (42.9)	1 (2.4)	0
嗜中性球減少症	4 (40.0)	4 (40.0)	0	9 (50.0)	9 (50.0)	0	4 (28.6)	4 (28.6)	0	17 (40.5)	17 (40.5)	0
脫髮	4 (40.0)	0	0	3 (16.7)	0	0	9 (64.3)	0	0	16 (38.1)	0	0
食慾下降	3 (30.0)	0	0	6 (33.3)	1 (5.6)	0	7 (50.0)	0	0	16 (38.1)	1 (2.4)	0
發熱性嗜中性球減少症	6 (60.0)	6 (60.0)	0	5 (27.8)	5 (27.8)	0	5 (35.7)	5 (35.7)	0	16 (38.1)	16 (38.1)	0
便祕	2 (20.0)	0	0	4 (22.2)	0	0	9 (64.3)	0	0	15 (35.7)	0	0
咳嗽	4 (40.0)	0	0	7 (38.9)	0	0	4 (28.6)	0	0	15 (35.7)	0	0
頭痛	3 (30.0)	0	0	4 (22.2)	0	0	8 (57.1)	1 (7.1)	0	15 (35.7)	1 (2.4)	0
高血壓	5 (50.0)	3 (30.0)	0	6 (33.3)	4 (22.2)	0	4 (28.6)	1 (7.1)	0	15 (35.7)	8 (19.0)	0
失眠	2 (20.0)	0	0	7 (38.9)	0	0	4 (28.6)	0	0	13 (31.0)	0	0
心搏過速	2 (20.0)	0	0	9 (50.0)	1 (5.6)	0	2 (14.3)	0	0	13 (31.0)	1 (2.4)	0

*TEAE包括從第一劑帕博利珠單抗或TIL輸注中的較早者到最後一劑帕博利珠單抗或TIL輸注或開始新的抗癌治療後30天發生的AE。†在總群體中。‡5級事件包括2次呼吸衰竭事件(COM-202組2A)、1次腫瘤出血(COM-202組2A)、1次敗血症(COM-202組1A)及1次敗血性休克(COM-202組2A)；所有被評估為與TIL或帕博利珠單抗不相關或不太可能相關，2個與 NMA-LD相關，乙基1個與NMA-LD及IL-2相關。

AE，不良事件；HNSCC，頭頸部鱗狀細胞癌；IL-2，介白素-2；NMA-LD，骨髓清除式淋巴球耗盡；TEAE，治療引發之不良事件；TIL，腫瘤浸潤性淋巴球。

隨時間推移的治療引發之不良事件*

【2325】隨時間推移的治療引發之不良事件(TEAE)於圖36中說明。TEAE包括從第一劑帕博利珠單抗或TIL輸注中的較早者到最後一劑帕博利珠單抗或TIL輸注或開始新的抗癌治療後30天發生的AE。

【2326】AE，不良事件；HNSCC，頭頸部鱗狀細胞癌；IL-2，介白素-2；NMA-LD，骨髓清除式淋巴球耗盡；TEAE，治療引發之不良事件；TIL，腫瘤浸潤性淋巴球。

【2327】TEAE概況與潛在疾病及帕博利珠單抗、NMA-LD及IL-2的已知概況一致。大部分TEAE發生在TIL輸注後的前2週內。IL-2劑量的中位數：黑色素瘤，5.5；HNSCC，5.0；子宮頸癌，5.5。

客觀反應率

ORR(FAS)：

黑色素瘤，60.0%

包括3(30.0%)CR

HNSCC，38.9%

子宮頸癌，57.1%

輸注之TIL細胞的中位數：

黑色素瘤，21.3×10^9

HNSCC，15.7×10^9

子宮頸癌，17.9×10^9

反應	COM-202 組 1A 黑色素瘤 (N=10)		COM-202 組 2A HNSCC (N=18)		C-145-04 組 3 子宮頸癌 (N=14)	
	n/N	% (95% CI)	n/N	% (95% CI)	n/N	% (95% CI)
完整分析集 (FAS)*						
ORR	6/10	**60.0** (26.2, 87.8)	7/18	**38.9** (17.3, 64.3)	8/14	**57.1** (28.9, 82.3)
CR	3/10	30.0	1/18	5.6	1/14	7.1
uCR†	0/10	0	1/18	5.6	0/14	0
PR	3/10	30.0	4/18	22.2	6/14	42.9
uPR‡	0/10	0	1/18	5.6	1/14	7.1
SD	3/10	30.0	7/18	38.9	5/14	35.7
PD	0/10	0	2/18	11.1	1/14	7.1
DCR§	9/10	90.0 (55.5, 99.7)	14/18	77.8 (52.4, 93.6)	13/14	92.9 (66.1, 99.8)
NE€	1/10	10.0	2/18	11.1	0/14	0
療效評估集*						
ORR	6/9	**66.7** (29.9, 92.5)	7/16	**43.8** (19.8, 70.1)	8/14	**57.1** (28.9, 82.3)
DCR‡	9/9	100 (66.4, 100)	14/16	87.5 (61.7, 98.4)	13/14	92.9 (66.1, 99.8)

*全分析集，所有接受TIL及帕博利珠單抗的患者；療效評估集，所有療效評估≥1的FAS患者。†在資料截取時，患者在初始CR後尚未進行確認評估，但已確認為PR。‡在資料截取時，患者進行第一次PR評估，但尚未達到確認評估。§DCR定義為CR+PR+SD。€由於在第一次評估前死亡而自療效評估集中排除。

CR，完全反應；DCR，疾病控制率；FAS，全分析集；HNSCC，頭頸部鱗狀細胞癌；NE，不可評估；ORR，客觀反應率；PR，部分反應；SD，病情穩定；uCR，未確認之完全反應；uPR，未確認之部分反應。

最佳整體反應

【2328】圖37顯示出整體反應。患者2A-16及C3-13進行了第一次PR評估，但在資料截取時尚未達到確認評估。

患者2A-11進行了第一次CR評估，但在資料截取時尚未達到確認評估。對於患者C3-04，與基線相比的-100%變化包括淋巴結病變消退至<10 mm。

【2329】幾乎所有可評估療效的患者都經歷腫瘤負荷之減少：黑色素瘤，100%；HNSCC，87.5%；子宮頸癌，85.7%。

反應時間(PR或較佳)

【2330】圖38顯示出反應時間。陽性，定義為TPS≥5%(黑色素瘤)、CPS≥20%(HNSCC)、CPS≥1%(子宮頸癌)。基於使用反向卡本-麥爾(Kaplan-Meier)方法的整體存活資料。

【2331】自TIL輸注日期至新抗癌療法的日期、評估結束、死亡或資料截止日期(無論哪個較早發生)呈現為每位患者的各條形圖。

【2332】CPS，組合陽性評分；CR，完全反應；PD-L1，計劃性死亡配體-1；pembro，帕博利珠單抗；PR，部分反應；TIL，腫瘤浸潤性淋巴球；TPS，腫瘤比例評分；Unk，未知。

【2333】資料截止時的持續反應：黑色素瘤，66.7%(4/6)；HNSCC，50.0%(3/6)；子宮頸癌，71.4%(5/7)。

【2334】中位數研究隨訪：黑色素瘤，11.5個月；HNSCC，7.8個月；子宮頸癌，7.6個月。

目標病變直徑之總和相對於基線的百分比變化

【2335】圖39顯示出腫瘤大小相對於基線的變化。陰性FDG-PET掃描之時間。所呈現之反應表示最佳整體反應。對於患者C3-04，與基線相比的-100%變化包括淋巴結病變消退至<10 mm。研究人員在第84天將患者2A-08報告為PR，儘管由於共病情況而無法評估目標病變。

【2336】CR，完全反應；FDG-PET，氟脫氧葡萄糖-正電子發射斷層掃描；HNSCC，頭頸部鱗狀細胞癌；PD，進行性疾病；PR，部分反應；SD，病情穩定；SOD，直徑總和；uCR，未確認之完全反應；uPR，未確認之部分反應。

結論

【2337】在未使用ICI之情況下，TIL+帕博利珠單抗在晚期黑色素瘤、HNSCC及子宮頸癌患者中產生令人鼓舞的療效及預期的安全性。幾乎所有可評估療效之患者(86%-100%)都經歷腫瘤負荷的減少。在60%的黑色素瘤患者、39%的HNSCC患者及57%的子宮頸癌患者中觀測到客觀反應(根據FAS中的RECIST v1.1)，該等比率與先前關於該組合的報告相似。在黑色素瘤組中達到30%的CR率。

【2338】使用lifileucel及LN-145之TIL細胞療法已在多種實體腫瘤類型及療法系列中證明了療效及安全性，無論作為單一療法以及與ICI組合，加強了此種潛在的同類

最佳IO組合對晚期癌症患者的價值。

【2339】在正在進行的研究IOV-COM-202(NCT03645928)及C-145-04(NCT03108495)中，TIL+ICI之組合需要在晚期癌症患者中繼續研究。

【序列表】

<110> 美商艾歐凡斯生物治療公司（Iovance Biotherapeutics, Inc.）

<120> 腫瘤浸潤性淋巴球療法與CTLA-4及PD-1抑制劑組合之治療

<140> TW 110147483
<141> 2021-12-17

<150> US 63/127,060
<151> 2020-12-17

<150> US 63/146,425
<151> 2021-02-05

<150> US 63/277,371
<151> 2021-11-09

<160> 237

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 莫羅單抗之重鏈之胺基酸序列

<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
            20                  25                  30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
```

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2

<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 莫羅單抗之輕鏈之胺基酸序列

<400> 2

```
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
            20                  25                  30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
        35                  40                  45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65                  70                  75                  80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
    130                 135                 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145                 150                 155                 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
```

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 3
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人類IL-2蛋白之胺基酸序列

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿地介白素之胺基酸序列

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2型式

<400> 5

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 6
<211> 303
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 奈瓦紐金α之胺基酸序列

<400> 6

Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn
1 5 10 15

Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
20 25 30

Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile
35 40 45

Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Ser Ser Ser
50 55 60

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
65 70 75 80

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
85 90 95

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
100 105 110

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
115 120 125

Asn Leu Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp
130 135 140

Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu

145 150 155 160

Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys
165 170 175

Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser
180 185 190

Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr
195 200 205

Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr
210 215 220

Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly
225 230 235 240

His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile
245 250 255

Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly
260 265 270

Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr
275 280 285

His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly
290 295 300

<210> 7
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2型式

<400> 7

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly

1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Ala Arg Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys
20 25 30

Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu
35 40 45

Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn
50 55 60

Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly
85 90 95

Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser
100 105 110

Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser
115 120 125

Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu
130 135 140

Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro
145 150 155 160

Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Ser
165 170 175

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro
180 185 190

His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser
195 200 205

Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Glu Ser Arg Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 黏蛋白域多肽

<400> 8

Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro
1 5 10 15

<210> 9
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人類IL-4蛋白之胺基酸序列

<400> 9

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

```
Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
    50                  55                  60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65                  70                  75                  80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
                85                  90                  95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
            100                 105                 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
        115                 120                 125

Ser Ser
    130
```

<210> 10
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人類IL-7蛋白之胺基酸序列

<400> 10

```
Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
1               5                   10                  15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
            20                  25                  30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
        35                  40                  45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
    50                  55                  60
```

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 11
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人類IL-15蛋白之胺基酸序列

<400> 11

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100 105 110

Asn Thr Ser
115

<210> 12
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人類IL-21蛋白之胺基酸序列

<400> 12

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
115 120 125

Ser Glu Asp Ser
130

<210> 13
<211> 153
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2序列

<400> 13

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 14
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2突變蛋白序列

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 15
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IL-2突變蛋白序列

<400> 15

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 16
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2

<400> 16

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val
130 135 140

Gly
145

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR2

<400> 17

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR3

<400> 18

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 19
<211> 141
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 kabat

<400> 19

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
130 135 140

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 kabat

<400> 20

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 kabat

<400> 21

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 22
<211> 142
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 clothia

<400> 22

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe
35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met

130 135 140

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 clothia

<400> 23

Trp Trp Asp Asp Lys
1 5

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 clothia

<400> 24

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 25
<211> 143
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 IMGT

<400> 25

Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
1 5 10 15

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
20 25 30

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe

35 40 45

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
65 70 75 80

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
85 90 95

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
100 105 110

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
115 120 125

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser
130 135 140

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 IMGT

<400> 26

Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 IMGT

<400> 27

Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 28
<211> 253
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之VH鏈

<400> 28

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
50 55 60

Leu Thr Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
115 120 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
130 135 140

```
Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145                 150                 155                 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
            180                 185                 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
        195                 200                 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225                 230                 235                 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
                245                 250
```

<210> 29
<211> 533
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之重鏈

<400> 29

```
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
1               5                   10                  15

Ala Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
            20                  25                  30

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
        35                  40                  45
```

```
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
    50                  55                  60

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
65                  70                  75                  80

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
                85                  90                  95

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
            100                 105                 110

Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
        115                 120                 125

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr
    130                 135                 140

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
145                 150                 155                 160

Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala
                165                 170                 175

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
            180                 185                 190

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        195                 200                 205

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    210                 215                 220

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
225                 230                 235                 240

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
```

245 250 255

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
260 265 270

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
275 280 285

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
290 295 300

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
305 310 315 320

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
325 330 335

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ala Val
340 345 350

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
355 360 365

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
370 375 380

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
385 390 395 400

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Ala Ala
405 410 415

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
420 425 430

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
435 440 445

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
450 455 460

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
465 470 475 480

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
485 490 495

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
500 505 510

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
515 520 525

Leu Ser Pro Gly Lys
530

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之LCDR1 kabat

<400> 30

Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 kabat

<400> 31

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之LCDR3 kabat

<400> 32

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之LCDR1 chothia

<400> 33

Gln Leu Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 chothia

<400> 34

Asp Thr Ser
1

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IgG.IL2R67A.H1之LCDR3 chothia

<400> 35

Gly Ser Gly Tyr Pro Phe
1 5

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL鏈

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 213
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈

<400> 37

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
            20                  25                  30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
        35                  40                  45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65                  70                  75                  80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
            100                 105                 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175
```

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 38
<211> 583
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈

<400> 38

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ala Pro Thr
20 25 30

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
35 40 45

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
50 55 60

Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
65 70 75 80

Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
85 90 95

Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
100 105 110

```
Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
        115                 120                 125

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
    130                 135                 140

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr
145                 150                 155                 160

Leu Thr Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro
                165                 170                 175

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys
            180                 185                 190

Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr
        195                 200                 205

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe
225                 230                 235                 240

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
                245                 250                 255

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
            260                 265                 270

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
        275                 280                 285

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
    290                 295                 300

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
```

305 310 315 320

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
325 330 335

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
340 345 350

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
355 360 365

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
370 375 380

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
385 390 395 400

Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
405 410 415

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
420 425 430

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
435 440 445

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
450 455 460

Ala Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
465 470 475 480

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
485 490 495

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
500 505 510

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
515 520 525

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
530 535 540

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
545 550 555 560

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
565 570 575

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580

<210> 39
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

```
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
                85                  90                  95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
            100                 105                 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
            180                 185                 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
        195                 200                 205

Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 40
<211> 255
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類4-1BB之胺基酸序列

<400> 40

```
Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
1               5                   10                  15
```

Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
20 25 30

Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
50 55 60

Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
65 70 75 80

Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
85 90 95

Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
115 120 125

Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys
130 135 140

Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
165 170 175

Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
195 200 205

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

210 215 220

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
225 230 235 240

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
245 250 255

<210> 41
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類4-1BB之胺基酸序列

<400> 41

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1 5 10 15

Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
20 25 30

Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
50 55 60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
65 70 75 80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
85 90 95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
100 105 110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn

115 120 125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
130 135 140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
145 150 155 160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ile Phe Ile Thr Leu Leu Phe
195 200 205

Ser Val Leu Lys Trp Ile Arg Lys Lys Phe Pro His Ile Phe Lys Gln
210 215 220

Pro Phe Lys Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Glu Glu Asp Ala Cys Ser
225 230 235 240

Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu Glu Gly Gly Gly Gly Gly Tyr Glu Leu
245 250 255

<210> 42
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之重鏈

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr

20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 43
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之輕鏈

<400> 43

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly

130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 44
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之重鏈可變區（VH）。

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 45
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之輕鏈可變區（VL）。

<400> 45

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之重鏈CDR1

<400> 46

Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之重鏈CDR2

<400> 47

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之重鏈CDR3

<400> 48

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
1 5

<210> 49

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之輕鏈CDR1

<400> 49

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His
1 5 10

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之輕鏈CDR2

<400> 50

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗（PF-05082566）之輕鏈CDR3

<400> 51

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val
1 5 10

<210> 52
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之重鏈

<400> 52

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1               5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
            20                  25                  30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
    50                  55                  60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
            100                 105                 110

Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
```

195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 53
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之輕鏈

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 54
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之重鏈可變區（VH）

<400> 54

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
115 120

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之輕鏈可變區（VL）

<400> 55

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

<210> 56
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之重鏈CDR1

<400> 56

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 57
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之重鏈CDR2

<400> 57

Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之重鏈CDR3

<400> 58

Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之輕鏈CDR1

<400> 59

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 60
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之輕鏈CDR2

<400> 60

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗（BMS-663513）之輕鏈CDR3

<400> 61

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 62
<211> 230
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域

<400> 62

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 63
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 63

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 64
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 64

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 65

<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 65

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 66
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 66

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 67
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 67

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

20 25

<210> 68
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 68

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 69
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 69

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> 70
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 70

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 71

Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu
20

<210> 72
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 72

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His
1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
20 25

<210> 73
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之Fc域

<400> 73

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20 25 30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
245

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 74

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 75

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 76
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TNFRSF促效劑融合蛋白之連接子

<400> 76

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

<210> 77
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB配體（4-1BBL）胺基酸序列

<400> 77

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 78
<211> 168
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BBL多肽之可溶部分

<400> 78

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
1 5 10 15

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
20 25 30

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
35 40 45

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg
50 55 60

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
65 70 75 80

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
85 90 95

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
100 105 110

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
115 120 125

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
130 135 140

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165

<210> 79
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之重鏈可變區（VH）

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 80
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之輕鏈可變區（VL）

<400> 80

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之重鏈可變區（VH）

<400> 81

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 82
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之輕鏈可變區（VL）

<400> 82

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 83
<211> 120
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區（VH）

<400> 83

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr
115 120

<210> 84
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區（VL）

<400> 84

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
100 105

<210> 85
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類OX40之胺基酸序列

<400> 85

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys

50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 86
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠類OX40之胺基酸序列

<400> 86

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
100 105 110

Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
115 120 125

Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
130 135 140

Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
145 150 155 160

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175

Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 87
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之重鏈

<400> 87

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 88
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之輕鏈

<400> 88

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

```
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 89
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之重鏈可變區（VH）

<400> 89

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
            20                  25                  30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
        35                  40                  45
```

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 90
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之輕鏈可變區（VL）

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之重鏈CDR1

<400> 91

Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
1 5

<210> 92
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之重鏈CDR2

<400> 92

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
1 5 10

<210> 93
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之重鏈CDR3

<400> 93

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 94
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之輕鏈CDR1

<400> 94

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之輕鏈CDR2

<400> 95

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5 10

<210> 96
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗（MEDI-0562）之輕鏈CDR3

<400> 96

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
1 5

<210> 97
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈

<400> 97

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190
```

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 98
<211> 180
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈

<400> 98

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr
180

<210> 99
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區（VH）

<400> 99

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈可變區（VL）

<400> 100

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1

<400> 101

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2

<400> 102

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3

<400> 103

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 104

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1

<400> 104

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2

<400> 105

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 106
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3

<400> 106

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 107
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈

<400> 107

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
            100                 105                 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
    130                 135                 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
```

195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 108
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈

<400> 108

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 109
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區（VH）

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區（VL）

<400> 110

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 111
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1

<400> 111

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 112
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR2

<400> 112

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 113
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR3

<400> 113

Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 114
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR1

<400> 114

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 115
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR2

<400> 115

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR3

<400> 116

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 117
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈可變區（VH）

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈可變區（VL）

<400> 118

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 119
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR1

<400> 119

Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR2

<400> 120

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15

Arg

<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR3

<400> 121

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR1

<400> 122

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 123
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR2

<400> 123

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR3

<400> 124

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 125
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈可變區（VH）

<400> 125

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 126
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈可變區（VL）

<400> 126

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 127

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR1

<400> 127

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 128
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR2

<400> 128

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 129
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR3

<400> 129

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR1

<400> 130

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR3

<400> 131

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR3

<400> 132

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 133
<211> 183
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40配體（OX40L）胺基酸序列

<400> 133

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
1 5 10 15

```
Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
            20                  25                  30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
        35                  40                  45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
    50                  55                  60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
65                  70                  75                  80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
                85                  90                  95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
            100                 105                 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
    130                 135                 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145                 150                 155                 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
                165                 170                 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
            180
```

<210> 134
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40L多肽之可溶部分

<400> 134

Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
20 25 30

Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
35 40 45

Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
50 55 60

Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
65 70 75 80

Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
85 90 95

Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
100 105 110

Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
115 120 125

Cys Val Leu
130

<210> 135
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40L多肽之替代可溶部分

<400> 135

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
1 5 10 15

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
20 25 30

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
35 40 45

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
50 55 60

Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
65 70 75 80

Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
85 90 95

Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
100 105 110

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
115 120 125

<210> 136
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體008之重鏈可變區（VH）

<400> 136

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 137
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體008之輕鏈可變區（VL）

<400> 137

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 138
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體011之重鏈可變區（VH）

<400> 138

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 139
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體011之輕鏈可變區（VL）

<400> 139

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 140
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體021之重鏈可變區（VH）

<400> 140

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 141
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體021之輕鏈可變區（VL）

<400> 141

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 142
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體023之重鏈可變區（VH）

<400> 142

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 143
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體023之輕鏈可變區（VL）

<400> 143

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 144
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 144

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 145
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 145

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 146
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 146

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro
115 120

<210> 147
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 147

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 148
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 148

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 149
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 149

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 150
<211> 107
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 150

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 151
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 151

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 152
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 152

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 153
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 153

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 154
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 154

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 155
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 155

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 156
<211> 138
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區（VH）

<400> 156

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 157
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區（VL）

<400> 157

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45

```
Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
    50                  55                  60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
                85                  90                  95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
            100                 105                 110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
        115                 120                 125
```

<210> 158
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 158

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
            20                  25                  30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
        115                 120                 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
    130                 135                 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145                 150                 155                 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                165                 170                 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
            180                 185                 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
        195                 200                 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
    210                 215                 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225                 230                 235                 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
                245                 250                 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
            260                 265                 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
```

275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 159
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 159

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 160
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 160

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 161
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 161

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 162
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 162

Asn Ser Gly Met His

1 5

<210> 163
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 163

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 164
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 164

Asn Asp Asp Tyr
1

<210> 165
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 165

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 166

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 166

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 167
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 167

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 168
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 168

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 169

<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 169

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 170
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 170

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 171
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 171

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 172
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 172

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 173
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 173

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 174

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 175
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 175

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 176
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 176

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
1 5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 177

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 178
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 178

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225                 230                 235                 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
```

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 179
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 179

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
115 120 125

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
130 135 140

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
145 150 155 160

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
165 170 175

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
180 185 190

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
195 200 205

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
210 215 220

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
225 230 235 240

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
245 250 255

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260 265

<210> 180
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 180

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 181
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 181

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 182
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 182

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 183
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 183

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 184
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 184

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 185
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 185

Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 186

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 187
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 187

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 188
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 188

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 189
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 189

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 190
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 190

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 191
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 191

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 192

Ser Tyr Ile Met Met
1 5

<210> 193
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 193

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 194

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 195
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 195

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 196
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 196

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 197
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 197

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val
1 5 10

<210> 198
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 198

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 199
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 199

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 200

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 200

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 201
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 201

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
            20                  25                  30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 202

```
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1               5                  10
```

<210> 203
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 203

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 204
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 204

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 205
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 205

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 206

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 207
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 207

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 208
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 208

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His
225

<210> 209
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 209

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 210
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 210

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 211
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 211

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 212
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 212

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 213
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 213

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
1 5 10

<210> 214
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 214

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 215
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 215

Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr
1 5

<210> 216
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 216

Gly Ala Phe

1

<210> 217
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 217

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 218
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 218

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
210 215 220

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 219
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 219

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 220
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 220

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
85 90 95

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165

<210> 221
<211> 139
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 221

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys
20 25 30

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
100 105 110

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
115 120 125

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135

<210> 222
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 222

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 223
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 223

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

<210> 224
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 224

Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 225
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 225

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
1 5 10

<210> 226
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 226

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 227
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 227

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 228
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈胺基酸序列

<400> 228

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 229
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈胺基酸序列

<400> 229

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 230
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈可變區（VH）胺基酸序列

<400> 230

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 231
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈可變區（VL）胺基酸序列

<400> 231

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 232
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR1胺基酸序列

<400> 232

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
1 5

<210> 233
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR2胺基酸序列

<400> 233

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 234
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR3胺基酸序列

<400> 234

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 235
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列

<400> 235

Gln Ser Val Ser Arg Tyr
1 5

<210> 236
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列

<400> 236

Gly Ala Ser
1

<210> 237
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列

<400> 237

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療有需要之患者或個體的癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，視情況其中該患者或個體已接受至少一種先前療法，其中該至少一種先前療法包括CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項2】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得

該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項3】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項4】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4

抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情

況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項5】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產

生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項6】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(c) 將該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項7】一種治療有需要之患者或個體之黑色素瘤的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該

個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該腫瘤碎斷成腫瘤碎片；

(c) 將該等腫瘤碎片與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項8】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，該

方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況

下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項9】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得

該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項10】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群

體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項11】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，該

方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項12】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(c) 將該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)

及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項13】一種治療有需要之患者或個體之黑色素瘤的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該腫瘤碎斷成腫瘤碎片；

(c) 將該等腫瘤碎片與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項14】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該

第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項15】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體

未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所

收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項16】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面

區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項17】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴

增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項18】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(c) 將該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項19】一種治療有需要之患者或個體之黑色素

瘤的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體、CTLA-4抑制劑及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該腫瘤碎斷成腫瘤碎片；

(c) 將該等腫瘤碎片與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項20】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群

體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項21】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項22】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑

制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸

注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項23】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項24】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第

一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(c) 將該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項25】一種治療有需要之患者或個體之黑色素瘤的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，而不進一步投與CTLA-4抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方

法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該腫瘤碎斷成腫瘤碎片；

(c) 將該等腫瘤碎片與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項26】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及CTLA-4抑制劑，而不進一步投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自該個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得及/或接受來自該個體或患者所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體係TIL之治療性群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之TIL之治療性群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項27】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及CTLA-4抑制劑，而不進一步投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將獲自個體之腫瘤樣本處理成i)多個腫瘤碎片或(ii)腫瘤碎解物或(iii)冷凍保存之腫瘤碎解物而獲得來自該個體所切除之腫瘤的第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該

第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項28】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及CTLA-4抑制劑，而不進一步投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所

收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項29】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及CTLA-4抑制劑，而不進一步投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該等腫瘤碎片添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增從而產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3天至11天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(d) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7天至11天以獲得

該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不打開該系統的情況下發生；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不打開該系統的情況下發生；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存包含來自步驟(f)之所收集之TIL群體的該輸注袋；

(h) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項30】一種治療有需要之患者或個體之癌症的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及CTLA-4抑制劑，而不進一步投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該個體或患者獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式獲得及/或接受第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(c) 將該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項31】一種治療有需要之患者或個體之黑色素瘤的方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體及CTLA-4抑制劑，而不進一步投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑，其中該患者或個體未使用過免疫檢查點抑制劑，該方法包含以下步驟：

(a) 視情況自手術切除、針吸活體組織切片、粗針活體組織切片、小活體組織切片或用於自該患者或個體獲得

含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的其他方式來切除該個體或患者之腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，其中該個體或患者先前已用CTLA-4抑制劑治療；

(b) 將該腫瘤碎斷成腫瘤碎片；

(c) 將該等腫瘤碎片與第一細胞培養基接觸；

(d) 對該第一細胞培養基中之該第一TIL群體進行初始擴增(或啟始第一擴增)從而獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少5倍，其中該第一細胞培養基包含IL-2，視情況其中該啟始第一擴增發生1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基進行該第二TIL群體之快速擴增以獲得第三TIL群體；其中在自該快速擴增開始7至8天之後，該第三TIL群體在數目上比該第二TIL群體大至少50倍；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及視情況經輻照之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC)；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況可在初始該快速第二擴增後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天進行該第二TIL擴增；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 向患有該黑色素瘤之該個體或患者投與該第三TIL群體之治療有效部分；及

(i) 向該個體投與PD-1抑制劑或PD-L1抑制劑。

【請求項32】如請求項1至31中任一項之方法，其中該患者或個體患有腫瘤，該腫瘤不可切除、轉移、耐藥及

/或難以用CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑治療。

【請求項33】如請求項2至31中任一項之方法，其中在步驟(c)中，該第二TIL群體在數目上比該第一TIL群體大至少50倍。

【請求項34】如請求項2至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑係與治療有效劑量之該第三TIL群體同時投與。

【請求項35】如請求項2至25中任一項之方法，其中在投與治療有效劑量之該第三TIL群體之後維持投與該PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【請求項36】如請求項2至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑係在投與治療有效劑量之該第三TIL群體之後投與。

【請求項37】如請求項2至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑不與治療有效劑量之該第三TIL群體同時投與。

【請求項38】如請求項2至25中任一項之方法，其中在投與治療有效劑量之該第三TIL群體之後至少一週向該個體投與該PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【請求項39】如請求項2至25中任一項之方法，其中在投與治療有效劑量之該第三TIL群體之後視情況向該患者投與該CTLA-4抑制劑。

【請求項40】如請求項2至25中任一項之方法，其中

在步驟(a)中切除及/或獲得及/或接受之前視情況向該患者投與PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑。

【請求項41】如請求項1至13中任一項之方法，其中該患者或個體先前已用CTLA-4抑制劑或其生物類似物及/或PD-1抑制劑或其生物類似物及/或PD-L1抑制劑或其生物類似物治療。

【請求項42】如請求項1至13中任一項之方法，其中該腫瘤先前已用PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑或其生物類似物治療。

【請求項43】如請求項1至25之方法，其中該PD-1抑制劑係選自由以下組成之群組：納武單抗(nivolumab)、帕博利珠單抗(pembrolizumab)及其生物類似物。

【請求項44】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-L1抑制劑係選自由以下組成之群組：阿維魯單抗(avelumab)、阿替利珠單抗(atezolizumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)及其生物類似物。

【請求項45】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，其中該CTLA-4抑制劑係選自由以下組成之群組：伊匹木單抗(ipilumumab)、曲美單抗(tremelimumab)及其生物類似物。

【請求項46】如請求項2至31中任一項之方法，其中該第一擴增在約11天之時段內進行。

【請求項47】如請求項2至31中任一項之方法，其中該初始擴增在約11天之時段內進行。

【請求項48】如請求項2至31中任一項之方法，其中該IL-2在該第一擴增中之該細胞培養基中以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在。

【請求項49】如請求項2至31中任一項之方法，其中該IL-2在該初始擴增中之該細胞培養基中以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在。

【請求項50】如請求項2至31中任一項之方法，其中在該第二擴增步驟中，該IL-2以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且該OKT-3抗體以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【請求項51】如請求項2至31中任一項之方法，其中在該快速擴增步驟中，該IL-2以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且該OKT-3抗體以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【請求項52】如請求項2至31之方法，其中該第一擴增使用透氣容器來進行。

【請求項53】如請求項2至31中任一項之方法，其中該初始擴增使用透氣容器來進行。

【請求項54】如請求項2至31中任一項之方法，其中該第二擴增使用透氣容器來進行。

【請求項55】如請求項2至31之方法，其中該快速擴增使用透氣容器來進行。

【請求項56】如請求項2至31中任一項之方法，其中該第一細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細

胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項57】如請求項2至31之方法，其中該第一擴增之該細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項58】如請求項2至31中任一項之方法，其中該第二細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項59】如請求項2至31中任一項之方法，其中該第二擴增之該細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群組的細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項60】如請求項1至59中任一項之方法，其進一步包含在向該患者投與該等TIL之前用非骨髓清除式淋巴球耗盡方案治療該患者的步驟。

【請求項61】如請求項60之方法，其中該非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱(fludarabine)持續五天。

【請求項62】如請求項60之方法，其中該非骨髓清除式淋巴球耗盡方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺及以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，然後以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【請求項63】如請求項60至61中任一項之方法，其中該環磷醯胺與美司鈉(mesna)一起投與。

【請求項64】如請求項1至63中任一項之方法，其進

一步包含在向該患者投與該第三TIL群體之後次日開始用IL-2方案治療該患者的步驟。

【請求項65】如請求項1至63中任一項之方法，其進一步包含在向該患者投與該第三TIL群體之同一天開始用IL-2方案治療該患者的步驟。

【請求項66】如請求項64之方法，其中該IL-2方案係在向該患者完成投與該第三TIL群體之後3至24小時投與。

【請求項67】如請求項66之方法，其中該IL-2方案為包含600,000或720,000 IU/kg阿地介白素或其生物類似物或變異體之高劑量IL-2方案，其以每八小時15分鐘的推注靜脈內輸注形式投與直至耐受為止。

【請求項68】如請求項1至67中任一項之方法，其中投與治療有效之TIL群體且該TIL群體包含約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL。

【請求項69】如請求項2至68中任一項之方法，其中該初始擴增係在21天或更短之時段內進行。

【請求項70】如請求項2至68中任一項之方法，其中該初始擴增係在7天或更短之時段內進行。

【請求項71】如請求項2至68中任一項之方法，其中該快速擴增係在7天或更短之時段內進行。

【請求項72】如請求項2至68中任一項之方法，步驟(c)中之第一擴增及步驟(d)中之該第二擴增各自單獨地在11天之時段內進行。

【請求項73】如請求項2至68中任一項之方法，其中

步驟(a)至(f)在約10天至約22天內進行。

【請求項74】如請求項1至13中任一項之方法，其中該個體經歷先前治療，其包含在切除該腫瘤之前投與CTLA-4抑制劑及/或PD-1抑制劑。

【請求項75】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，該CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且該伊匹木單抗或其生物類似物係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。

【請求項76】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，該CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且該伊匹木單抗或其生物類似物係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。

【請求項77】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，該CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且該伊匹木單抗或其生物類似物每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【請求項78】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，其中該CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且該曲美單抗或其生物類似物係以約1 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg或75 mg之劑量投與。

【請求項79】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，其中該CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且該曲美單抗或其生物類似物每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【請求項80】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，其中該納武單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。

【請求項81】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，其中該納武單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。

【請求項82】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且該納武單抗每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【請求項83】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中該帕博利珠單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。

【請求項84】如請求項1至請求項25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中該帕博利珠單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。

【請求項85】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且該帕博利珠單抗每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與一次。

【請求項86】如請求項1至7或14至19或26至31中任一項之方法，其中該CTLA-4抑制劑在切除該腫瘤之前1、2、3、4或5週投與，且視情況在切除該腫瘤之前1、2或3週投與。

【請求項87】如請求項1至25中任一項之方法，其中該PD-1抑制劑及/或PD-L1抑制劑在IL-2投與之後1、2、3、4或5天投與，Tablend視情況在IL-2投與之後1、2或3天投與。

【請求項88】如請求項2至87中任一項之方法，其中在步驟(a)中將獲自該個體之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物包含在酶素性培養基中培育該腫瘤樣本。

【請求項89】如請求項2至87中任一項之方法，其中在步驟(a)中將獲自該個體之腫瘤樣本處理成腫瘤碎解物進一步包含以機械方式破壞該腫瘤樣本以便解離該腫瘤樣本。

【請求項90】如請求項2至87中任一項之方法，其中在步驟(a)中將獲自該個體之腫瘤樣本處理成包含酶素性培養基之腫瘤碎解物進一步包含使用密度梯度分離純化該解離的腫瘤樣本。

【請求項91】如請求項90之方法，其中該酶素性培養基包含DNA酶。

【請求項92】如請求項90之方法，其中該酶素性培養基包含30單位/mL之DNA酶。

【請求項93】如請求項90之方法，其中該酶素性培養基包含膠原蛋白酶。

【請求項94】如請求項90之方法，其中該酶素性培養基包含1.0 mg/mL膠原蛋白酶。

(發明圖式)

(無)

1.一種X

2.如X

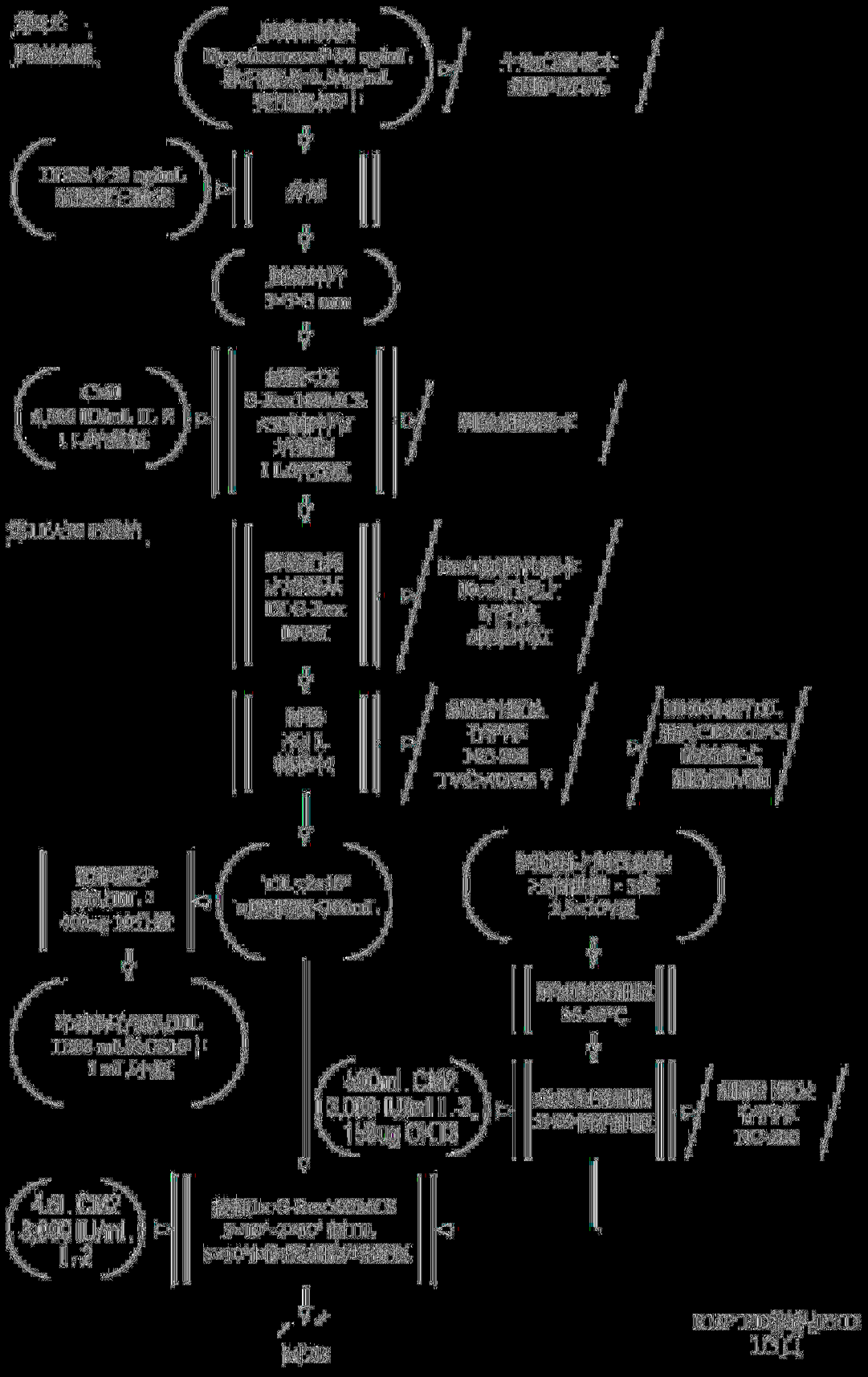
3.如X

4.如X

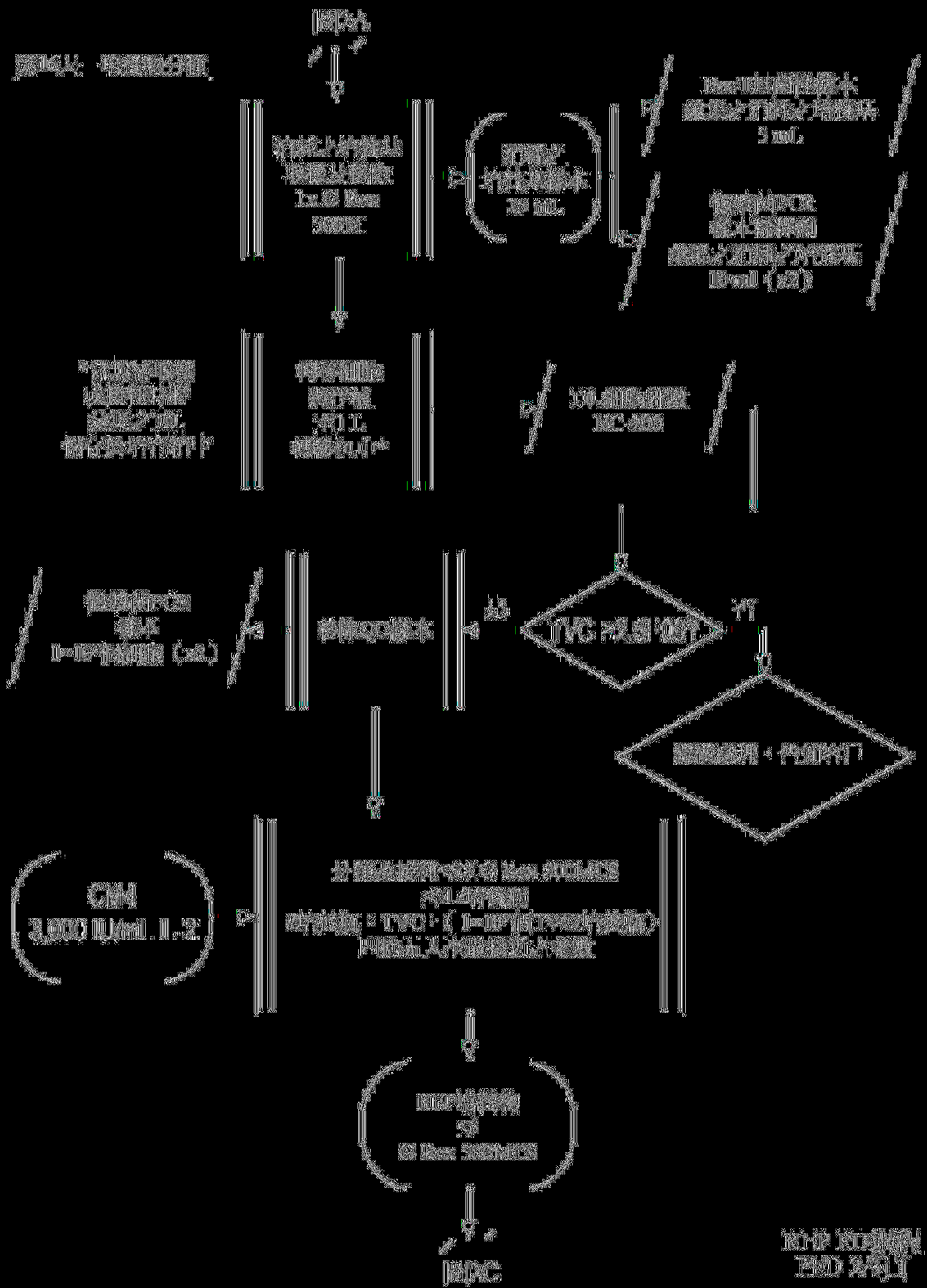
5.如X

6.如X

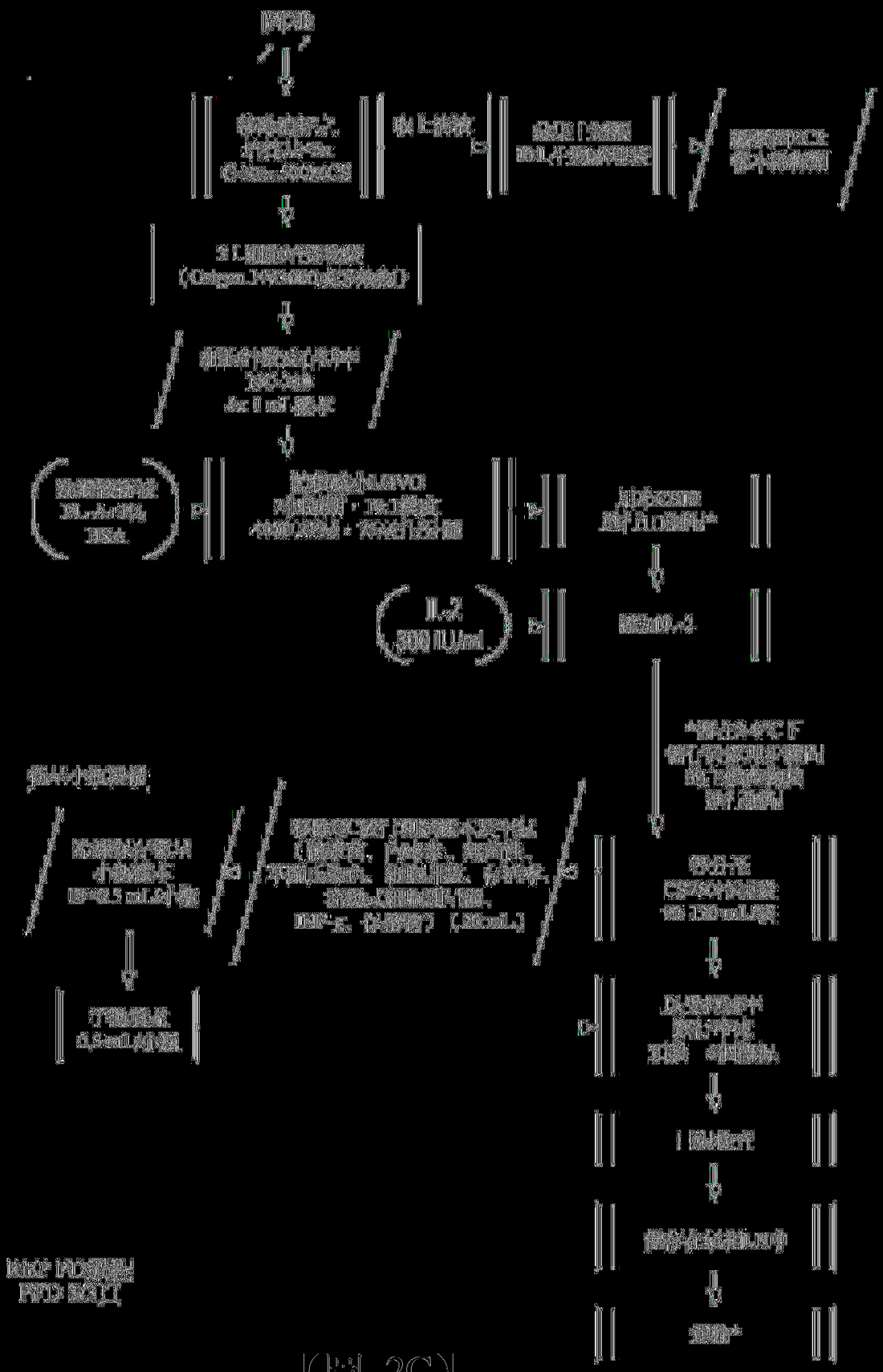
(圖1)



(時 2A)



(圖 2B)



(圖 2C)

圖3

第一實施例
第二實施例
第三實施例
第四實施例
第五實施例
第六實施例
第七實施例
第八實施例
第九實施例
第十實施例
第十一實施例
第十二實施例
第十三實施例
第十四實施例
第十五實施例
第十六實施例
第十七實施例
第十八實施例
第十九實施例
第二十實施例
第二十一實施例
第二十二實施例
第二十三實施例
第二十四實施例
第二十五實施例
第二十六實施例
第二十七實施例
第二十八實施例
第二十九實施例
第三十實施例
第三十一實施例
第三十二實施例
第三十三實施例
第三十四實施例
第三十五實施例
第三十六實施例
第三十七實施例
第三十八實施例
第三十九實施例
第四十實施例
第四十一實施例
第四十二實施例
第四十三實施例
第四十四實施例
第四十五實施例
第四十六實施例
第四十七實施例
第四十八實施例
第四十九實施例
第五十實施例
第五十一實施例
第五十二實施例
第五十三實施例
第五十四實施例
第五十五實施例
第五十六實施例
第五十七實施例
第五十八實施例
第五十九實施例
第六十實施例
第六十一實施例
第六十二實施例
第六十三實施例
第六十四實施例
第六十五實施例
第六十六實施例
第六十七實施例
第六十八實施例
第六十九實施例
第七十實施例
第七十一實施例
第七十二實施例
第七十三實施例
第七十四實施例
第七十五實施例
第七十六實施例
第七十七實施例
第七十八實施例
第七十九實施例
第八十實施例
第八十一實施例
第八十二實施例
第八十三實施例
第八十四實施例
第八十五實施例
第八十六實施例
第八十七實施例
第八十八實施例
第八十九實施例
第九十實施例
第九十一實施例
第九十二實施例
第九十三實施例
第九十四實施例
第九十五實施例
第九十六實施例
第九十七實施例
第九十八實施例
第九十九實施例
第一百實施例
第一百一實施例
第一百二實施例
第一百三實施例
第一百四實施例
第一百五實施例
第一百六實施例
第一百七實施例
第一百八實施例
第一百九實施例
第一百十實施例
第一百十一實施例
第一百十二實施例
第一百十三實施例
第一百十四實施例
第一百十五實施例
第一百十六實施例
第一百十七實施例
第一百十八實施例
第一百十九實施例
第一百二十實施例
第一百二十一實施例
第一百二十二實施例
第一百二十三實施例
第一百二十四實施例
第一百二十五實施例
第一百二十六實施例
第一百二十七實施例
第一百二十八實施例
第一百二十九實施例
第一百三十實施例
第一百三十一實施例
第一百三十二實施例
第一百三十三實施例
第一百三十四實施例
第一百三十五實施例
第一百三十六實施例
第一百三十七實施例
第一百三十八實施例
第一百三十九實施例
第一百四十實施例
第一百四十一實施例
第一百四十二實施例
第一百四十三實施例
第一百四十四實施例
第一百四十五實施例
第一百四十六實施例
第一百四十七實施例
第一百四十八實施例
第一百四十九實施例
第一百五十實施例
第一百五十一實施例
第一百五十二實施例
第一百五十三實施例
第一百五十四實施例
第一百五十五實施例
第一百五十六實施例
第一百五十七實施例
第一百五十八實施例
第一百五十九實施例
第一百六十實施例
第一百六十一實施例
第一百六十二實施例
第一百六十三實施例
第一百六十四實施例
第一百六十五實施例
第一百六十六實施例
第一百六十七實施例
第一百六十八實施例
第一百六十九實施例
第一百七十實施例
第一百七十一實施例
第一百七十二實施例
第一百七十三實施例
第一百七十四實施例
第一百七十五實施例
第一百七十六實施例
第一百七十七實施例
第一百七十八實施例
第一百七十九實施例
第一百八十實施例
第一百八十一實施例
第一百八十二實施例
第一百八十三實施例
第一百八十四實施例
第一百八十五實施例
第一百八十六實施例
第一百八十七實施例
第一百八十八實施例
第一百八十九實施例
第一百九十實施例
第一百九十一實施例
第一百九十二實施例
第一百九十三實施例
第一百九十四實施例
第一百九十五實施例
第一百九十六實施例
第一百九十七實施例
第一百九十八實施例
第一百九十九實施例
第二百實施例
第二百一實施例
第二百二實施例
第二百三實施例
第二百四實施例
第二百五實施例
第二百六實施例
第二百七實施例
第二百八實施例
第二百九實施例
第二百十實施例
第二百十一實施例
第二百十二實施例
第二百十三實施例
第二百十四實施例
第二百十五實施例
第二百十六實施例
第二百十七實施例
第二百十八實施例
第二百十九實施例
第二百二十實施例
第二百二十一實施例
第二百二十二實施例
第二百二十三實施例
第二百二十四實施例
第二百二十五實施例
第二百二十六實施例
第二百二十七實施例
第二百二十八實施例
第二百二十九實施例
第二百三十實施例
第二百三十一實施例
第二百三十二實施例
第二百三十三實施例
第二百三十四實施例
第二百三十五實施例
第二百三十六實施例
第二百三十七實施例
第二百三十八實施例
第二百三十九實施例
第二百四十實施例
第二百四十一實施例
第二百四十二實施例
第二百四十三實施例
第二百四十四實施例
第二百四十五實施例
第二百四十六實施例
第二百四十七實施例
第二百四十八實施例
第二百四十九實施例
第二百五十實施例
第二百五十一實施例
第二百五十二實施例
第二百五十三實施例
第二百五十四實施例
第二百五十五實施例
第二百五十六實施例
第二百五十七實施例
第二百五十八實施例
第二百五十九實施例
第二百六十實施例
第二百六十一實施例
第二百六十二實施例
第二百六十三實施例
第二百六十四實施例
第二百六十五實施例
第二百六十六實施例
第二百六十七實施例
第二百六十八實施例
第二百六十九實施例
第二百七十實施例
第二百七十一實施例
第二百七十二實施例
第二百七十三實施例
第二百七十四實施例
第二百七十五實施例
第二百七十六實施例
第二百七十七實施例
第二百七十八實施例
第二百七十九實施例
第二百八十實施例
第二百八十一實施例
第二百八十二實施例
第二百八十三實施例
第二百八十四實施例
第二百八十五實施例
第二百八十六實施例
第二百八十七實施例
第二百八十八實施例
第二百八十九實施例
第二百九十實施例
第二百九十一實施例
第二百九十二實施例
第二百九十三實施例
第二百九十四實施例
第二百九十五實施例
第二百九十六實施例
第二百九十七實施例
第二百九十八實施例
第二百九十九實施例
第三百實施例
第三百一實施例
第三百二實施例
第三百三實施例
第三百四實施例
第三百五實施例
第三百六實施例
第三百七實施例
第三百八實施例
第三百九實施例
第三百十實施例
第三百十一實施例
第三百十二實施例
第三百十三實施例
第三百十四實施例
第三百十五實施例
第三百十六實施例
第三百十七實施例
第三百十八實施例
第三百十九實施例
第三百二十實施例
第三百二十一實施例
第三百二十二實施例
第三百二十三實施例
第三百二十四實施例
第三百二十五實施例
第三百二十六實施例
第三百二十七實施例
第三百二十八實施例
第三百二十九實施例
第三百三十實施例
第三百三十一實施例
第三百三十二實施例
第三百三十三實施例
第三百三十四實施例
第三百三十五實施例
第三百三十六實施例
第三百三十七實施例
第三百三十八實施例
第三百三十九實施例
第三百四十實施例
第三百四十一實施例
第三百四十二實施例
第三百四十三實施例
第三百四十四實施例
第三百四十五實施例
第三百四十六實施例
第三百四十七實施例
第三百四十八實施例
第三百四十九實施例
第三百五十實施例
第三百五十一實施例
第三百五十二實施例
第三百五十三實施例
第三百五十四實施例
第三百五十五實施例
第三百五十六實施例
第三百五十七實施例
第三百五十八實施例
第三百五十九實施例
第三百六十實施例
第三百六十一實施例
第三百六十二實施例
第三百六十三實施例
第三百六十四實施例
第三百六十五實施例
第三百六十六實施例
第三百六十七實施例
第三百六十八實施例
第三百六十九實施例
第三百七十實施例
第三百七十一實施例
第三百七十二實施例
第三百七十三實施例
第三百七十四實施例
第三百七十五實施例
第三百七十六實施例
第三百七十七實施例
第三百七十八實施例
第三百七十九實施例
第三百八十實施例
第三百八十一實施例
第三百八十二實施例
第三百八十三實施例
第三百八十四實施例
第三百八十五實施例
第三百八十六實施例
第三百八十七實施例
第三百八十八實施例
第三百八十九實施例
第三百九十實施例
第三百九十一實施例
第三百九十二實施例
第三百九十三實施例
第三百九十四實施例
第三百九十五實施例
第三百九十六實施例
第三百九十七實施例
第三百九十八實施例
第三百九十九實施例
第四百實施例
第四百一實施例
第四百二實施例
第四百三實施例
第四百四實施例
第四百五實施例
第四百六實施例
第四百七實施例
第四百八實施例
第四百九實施例
第四百十實施例
第四百十一實施例
第四百十二實施例
第四百十三實施例
第四百十四實施例
第四百十五實施例
第四百十六實施例
第四百十七實施例
第四百十八實施例
第四百十九實施例
第四百二十實施例
第四百二十一實施例
第四百二十二實施例
第四百二十三實施例
第四百二十四實施例
第四百二十五實施例
第四百二十六實施例
第四百二十七實施例
第四百二十八實施例
第四百二十九實施例
第四百三十實施例
第四百三十一實施例
第四百三十二實施例
第四百三十三實施例
第四百三十四實施例
第四百三十五實施例
第四百三十六實施例
第四百三十七實施例
第四百三十八實施例
第四百三十九實施例
第四百四十實施例
第四百四十一實施例
第四百四十二實施例
第四百四十三實施例
第四百四十四實施例
第四百四十五實施例
第四百四十六實施例
第四百四十七實施例
第四百四十八實施例
第四百四十九實施例
第四百五十實施例
第四百五十一實施例
第四百五十二實施例
第四百五十三實施例
第四百五十四實施例
第四百五十五實施例
第四百五十六實施例
第四百五十七實施例
第四百五十八實施例
第四百五十九實施例
第四百六十實施例
第四百六十一實施例
第四百六十二實施例
第四百六十三實施例
第四百六十四實施例
第四百六十五實施例
第四百六十六實施例
第四百六十七實施例
第四百六十八實施例
第四百六十九實施例
第四百七十實施例
第四百七十一實施例
第四百七十二實施例
第四百七十三實施例
第四百七十四實施例
第四百七十五實施例
第四百七十六實施例
第四百七十七實施例
第四百七十八實施例
第四百七十九實施例
第四百八十實施例
第四百八十一實施例
第四百八十二實施例
第四百八十三實施例
第四百八十四實施例
第四百八十五實施例
第四百八十六實施例
第四百八十七實施例
第四百八十八實施例
第四百八十九實施例
第四百九十實施例
第四百九十一實施例
第四百九十二實施例
第四百九十三實施例
第四百九十四實施例
第四百九十五實施例
第四百九十六實施例
第四百九十七實施例
第四百九十八實施例
第四百九十九實施例
第五百實施例
第五百一實施例
第五百二實施例
第五百三實施例
第五百四實施例
第五百五實施例
第五百六實施例
第五百七實施例
第五百八實施例
第五百九實施例
第五百十實施例
第五百十一實施例
第五百十二實施例
第五百十三實施例
第五百十四實施例
第五百十五實施例
第五百十六實施例
第五百十七實施例
第五百十八實施例
第五百十九實施例
第五百二十實施例
第五百二十一實施例
第五百二十二實施例
第五百二十三實施例
第五百二十四實施例
第五百二十五實施例
第五百二十六實施例
第五百二十七實施例
第五百二十八實施例
第五百二十九實施例
第五百三十實施例
第五百三十一實施例
第五百三十二實施例
第五百三十三實施例
第五百三十四實施例
第五百三十五實施例
第五百三十六實施例
第五百三十七實施例
第五百三十八實施例
第五百三十九實施例
第五百四十實施例
第五百四十一實施例
第五百四十二實施例
第五百四十三實施例
第五百四十四實施例
第五百四十五實施例
第五百四十六實施例
第五百四十七實施例
第五百四十八實施例
第五百四十九實施例
第五百五十實施例
第五百五十一實施例
第五百五十二實施例
第五百五十三實施例
第五百五十四實施例
第五百五十五實施例
第五百五十六實施例
第五百五十七實施例
第五百五十八實施例
第五百五十九實施例
第五百六十實施例
第五百六十一實施例
第五百六十二實施例
第五百六十三實施例
第五百六十四實施例
第五百六十五實施例
第五百六十六實施例
第五百六十七實施例
第五百六十八實施例
第五百六十九實施例
第五百七十實施例
第五百七十一實施例
第五百七十二實施例
第五百七十三實施例
第五百七十四實施例
第五百七十五實施例
第五百七十六實施例
第五百七十七實施例
第五百七十八實施例
第五百七十九實施例
第五百八十實施例
第五百八十一實施例
第五百八十二實施例
第五百八十三實施例
第五百八十四實施例
第五百八十五實施例
第五百八十六實施例
第五百八十七實施例
第五百八十八實施例
第五百八十九實施例
第五百九十實施例
第五百九十一實施例
第五百九十二實施例
第五百九十三實施例
第五百九十四實施例
第五百九十五實施例
第五百九十六實施例
第五百九十七實施例
第五百九十八實施例
第五百九十九實施例
第六百實施例
第六百一實施例
第六百二實施例
第六百三實施例
第六百四實施例
第六百五實施例
第六百六實施例
第六百七實施例
第六百八實施例
第六百九實施例
第六百十實施例
第六百十一實施例
第六百十二實施例
第六百十三實施例
第六百十四實施例
第六百十五實施例
第六百十六實施例
第六百十七實施例
第六百十八實施例
第六百十九實施例
第六百二十實施例
第六百二十一實施例
第六百二十二實施例
第六百二十三實施例
第六百二十四實施例
第六百二十五實施例
第六百二十六實施例
第六百二十七實施例
第六百二十八實施例
第六百二十九實施例
第六百三十實施例
第六百三十一實施例
第六百三十二實施例
第六百三十三實施例
第六百三十四實施例
第六百三十五實施例
第六百三十六實施例
第六百三十七實施例
第六百三十八實施例
第六百三十九實施例
第六百四十實施例
第六百四十一實施例
第六百四十二實施例
第六百四十三實施例
第六百四十四實施例
第六百四十五實施例
第六百四十六實施例
第六百四十七實施例
第六百四十八實施例
第六百四十九實施例
第六百五十實施例
第六百五十一實施例
第六百五十二實施例
第六百五十三實施例
第六百五十四實施例
第六百五十五實施例
第六百五十六實施例
第六百五十七實施例
第六百五十八實施例
第六百五十九實施例
第六百六十實施例
第六百六十一實施例
第六百六十二實施例
第六百六十三實施例
第六百六十四實施例
第六百六十五實施例
第六百六十六實施例
第六百六十七實施例
第六百六十八實施例
第六百六十九實施例
第六百七十實施例
第六百七十一實施例
第六百七十二實施例
第六百七十三實施例
第六百七十四實施例
第六百七十五實施例
第六百七十六實施例
第六百七十七實施例
第六百七十八實施例
第六百七十九實施例
第六百八十實施例
第六百八十一實施例
第六百八十二實施例
第六百八十三實施例
第六百八十四實施例
第六百八十五實施例
第六百八十六實施例
第六百八十七實施例
第六百八十八實施例
第六百八十九實施例
第六百九十實施例
第六百九十一實施例
第六百九十二實施例
第六百九十三實施例
第六百九十四實施例
第六百九十五實施例
第六百九十六實施例
第六百九十七實施例
第六百九十八實施例
第六百九十九實施例
第七百實施例
第七百一實施例
第七百二實施例
第七百三實施例
第七百四實施例
第七百五實施例
第七百六實施例
第七百七實施例
第七百八實施例
第七百九實施例
第七百十實施例
第七百十一實施例
第七百十二實施例
第七百十三實施例
第七百十四實施例
第七百十五實施例
第七百十六實施例
第七百十七實施例
第七百十八實施例
第七百十九實施例
第七百二十實施例
第七百二十一實施例
第七百二十二實施例
第七百二十三實施例
第七百二十四實施例
第七百二十五實施例
第七百二十六實施例
第七百二十七實施例
第七百二十八實施例
第七百二十九實施例
第七百三十實施例
第七百三十一實施例
第七百三十二實施例
第七百三十三實施例
第七百三十四實施例
第七百三十五實施例
第七百三十六實施例
第七百三十七實施例
第七百三十八實施例
第七百三十九實施例
第七百四十實施例
第七百四十一實施例
第七百四十二實施例
第七百四十三實施例
第七百四十四實施例
第七百四十五實施例
第七百四十六實施例
第七百四十七實施例
第七百四十八實施例
第七百四十九實施例
第七百五十實施例
第七百五十一實施例
第七百五十二實施例
第七百五十三實施例
第七百五十四實施例
第七百五十五實施例
第七百五十六實施例
第七百五十七實施例
第七百五十八實施例
第七百五十九實施例
第七百六十實施例
第七百六十一實施例
第七百六十二實施例
第七百六十三實施例
第七百六十四實施例
第七百六十五實施例
第七百六十六實施例
第七百六十七實施例
第七百六十八實施例
第七百六十九實施例
第七百七十實施例
第七百七十一實施例
第七百七十二實施例
第七百七十三實施例
第七百七十四實施例
第七百七十五實施例
第七百七十六實施例
第七百七十七實施例
第七百七十八實施例
第七百七十九實施例
第七百八十實施例
第七百八十一實施例
第七百八十二實施例
第七百八十三實施例
第七百八十四實施例
第七百八十五實施例
第七百八十六實施例
第七百八十七實施例
第七百八十八實施例
第七百八十九實施例
第七百九十實施例
第七百九十一實施例
第七百九十二實施例
第七百九十三實施例
第七百九十四實施例
第七百九十五實施例
第七百九十六實施例
第七百九十七實施例
第七百九十八實施例
第七百九十九實施例
第八百實施例
第八百一實施例
第八百二實施例
第八百三實施例
第八百四實施例
第八百五實施例
第八百六實施例
第八百七實施例
第八百八實施例
第八百九實施例
第八百十實施例
第八百十一實施例
第八百十二實施例
第八百十三實施例
第八百十四實施例
第八百十五實施例
第八百十六實施例
第八百十七實施例
第八百十八實施例
第八百十九實施例
第八百二十實施例
第八百二十一實施例
第八百二十二實施例
第八百二十三實施例
第八百二十四實施例
第八百二十五實施例
第八百二十六實施例
第八百二十七實施例
第八百二十八實施例
第八百二十九實施例
第八百三十實施例
第八百三十一實施例
第八百三十二實施例
第八百三十三實施例
第八百三十四實施例
第八百三十五實施例
第八百三十六實施例
第八百三十七實施例
第八百三十八實施例
第八百三十九實施例
第八百四十實施例
第八百四十一實施例
第八百四十二實施例
第八百四十三實施例
第八百四十四實施例
第八百四十五實施例
第八百四十六實施例
第八百四十七實施例
第八百四十八實施例
第八百四十九實施例
第八百五十實施例
第八百五十一實施例
第八百五十二實施例
第八百五十三實施例
第八百五十四實施例
第八百五十五實施例
第八百五十六實施例
第八百五十七實施例
第八百五十八實施例
第八百五十九實施例
第八百六十實施例
第八百六十一實施例
第八百六十二實施例
第八百六十三實施例
第八百六十四實施例
第八百六十五實施例
第八百六十六實施例
第八百六十七實施例
第八百六十八實施例
第八百六十九實施例
第八百七十實施例
第八百七十一實施例
第八百七十二實施例
第八百七十三實施例
第八百七十四實施例
第八百七十五實施例
第八百七十六實施例
第八百七十七實施例
第八百七十八實施例
第八百七十九實施例
第八百八十實施例
第八百八十一實施例
第八百八十二實施例
第八百八十三實施例
第八百八十四實施例
第八百八十五實施例
第八百八十六實施例
第八百八十七實施例
第八百八十八實施例
第八百八十九實施例
第八百九十實施例
第八百九十一實施例
第八百九十二實施例
第八百九十三實施例
第八百九十四實施例
第八百九十五實施例
第八百九十六實施例
第八百九十七實施例
第八百九十八實施例
第八百九十九實施例
第九百實施例
第九百一實施例
第九百二實施例
第九百三實施例
第九百四實施例
第九百五實施例
第九百六實施例
第九百七實施例
第九百八實施例
第九百九實施例
第九百十實施例
第九百十一實施例
第九百十二實施例
第九百十三實施例
第九百十四實施例
第九百十五實施例
第九百十六實施例
第九百十七實施例
第九百十八實施例
第九百十九實施例
第九百二十實施例
第九百二十一實施例
第九百二十二實施例
第九百二十三實施例
第九百二十四實施例
第九百二十五實施例
第九百二十六實施例
第九百二十七實施例
第九百二十八實施例
第九百二十九實施例
第九百三十實施例
第九百三十一實施例
第九百三十二實施例
第九百三十三實施例
第九百三十四實施例
第九百三十五實施例
第九百三十六實施例
第九百三十七實施例
第九百三十八實施例
第九百三十九實施例
第九百四十實施例
第九百四十一實施例
第九百四十二實施例
第九百四十三實施例
第九百四十四實施例
第九百四十五實施例
第九百四十六實施例
第九百四十七實施例
第九百四十八實施例
第九百四十九實施例
第九百五十實施例
第九百五十一實施例
第九百五十二實施例
第九百五十三實施例
第九百五十四實施例
第九百五十五實施例
第九百五十六實施例
第九百五十七實施例
第九百五十八實施例
第九百五十九實施例
第九百六十實施例
第九百六十一實施例
第九百六十二實施例
第九百六十三實施例
第九百六十四實施例
第九百六十五實施例
第九百六十六實施例
第九百六十七實施例
第九百六十八實施例
第九百六十九實施例
第九百七十實施例
第九百七十一實施例
第九百七十二實施例
第九百七十三實施例
第九百七十四實施例
第九百七十五實施例
第九百七十六實施例
第九百七十七實施例
第九百七十八實施例
第九百七十九實施例
第九百八十實施例
第九百八十一實施例
第九百八十二實施例
第九百八十三實施例
第九百八十四實施例
第九百八十五實施例
第九百八十六實施例
第九百八十七實施例
第九百八十八實施例
第九百八十九實施例
第九百九十實施例
第九百九十一實施例
第九百九十二實施例
第九百九十三實施例
第九百九十四實施例
第九百九十五實施例
第九百九十六實施例
第九百九十七實施例
第九百九十八實施例
第九百九十九實施例
第一千實施例
第一千一實施例
第一千二實施例
第一千三實施例
第一千四實施例
第一千五實施例
第一千六實施例
第一千七實施例
第一千八實施例
第一千九實施例
第一千十實施例
第一千十一實施例
第一千十二實施例
第一千十三實施例
第一千十四實施例
第一千十五實施例
第一千十六實施例
第一千十七實施例
第一千十八實施例
第一千十九實施例
第一千二十實施例
第一千二十一實施例
第一千二十二實施例
第一千二十三實施例
第一千二十四實施例
第一千二十五實施例
第一千二十六實施例
第一千二十七實施例
第一千二十八實施例
第一千二十九實施例
第一千三十實施例
第一千三十一實施例
第一千三十二實施例
第一千三十三實施例
第一千三十四實施例
第一千三十五實施例
第一千三十六實施例
第一千三十七實施例
第一千三十八實施例
第一千三十九實施例
第一千四十實施例
第一千四十一實施例
第一千四十二實施例
第一千四十三實施例
第一千四十四實施例
第一千四十五實施例
第一千四十六實施例
第一千四十七實施例
第一千四十八實施例
第一千四十九實施例
第一千五十實施例
第一千五十一實施例
第一千五十二實施例
第一千五十三實施例
第一千五十四實施例
第一千五十五實施例
第一千五十六實施例
第一千五十七實施例
第一千五十八實施例
第一千五十九實施例
第一千六十實施例
第一千六十一實施例
第一千六十二實施例
第一千六十三實施例
第一千六十四實施例
第一千六十五實施例
第一千六十六實施例
第一千六十七實施例
第一千六十八實施例
第一千六十九實施例
第一千七十實施例
第一千七十一實施例
第一千七十二實施例
第一千七十三實施例
第一千七十四實施例
第一千七十五實施例
第一千七十六實施例
第一千七十七實施例
第一千七十八實施例
第一千七十九實施例
第一千八十實施例
第一千八十一實施例
第一千八十二實施例
第一千八十三實施例
第一千八十四實施例
第一千八十五實施例
第一千八十六實施例
第一千八十七實施例
第一千八十八實施例
第一千八十九實施例
第一千九十實施例
第一千九十一實施例
第一千九十二實施例
第一千九十三實施例
第一千九十四實施例
第一千九十五實施例
第一千九十六實施例
第一千九十七實施例
第一千九十八實施例
第一千九十九實施例
第一千一百實施例
第一千一百一實施例
第一千一百二實施例
第一千一百三實施例
第一千一百四實施例
第一千一百五實施例
第一千一百六實施例
第一千一百七實施例
第一千一百八實施例
第一千一百九實施例
第一千一百十實施例
第一千一百十一實施例
第一千一百十二實施例
第一千一百十三實施例
第一千一百十四實施例
第一千一百十五實施例
第一千一百十六實施例
第一千一百十七實施例
第一千一百十八實施例
第一千一百十九實施例
第一千一百二十實施例
第一千一百二十一實施例
第一千一百二十二實施例
第一千一百二十三實施例
第一千一百二十四實施例
第一千一百二十五實施例
第一千一百二十六實施例
第一千一百二十七實施例
第一千一百二十八實施例
第一千一百二十九實施例
第一千一百三十實施例
第一千一百三十一實施例
第一千一百三十二實施例
第一千一百三十三實施例
第一千一百三十四實施例
第一千一百三十五實施例
第一千一百三十六實施例
第一千一百三十七實施例
第一千一百三十八實施例
第一千一百三十九實施例
第一千一百四十實施例
第一千一百四十一實施例
第一千一百四十二實施例
第一千一百四十三實施例
第一千一百四十四實施例
第一千一百四十五實施例
第一千一百四十六實施例
第一千一百四十七實施例
第一千一百四十八實施例
第一千一百四十九實施例
第一千一百五十實施例
第一千一百五十一實施例
第一千一百五十二實施例
第一千一百五十三實施例
第一千一百五十四實施例
第一千一百五十五實施例
第一千一百五十六實施例
第一千一百五十七實施例
第一千一百五十八實施例
第一千一百五十九實施例
第一千一百六十實施例
第一千一百六十一實施例
第一千一百六十二實施例
第一千一百六十三實施例
第一千一百六十四實施例
第一千一百六十五實施例
第一千一百六十六實施例
第一千一百六十七實施例
第一千一百六十八實施例
第一千一百六十九實施例
第一千一百七十實施例
第一千一百七十一實施例
第一千一百七十二實施例
第一千一百七十三實施例
第一千一百七十四實施例
第一千一百七十五實施例
第一千一百七十六實施例
第一千一百七十七實施例
第一千一百七十八實施例
第一千一百七十九實施例
第一千一百八十實施例
第一千一百八十一實施例
第一千一百八十二實施例
第一千一百八十三實施例
第一千一百八十四實施例
第一千一百八十五實施例
第一千一百八十六實施例
第一千一百八十七實施例
第一千一百八十八實施例
第一千一百八十九實施例
第一千一百九十實施例
第一千一百九十一實施例
第一千一百九十二實施例
第一千一百九十三實施例
第一千一百九十四實施例
第一千一百九十五實施例
第一千一百九十六實施例
第一千一百九十七實施例
第一千一百九十八實施例
第一千一百九十九實施例
第一千二百實施例
第一千二百一實施例
第一千二百二實施例
第一千二百三實施例
第一千二百四實施例
第一千二百五實施例
第一千二百六實施例
第一千二百七實施例
第一千二百八實施例
第一千二百九實施例
第一千二百十實施例
第一千二百十一實施例
第一千二百十二實施例
第一千二百十三實施例
第一千二百十四實施例
第一千二百十五實施例
第一千二百十六實施例
第一千二百十七實施例
第一千二百十八實施例
第一千二百十九實施例
第一千二百二十實施例
第一千二百二十一實施例
第一千二百二十二實施例
第一千二百二十三實施例
第一千二百二十四實施例
第一千二百二十五實施例
第一千二百二十六實施例
第一千二百二十七實施例
第一千二百二十八實施例
第一千二百二十九實施例
第一千二百三十實施例
第一千二百三十一實施例
第一千二百三十二實施例
第一千二百三十三實施例
第一千二百三十四實施例
第一千二百三十五實施例
第一千二百三十六實施例
第一千二百三十七實施例
第一千二百三十八實施例
第一千二百三十九實施例
第一千二百四十實施例
第一千二百四十一實施例
第一千二百四十二實施例
第一千二百四十三實施例
第一千二百四十四實施例
第一千二百四十五實施例
第一千二百四十六實施例
第一千二百四十七實施例
第一千二百四十八實施例
第一千二百四十九實施例
第一千二百五十實施例
第一千二百五十一實施例
第一千二百五十二實施例
第一千二百五十三實施例
第一千二百五十四實施例
第一千二百五十五實施例
第一千二百五十六實施例
第一千二百五十七實施例
第一千二百五十八實施例
第一千二百五十九實施例
第一千二百六十實施例
第一千二百六十一實施例
第一千二百六十二實施例
第一千二百六十三實施例
第一千二百六十四實施例
第一千二百六十五實施例
第一千二百六十六實施例
第一千二百六十七實施例
第一千二百六十八實施例
第一千二百六十九實施例
第一千二百七十實施例
第一千二百七十一實施例
第一千二百七十二實施例
第一千二百七十三實施例
第一千二百七十四實施例
第一千二百七十五實施例
第一千二百七十六實施例
第一千二百七十七實施例
第一千二百七十八實施例
第一千二百七十九實施例
第一千二百八十實施例
第一千二百八十一實施例
第一千二百八十二實施例
第一千二百八十三實施例
第一千二百八十四實施例
第一千二百八十五實施例
第一千二百八十六實施例
第一千二百八十七實施例
第一千二百八十八實施例
第一千二百八十九實施例
第一千二百九十實施例
第一千二百九十一實施例
第一千二百九十二實施例
第一千二百九十三實施例
第一千二百九十四實施例
第一千二百九十五實施例
第一千二百九十六實施例
第一千二百九十七實施例
第一千二百九十八實施例
第一千二百九十九實施例
第一千三百實施例
第一千三百一實施例
第一千三百二實施例
第一千三百三實施例
第一千三百四實施例
第一千三百五實施例
第一千三百六實施例
第一千三百七實施例
第一千三百八實施例
第一千三百九實施例
第一千三百十實施例
第一千三百十一實施例
第一千三百十二實施例
第一千三百十三實施例
第一千三百十四實施例
第一千三百十五實施例
第一千三百十六實施例
第一千三百十七實施例
第一千三百十八實施例
第一千三百十九實施例
第一千三百二十實施例
第一千三百二十一實施例
第一千三百二十二實施例
第一千三百二十三實施例
第一千三百二十四實施例
第一千三百二十五實施例
第一千三百二十六實施例
第一千三百二十七實施例
第一千三百二十八實施例
第一千三百二十九實施例
第一千三百三十實施例
第一千三百三十一實施例
第一千三百三十二實施例
第一千三百三十三實施例
第一千三百三十四實施例
第一千三百三十五實施例
第一千三百三十六實施例
第一千三百三十七實施例
第一千三百三十八實施例
第一千三百三十九實施例
第一千三百四十實施例
第一千三百四十一實施例
第一千三百四十二實施例
第一千三百四十三實施例
第一千三百四十四實施例
第一千三百四十五實施例
第一千三百四十六實施例
第一千三百四十七實施例
第一千三百四十八實施例
第一千三百四十九實施例
第一千三百五十實施例
第一千三百五十一實施例
第一千三百五十二實施例
第一千三百五十三實施例
第一千三百五十四實施例
第一千三百五十五實施例
第一千三百五十六實施例
第一千三百五十七實施例
第一千三百五十八實施例
第一千三百五十九實施例
第一千三百六十實施例
第一千三百六十一實施例
第一千三百六十二實施例
第一千三百六十三實施例
第一千三百六十四實施例
第一千三百六十五實施例
第一千三百六十六實施例
第一千三百六十七實施例
第一千三百六十八實施例
第一千三百六十九實施例
第一千三百七十實施例
第一千三百七十一實施例
第一千三百七十二實施例
第一千三百七十三實施例
第一千三百七十四實施例
第一千三百七十五實施例
第一千三百七十六實施例
第一千三百七十七實施例
第一千三百七十八實施例
第一千三百七十九實施例
第一千三百八十實施例
第一千三百八十一實施例
第一千三百八十二實施例
第一千三百八十三實施例
第一千三百八十四實施例
第一千三百八十五實施例
第一千三百八十六實施例
第一千三百八十七實施例
第一千三百八十八實施例
第一千三百八十九實施例
第一千三百九十實施例
第一千三百九十一實施例
第一千三百九十二實施例
第一千三百九十三實施例
第一千三百九十四實施例
第一千三百九十五實施例
第一千三百九十六實施例
第一千三百九十七實施例
第一千三百九十八實施例
第一千三百九十九實施例
第一千四百實施例
第一千四百一實施例
第一千四百二實施例
第一千四百三實施例
第一千四百四實施例
第一千四百五實施例
第一千四百六實施例
第一千四百七實施例
第一千四百八實施例
第一千四百九實施例
第一千四百十實施例
第一千四百十一實施例
第一千四百十二實施例
第一千四百十三實施例
第一千四百十四實施例
第一千四百十五實施例
第一千四百十六實施例
第一千四百十七實施例
第一千四百十八實施例
第一千四百十九實施例
第一千四百二十實施例
第一千四百二十一實施例
第一千四百二十二實施例
第一千四百二十三實施例
第一千四百二十四實施例
第一千四百二十五實施例
第一千四百二十六實施例
第一千四百二十七實施例
第一千四百二十八實施例
第一千四百二十九實施例
第一千四百三十實施例
第一千四百三十一實施例
第一千四百三十二實施例
第一千四百三十三實施例
第一千四百三十四實施例
第一千四百三十五實施例
第一千四百三十六實施例
第一千四百三十七實施例
第一千四百三十八實施例
第一千四百三十九實施例
第一千四百四十實施例
第一千四百四十一實施例
第一千四百四十二實施例
第一千四百四十三實施例
第一千四百四十四實施例
第一千四百四十五實施例
第一千四百四十六實施例
第一千四百四十七實施例
第一千四百四十八實施例
第一千四百四十九實施例
第一千四百五十實施例
第一千四百五十一實施例
第一千四百五十二實施例
第一千四百五十三實施例
第一千四百五十四實施例
第一千四百五十五實施例
第一千四百五十六實施例
第一千四百五十七實施例
第一千四百五十八實施例
第一千四百五十九實施例
第一千四百六十實施例
第一千四百六十一實施例
第一千四百六十二實施例
第一千四百六十三實施例
第一千四百六十四實施例
第一千四百六十五實施例
第一千四百六十六實施例
第一千四百六十七實施例
第一千四百六十八實施例
第一千四百六十九實施例
第一千四百七十實施例
第一千四百七十一實施例
第一千四百七十二實施例
第一千四百七十三實施例
第一千四百七十四實施例
第一千四百七十五實施例
第一千四百七十六實施例
第一千四百七十七實施例
第一千四百七十八實施例
第一千四百七十九實施例
第一千四百八十實施例
第一千四百八十一實施例
第一千四百八十二實施例
第一千四百八十三實施例
第一千四百八十四實施例
第一千四百八十五實施例
第一千四百八十六實施例
第一千四百八十七實施例
第一千四百八十八實施例
第一千四百八十九實施例
第一千四百九十實施例
第一千四百九十一實施例
第一千四百九十二實施例
第一千四百九十三實施例
第一千四百九十四實施例
第一千四百九十五實施例
第一千四百九十六實施例
第一千四百九十七實施例
第一千四百九十八實施例
第一千四百九十九實施例
第一千五百實施例
第一千五百一實施例
第一千五百二實施例
第一千五百三實施例
第一千五百四實施例
第一千五百五實施例
第一千五百六實施例
第一千五百七實施例
第一千五百八實施例
第一千五百九實施例
第一千五百十實施例
第一千五百十一實施例
第一千五百十二實施例
第一千五百十三實施例
第一千五百十四實施例
第一千五百十五實施例
第一千五百十六實施例
第一千五百十七實施例
第一千五百十八實施例
第一千五百十九實施例
第一千五百二十實施例
第一千五百二十一實施例
第一千五百二十二實施例
第一千五百二十三實施例
第一千五百二十四實施例
第一千五百二十五實施例
第一千五百二十六實施例
第一千五百二十七實施例
第一千五百二十八實施例
第一千五百二十九實施例
第一千五百三十實施例
第一千五百三十一實施例
第一千五百三十二實施例
第一千五百三十三實施例
第一千五百三十四實施例
第一千五百三十五實施例
第一千五百三十六實施例
第一千五百三十七實施例
第一千五百三十八實施例
第一千五百三十九實施例
第一千五百四十實施例
第一千五百四十一實施例
第一千五百四十二實施例
第一千五百四十三實施例
第一千五百四十四實施例
第一千五百四十五實施例
第一千五百四十六實施例
第一千五百四十七實施例
第一千五百四十八實施例
第一千五百四十九實施例
第一千五百五十實施例
第一千五百五十一實施例
第一千五百五十二實施例
第一千五百五十三實施例
第一千五百五十四實施例
第一千五百五十五實施例
第一千五百五十六實施例
第一千五百五十七實施例
第一千五百五十八實施例
第一千五百五十九實施例
第一千五百六十實施例
第一千五百六十一實施例
第一千五百六十二實施例
第一千五百六十三實施例
第一千五百六十四實施例
第一千五百六十五實施例
第一千五百六十六實施例
第一千五百六十七實施例
第一千五百六十八實施例
第一千五百六十九實施例
第一千五百七十實施例
第一千五百七十一實施例
第一千五百七十二實施例
第一千五百七十三實施例
第一千五百七十四實施例
第一千五百七十五實施例
第一千五百七十六實施例
第一千五百七十七實施例
第一千五百七十八實施例
第一千五百七十九實施例
第一千五百八十實施例
第一千五百八十一實施例
第一千五百八十二

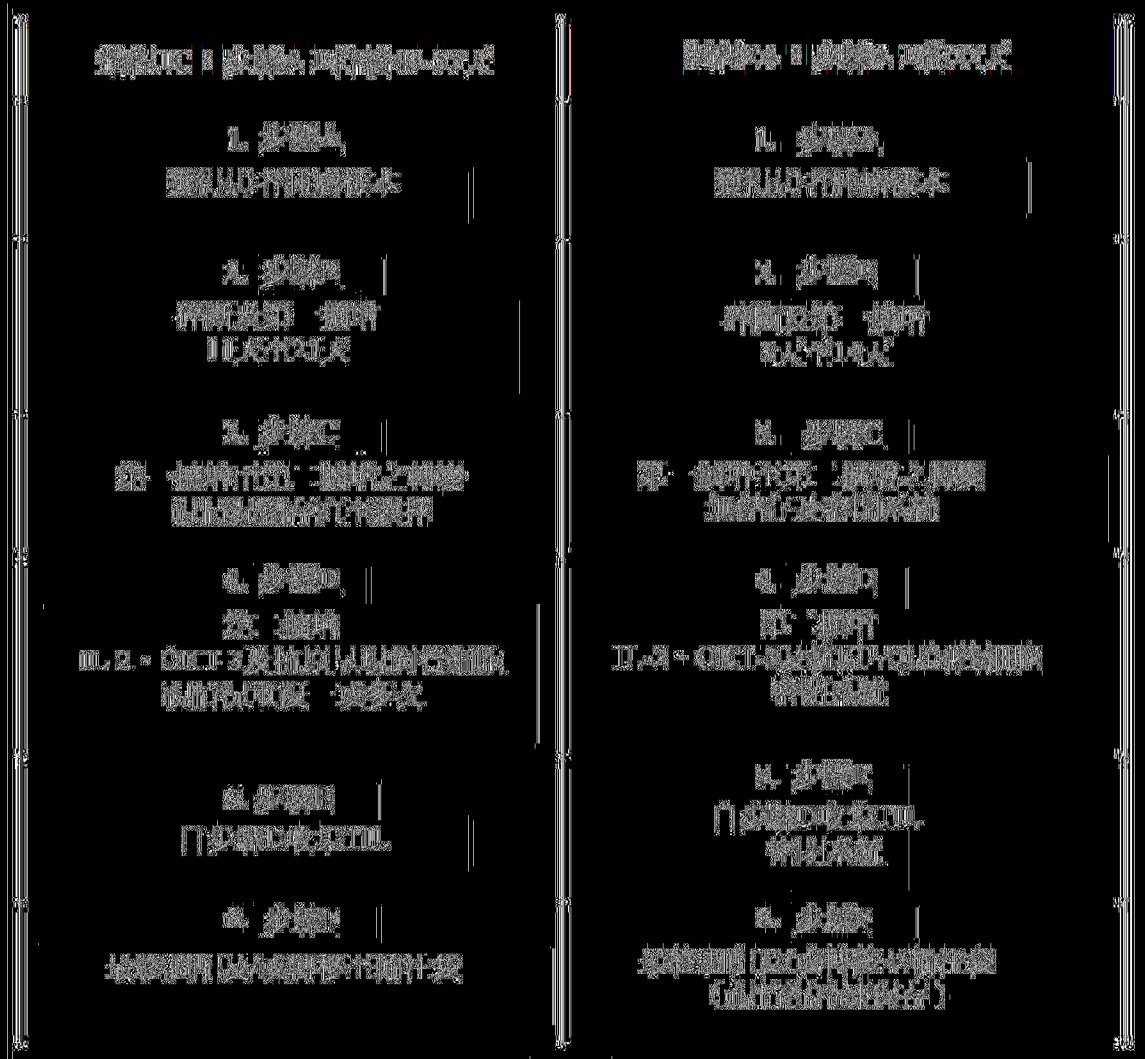


圖 5

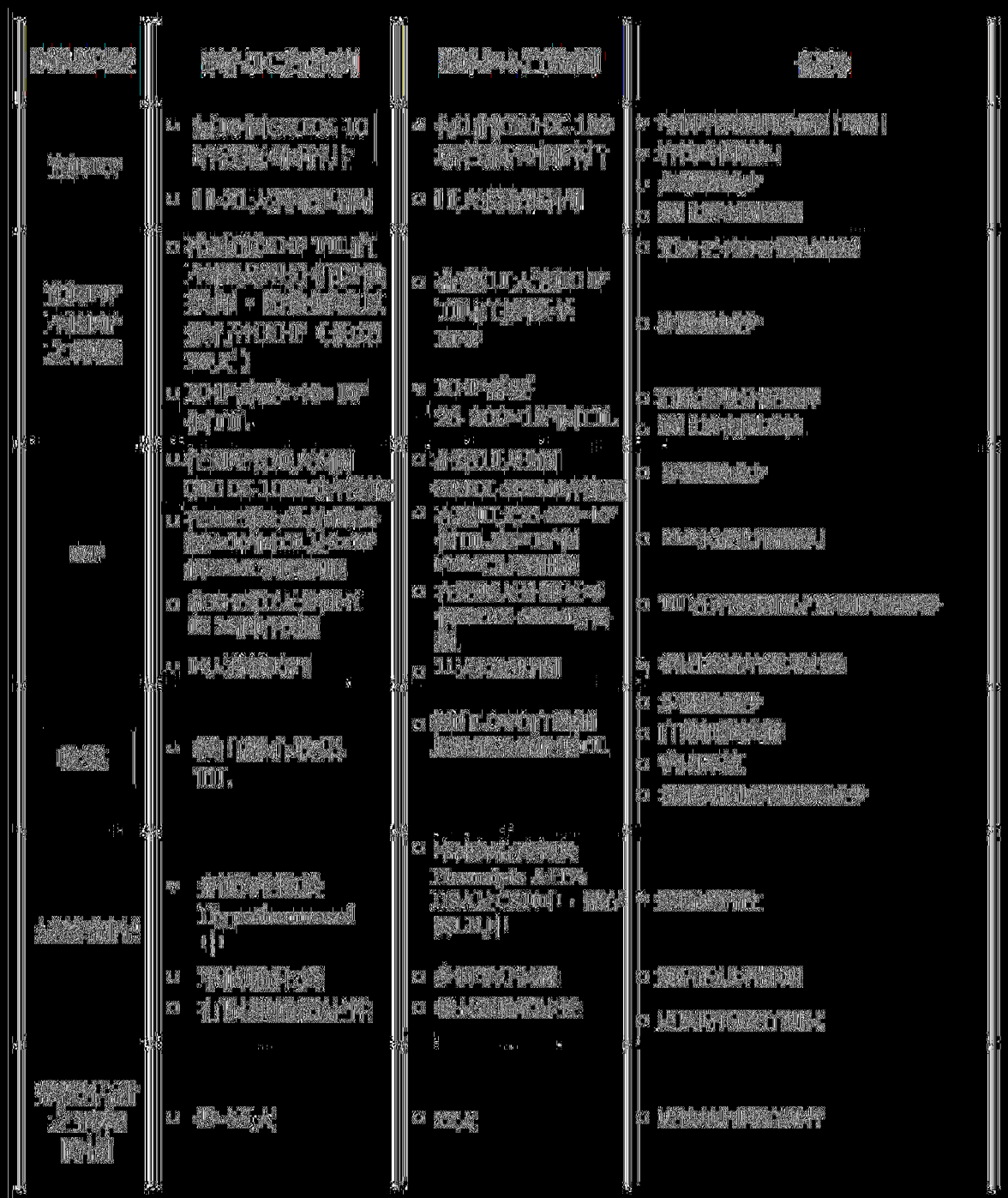
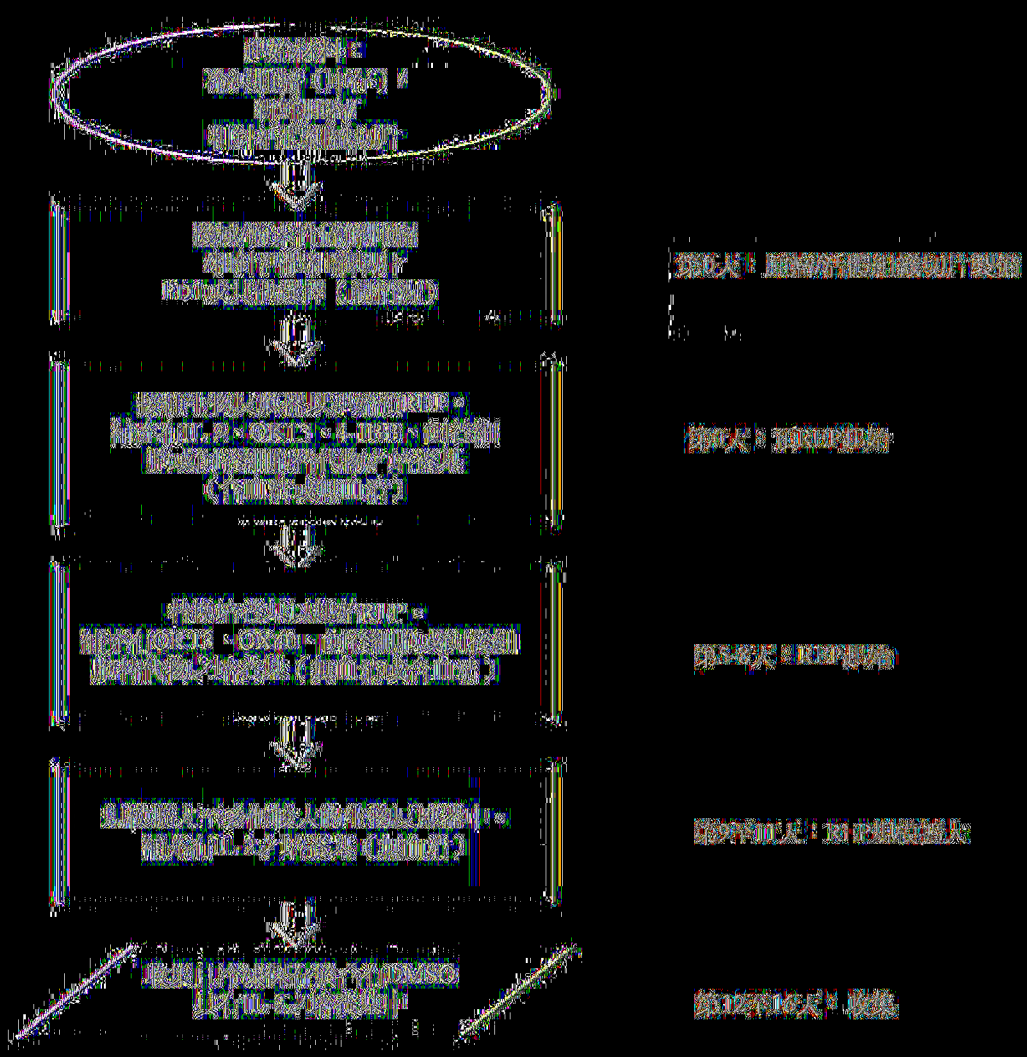


圖 6



(圖 7)

[illegible]：[illegible]

步驟A
[illegible]
（視情況[illegible]步驟C之[illegible]）

步驟B
第一擴增
（物理[illegible]至少[illegible]個容器中至少40個碎片，用包含IL-2之培養基生長約3天至14天）

步驟C
第一擴增至第二擴增之轉變
（步驟B TIL[illegible]步驟D，視情況在步驟B第11天）

步驟D
第二擴增
（TIL於密閉容器中生長在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中）

步驟E
[illegible]步驟D收集TIL
（經由密閉系統收集TIL）

步驟F
最終調配及分裝[illegible]輸注袋
（視情況冷凍保存）

[illegible]：[illegible]

步驟A
[illegible]
（視情況[illegible]步驟C之[illegible]）

步驟B
初始第一擴增
（物理碎[illegible]至多[illegible]個碎片，用包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之培養基生長約[illegible]天至7天）

步驟C
初始第一擴增至快速第二擴增之轉變
（步驟B TIL在第7天[illegible]步驟D）

步驟D
快速第二擴增
（TIL生長在包含IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中；第10-11天視[illegible]大且添加額外IL-2）

步驟E
[illegible]步驟D收集TIL

步驟F
最終調配及分裝[illegible]輸注袋
（視情況冷凍保存）

圖 8A

[illegible]

步驟A
[illegible]
（血清加[illegible]）[illegible]

步驟B
[illegible]
（物理篩選[illegible]細胞[illegible]，用[illegible]IL-2、OKT-3及[illegible]
原[illegible]細胞之培養[illegible]約1天[illegible]天）

步驟C
初始第一擴增[illegible]第二擴增之轉變
（步驟B[illegible]第7天[illegible]步驟D）

步驟D
快速第二擴增
（[illegible]在[illegible]IL-2、OKT-3及2X抗原[illegible]細胞之[illegible]
其中；第10-11天[illegible]大[illegible]額外IL-2）

步驟E
[illegible]步驟D收集[illegible]

步驟F
最終調[illegible]及[illegible]輸注袋
（[illegible]冷凍保存）

|（圖 8B）|

步驟A
初始第一擴增
（物理碎斷全血細胞樣本
（視情況加入步驟A之前冷凍））
步驟B
初始第一擴增
（物理碎斷全血細胞樣本
（視情況加入步驟A之前冷凍））
步驟B
初始第一擴增
（物理碎斷全血細胞樣本
（視情況加入步驟A之前冷凍））
步驟B
初始第一擴增
（物理碎斷全血細胞樣本
（視情況加入步驟A之前冷凍））
步驟C
初始第一擴增全快速第二擴增之轉變
（步驟B TIL在第7/8天下接移至步驟D）
步驟C
初始第一擴增全快速第二擴增之轉變
（步驟B TIL在第7/8天下接移至步驟D）
步驟C
初始第一擴增全快速第二擴增之轉變
（步驟B TIL在第7/8天下接移至步驟D）
步驟D
快速第二擴增
（TIL在長在有含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中；第10-11天規模擴大且添加額外IL-2）
步驟D
快速第二擴增
（TIL在長在有含IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中；第10-11天規模擴大且添加額外IL-2）
步驟D
快速第二擴增
（TIL在長在有含IL-2、OKT-3及2X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中；第10-11天規模擴大且添加額外IL-2）
步驟E
自步驟D收集TIL
步驟E
自步驟D收集TIL
步驟E
自步驟D收集TIL
步驟F
最終調配及加成轉移至輸注袋
（視情況冷凍保存）
步驟F
最終調配及加成轉移至輸注袋
（視情況冷凍保存）
步驟F
最終調配及加成轉移至輸注袋
（視情況冷凍保存）

圖 8C

步驟A
獲得腫瘤細胞樣本
【視步驟C所取得之細胞數量，選擇適當細胞樣本可直接進行步驟D或冷凍保存】

步驟B1
細胞培養
物理與酵素結合之方法將腫瘤組織分離成單一細胞懸浮液，TIL存在於PBMC之中，培養基與步驟B2相同

步驟B2
初始第一擴增
TIL在含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之生長培養基中生長8天

步驟C
初始第一擴增至快速第二擴增之轉變
（步驟B TIL在第11天自接移至步驟D）

步驟D
快速第二擴增
（體積減小；TIL生長在含IL-2、OKT-3及50X抗原呈現飼養細胞之生長培養基中；第16天規模擴大且添加額外IL-2）

步驟E
自步驟D收集TIL

步驟F
最終調配及入或轉移至輸注袋
（視情況冷凍保存）

|（圖 8D）|

第二代測序GON 3（A）：步驟A：約14至18天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理解離至少兩個容器中至多60個碎片且在包含IL-2及自抗原呈現餵養細胞（APC）之培養物中獲得的培養上清液的培養基中生長約1天至7/8天）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第7/8天直接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL生長在包含IL-2、OKT-3及APC之生長培養基中；第10至11天規模擴大且添加額外IL-2）

步驟E

自步驟D收集TIL

步驟F

最終調配及凍或轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

|（圖 8E）|

第二代測序(GEN 2（B）：步驟A至約14至18天

步驟A

獲得患者腫瘤樣本

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

（物理碎斷至少兩個容器中至多60個碎片且用包含IL-2、OKT-3及APC之培養基生長約11天至14/18天）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

（步驟B TIL在第14/18天自接移至步驟D）

步驟D

快速第二擴增

（TIL生長在包含IL-2及自APC之培養物自獲得的培養上清液的培養基中；第10至11天期快擴大且添加額外IL-2）

步驟E

自步驟D收集TIL

步驟F

最終調配及灌或轉移至輸注袋

（視情況冷凍保存）

|（圖 8F）|

第二代測序(GEN 3)(C)：步驟A至約14至18天

步驟A

獲得患者血液樣本

(視情況可在步驟B之前冷凍)

步驟B

初始第一擴增

(物理碎斷至多個容器中至多60個碎片且在包含IL-2及T-APC之培養物中獲得的培養上清液的培養基中生長約1天至7/8天)

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

(步驟B TIL在第7/8天下接移至步驟D)

步驟D

快速第二擴增

(TIL在生長在包含IL-2及T-APC之培養物中獲得的培養上清液的培養基中；第10至11天規模擴大且添加額外IL-2)

步驟E

自步驟D收集TIL

步驟F

最終調配及/或轉移至輸注袋

(視情況冷凍保存)

|(圖 8G)|

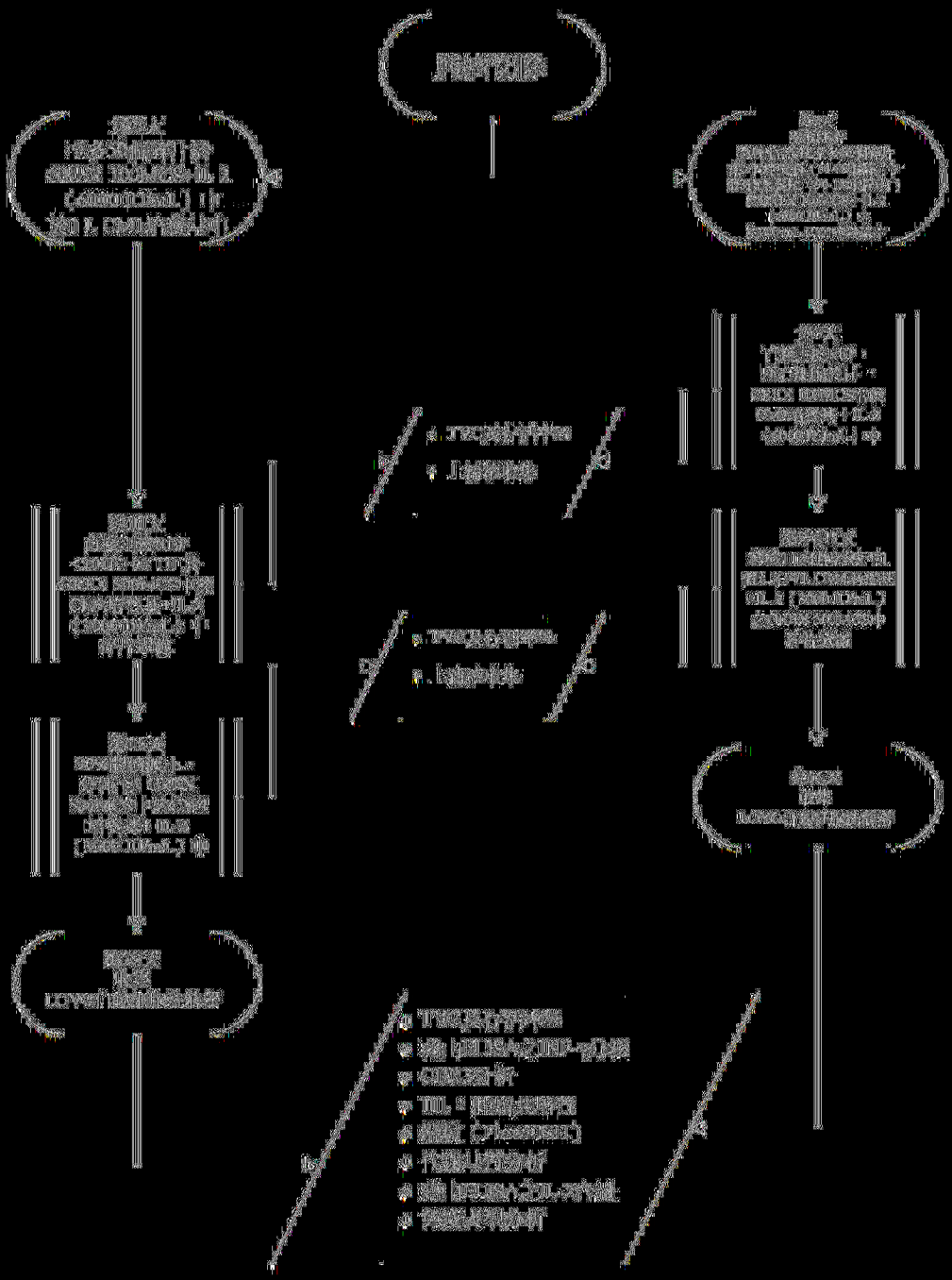


圖 9

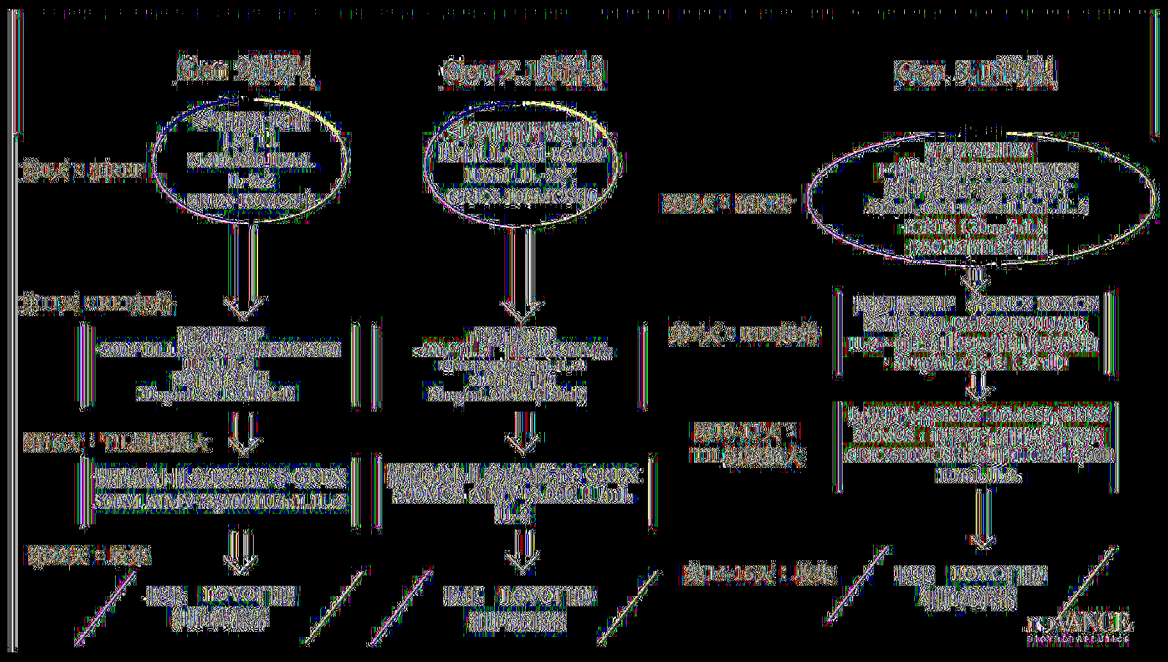
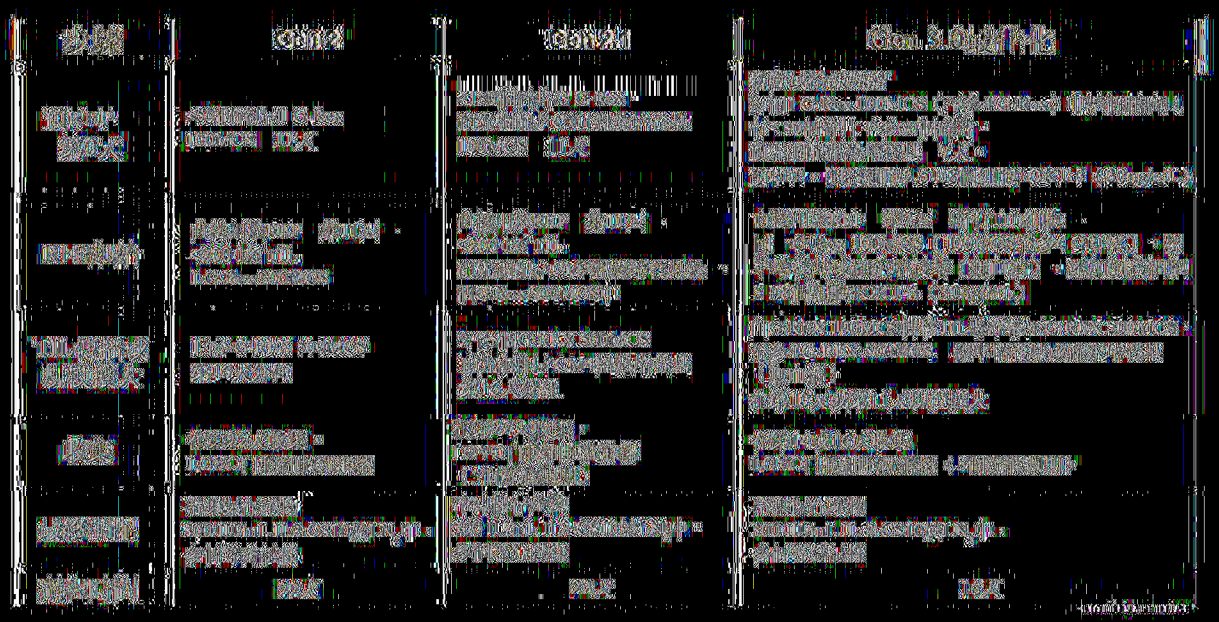
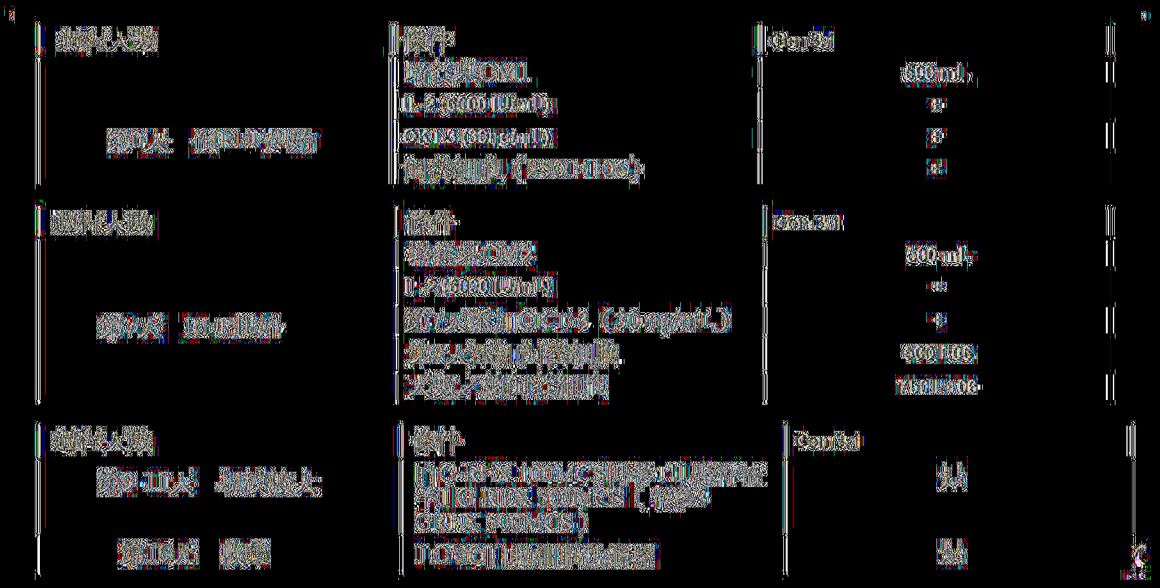


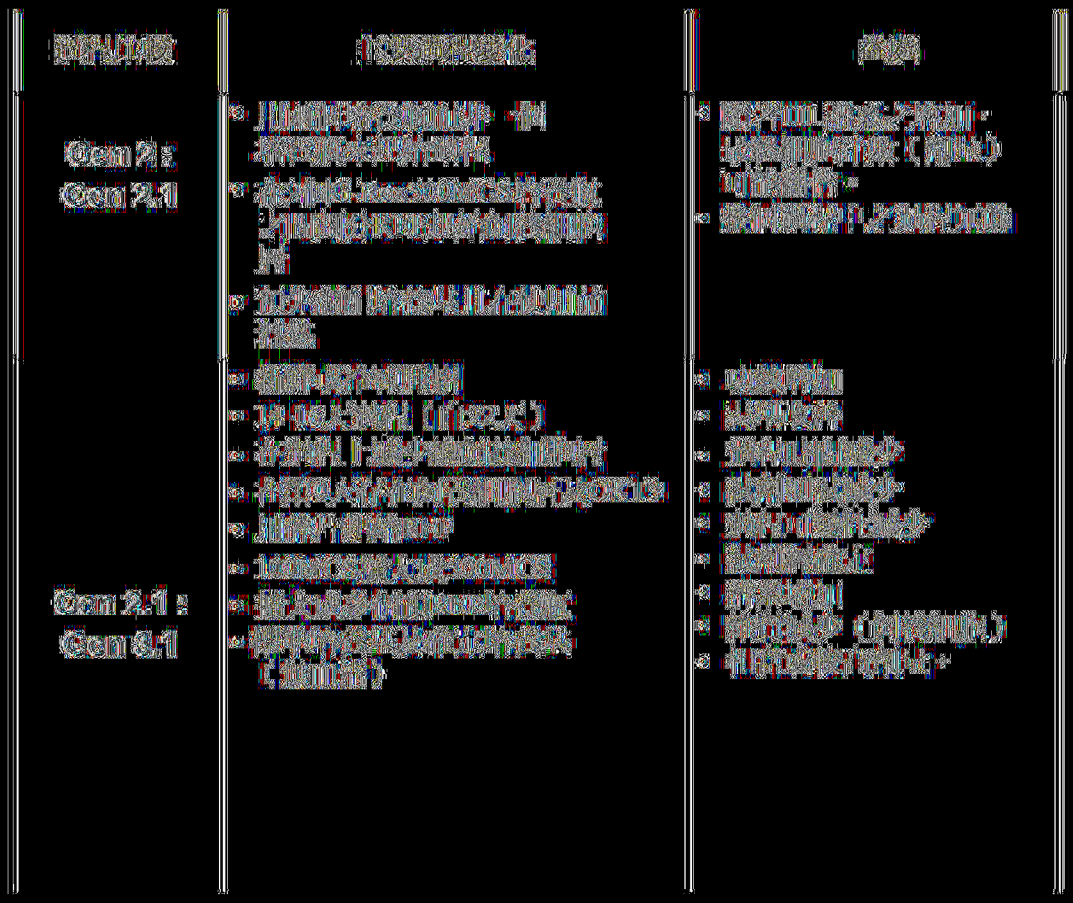
圖 10



(圖 11)



|(圖 12)|



|(圖 13)|

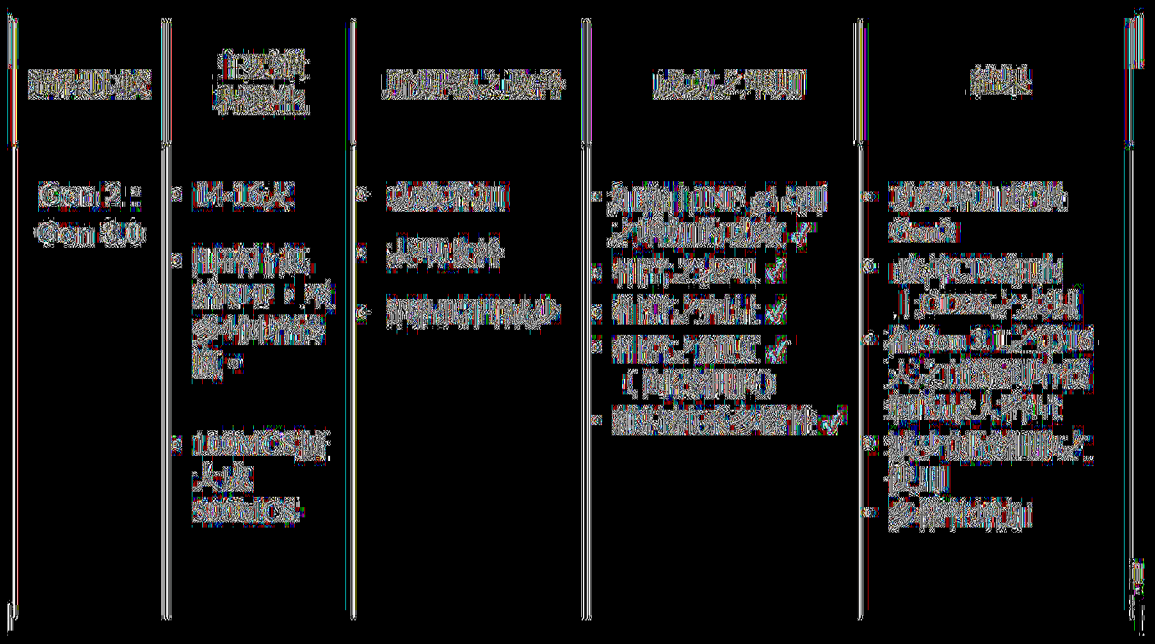
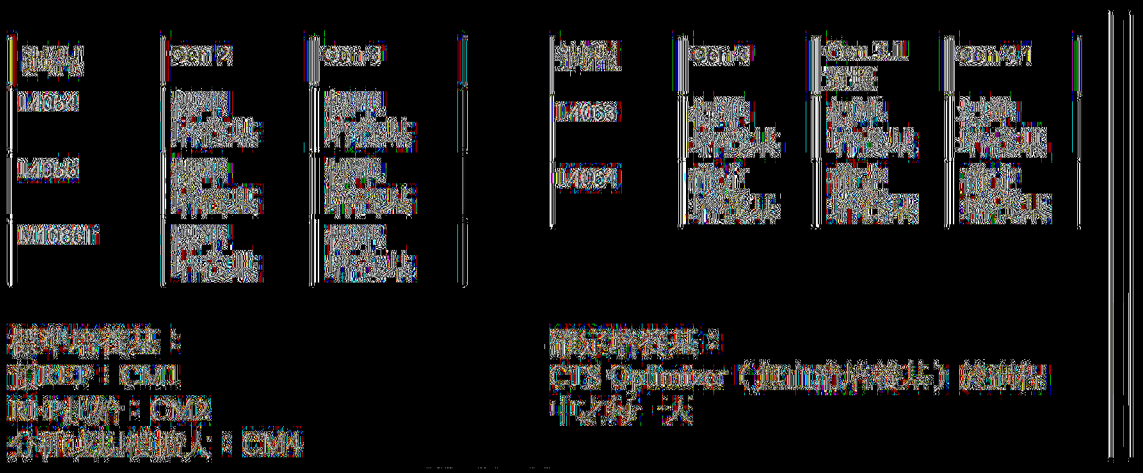

運算裝置
Gen 2 或
Gen 3.0
主記憶體
記憶體模組
4-16 大
用於存儲
操作系統
應用程序
數據
UEFI/BIOS 韌體
主板
系統初始化
啟動時需載入之驅動程序
記憶體初始化
時序配置
頻率設定
啟動流程
啟動 UEFI 韌體
初始化記憶體控制器
讀取 SPD 資訊
設定時序參數
設定頻率與電壓
執行記憶體測試
結果
記憶體模組與運算裝置
Gen
記憶體控制器與
CPU
之間
Gen
主記憶體
支援
UEFI/BIOS
韌體
主板
系統初始化
啟動時
載入
記憶體初始化
程序
設定
時序
頻率
電壓
執行
記憶體測試

圖 14


指標值
LM63
LM65
LM66
指標值
LM63
LM64
CSM 2
CSM 3
CSM 4
CSM 5
CSM 6
CSM 7
標準協定法：
用IBGP：CM1
用RR作：CM2
分割多重協定法：CM4
指定協定法：
CDS Optimizer（最佳協定法）檢測值
「大於」：大

|(圖 15)|

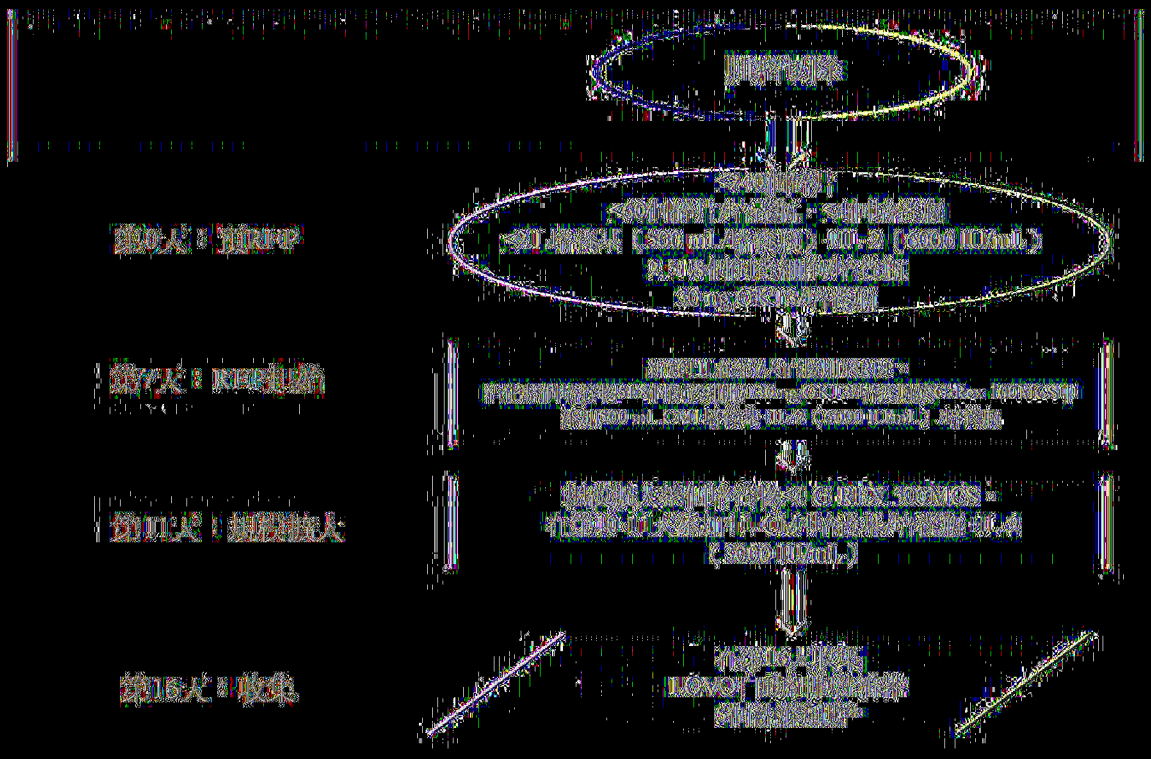
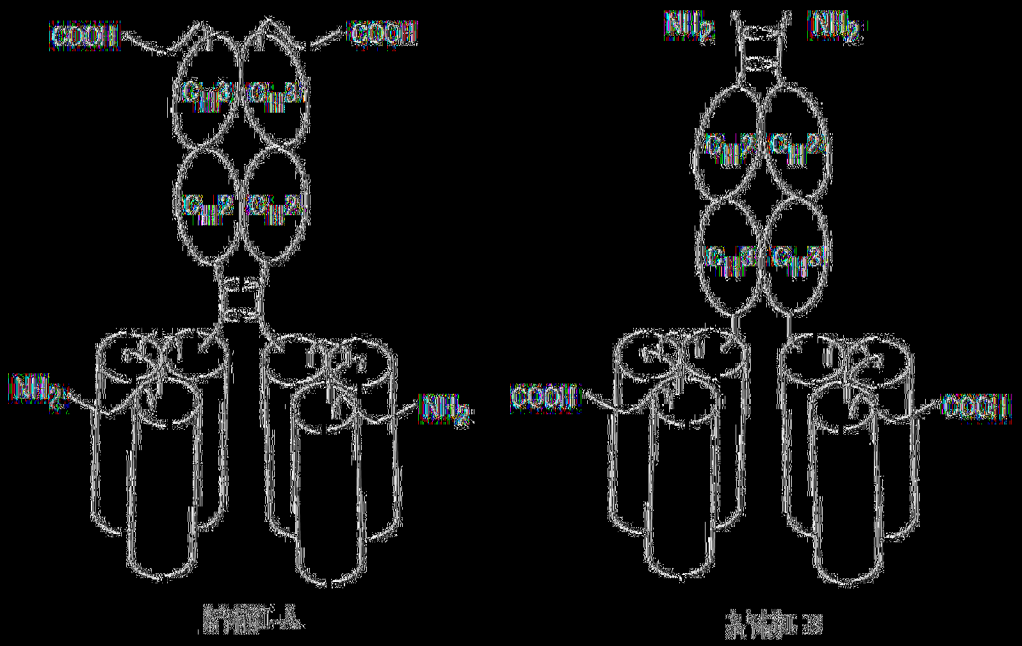


圖 16

圖 17



(圖 18)

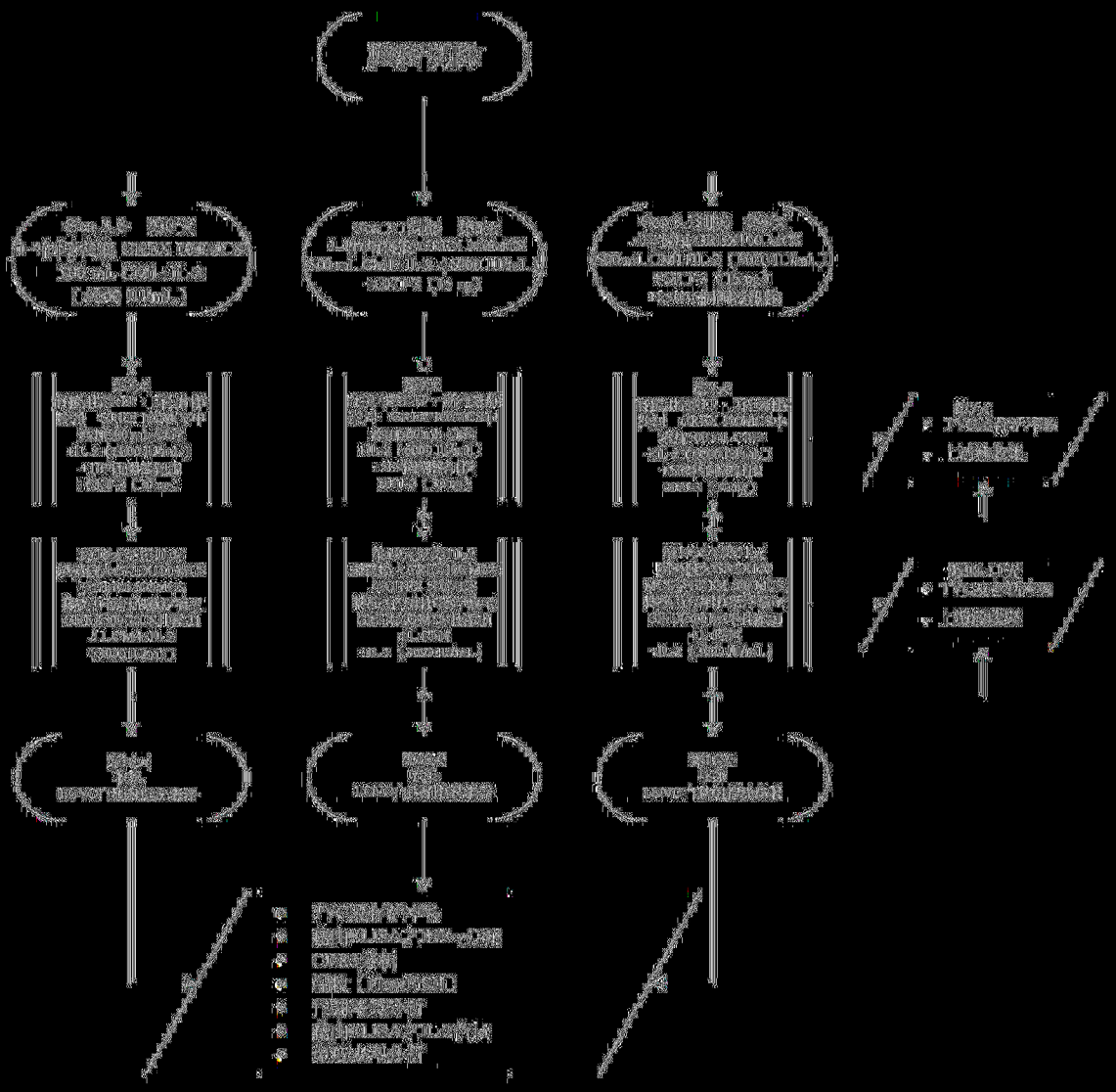
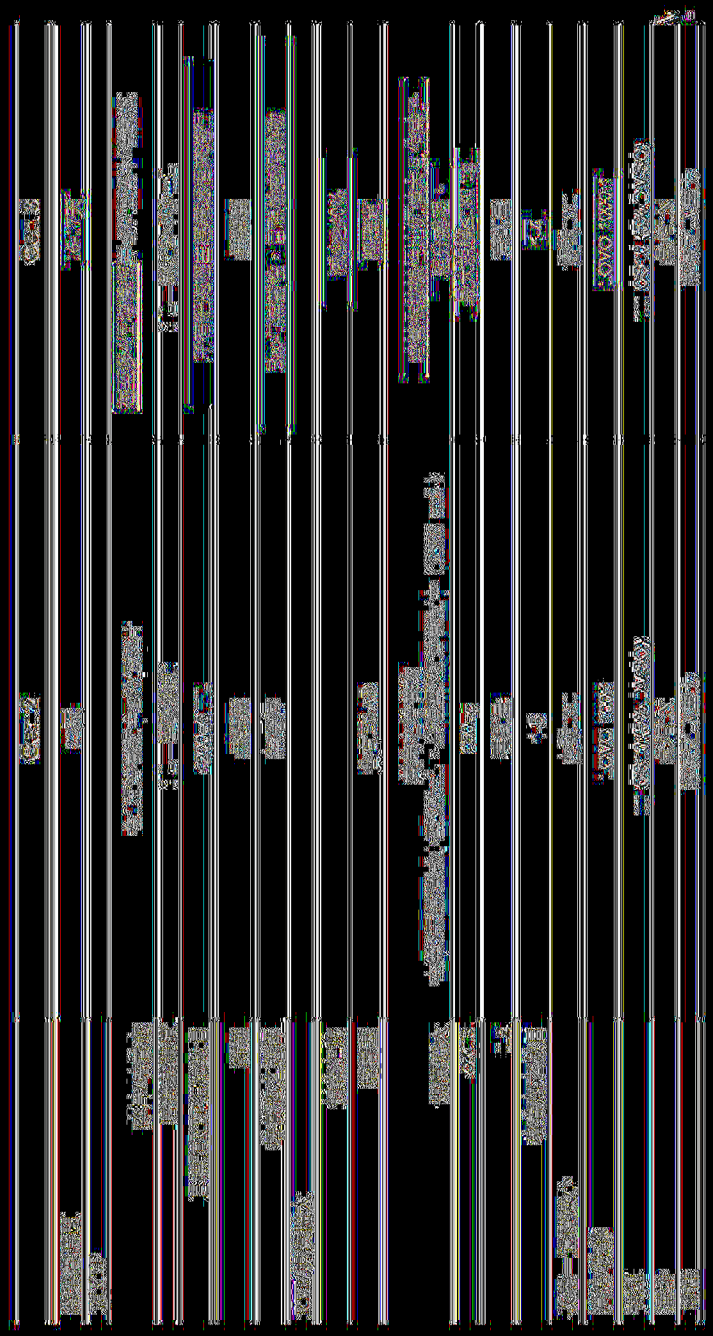


圖 19

圖 2(c)

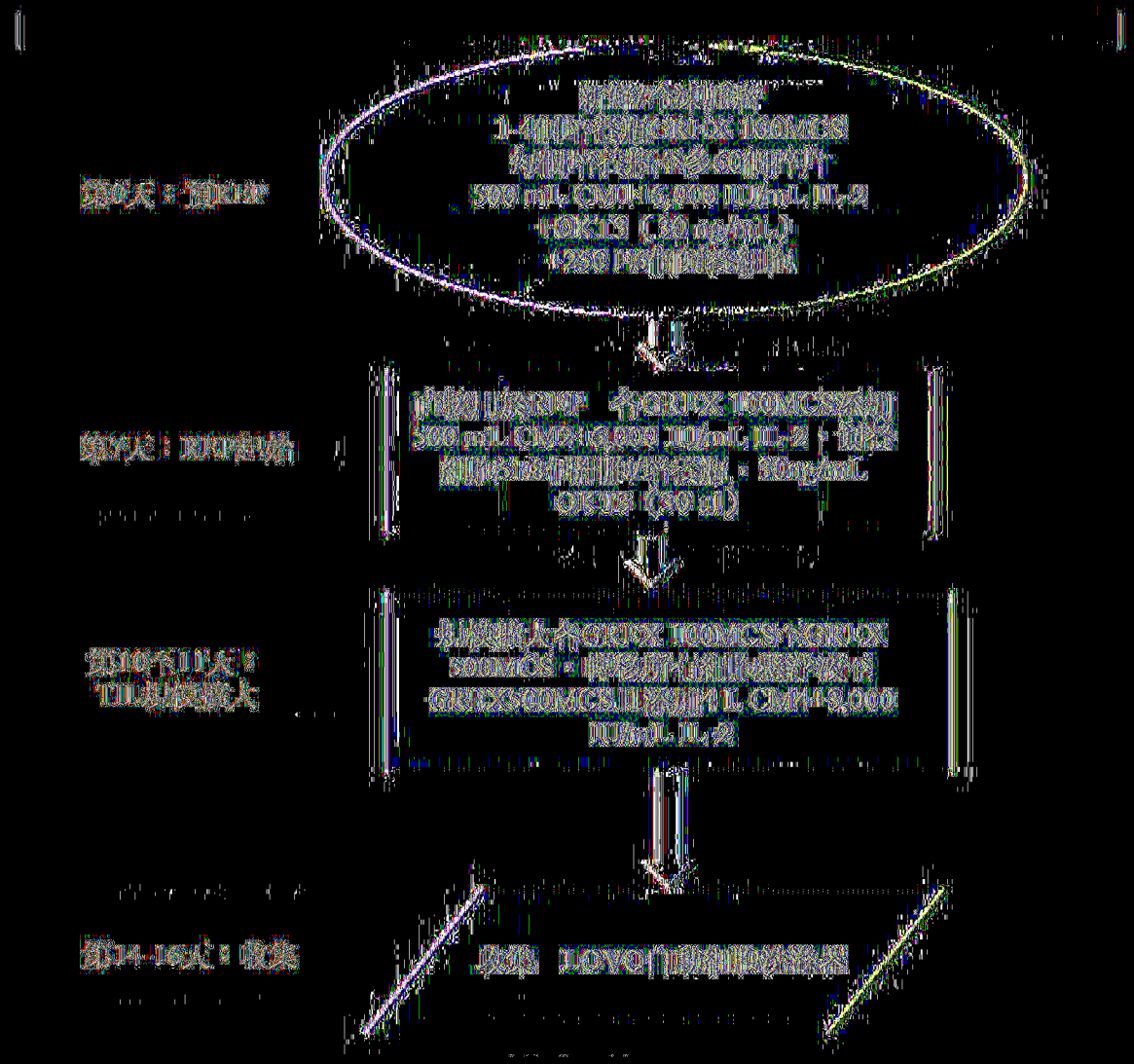
(23)



（圖 23A）

（圖23）

圖 24



（圖 25）

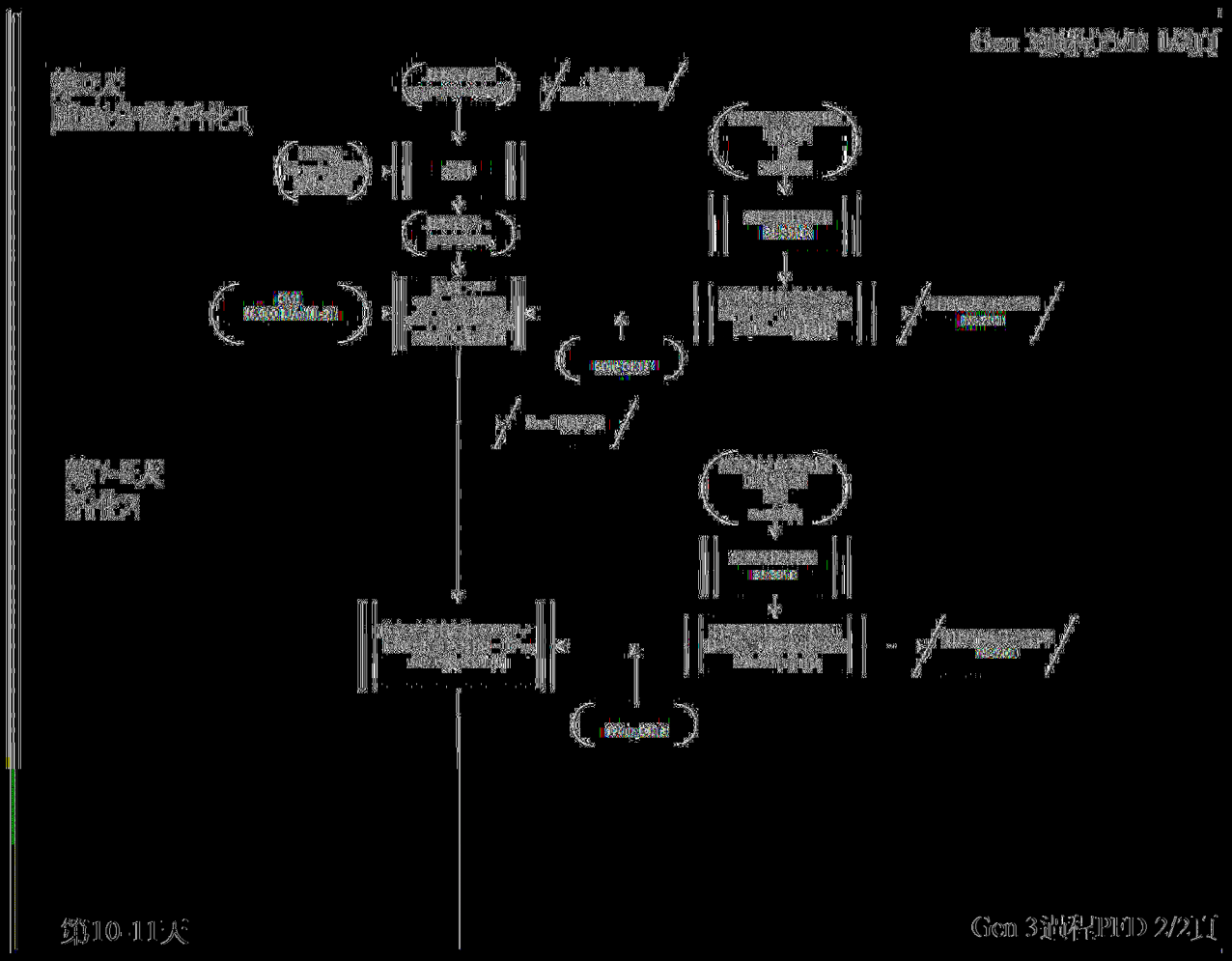
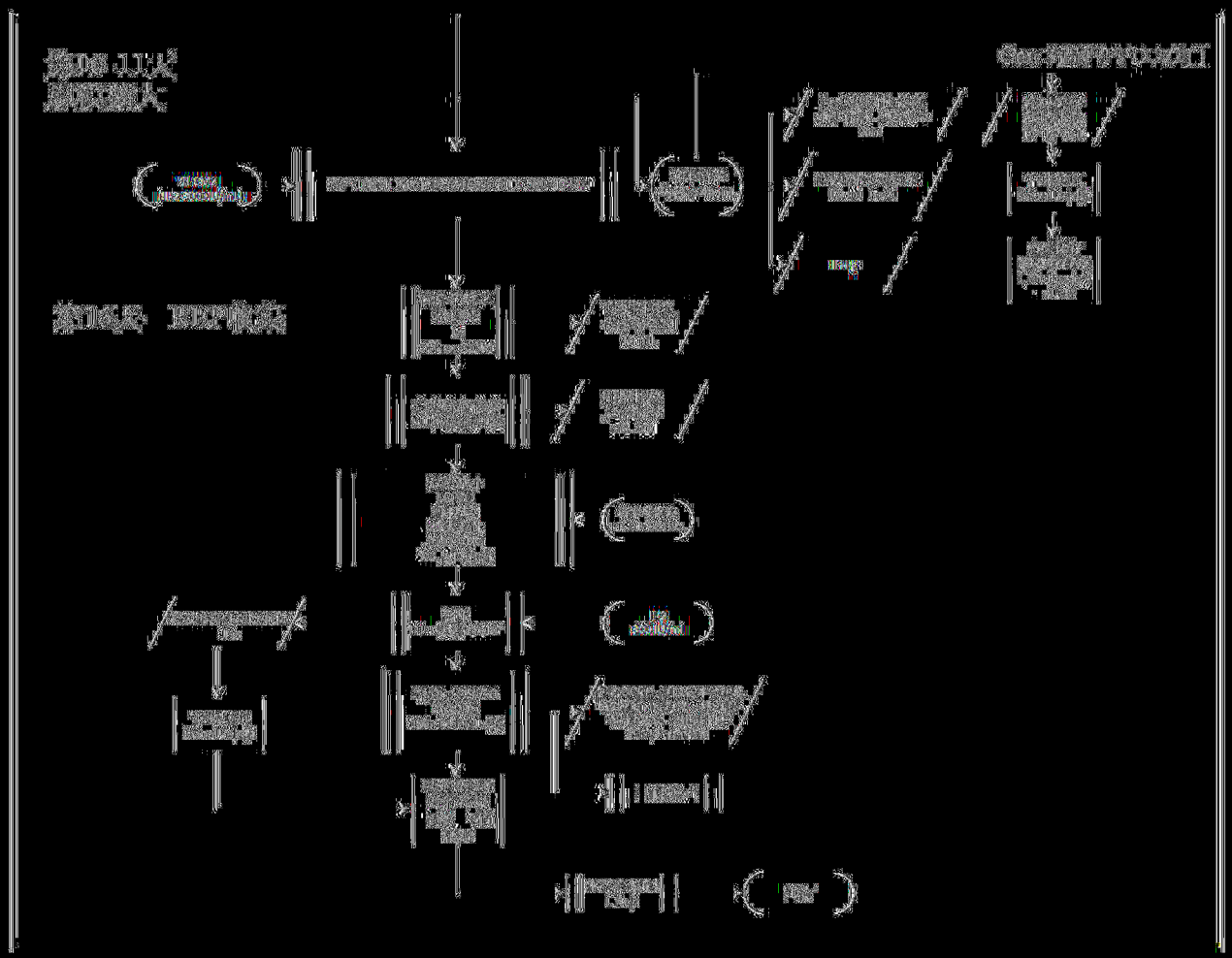


圖 26A



(圖 26B)

圖 27

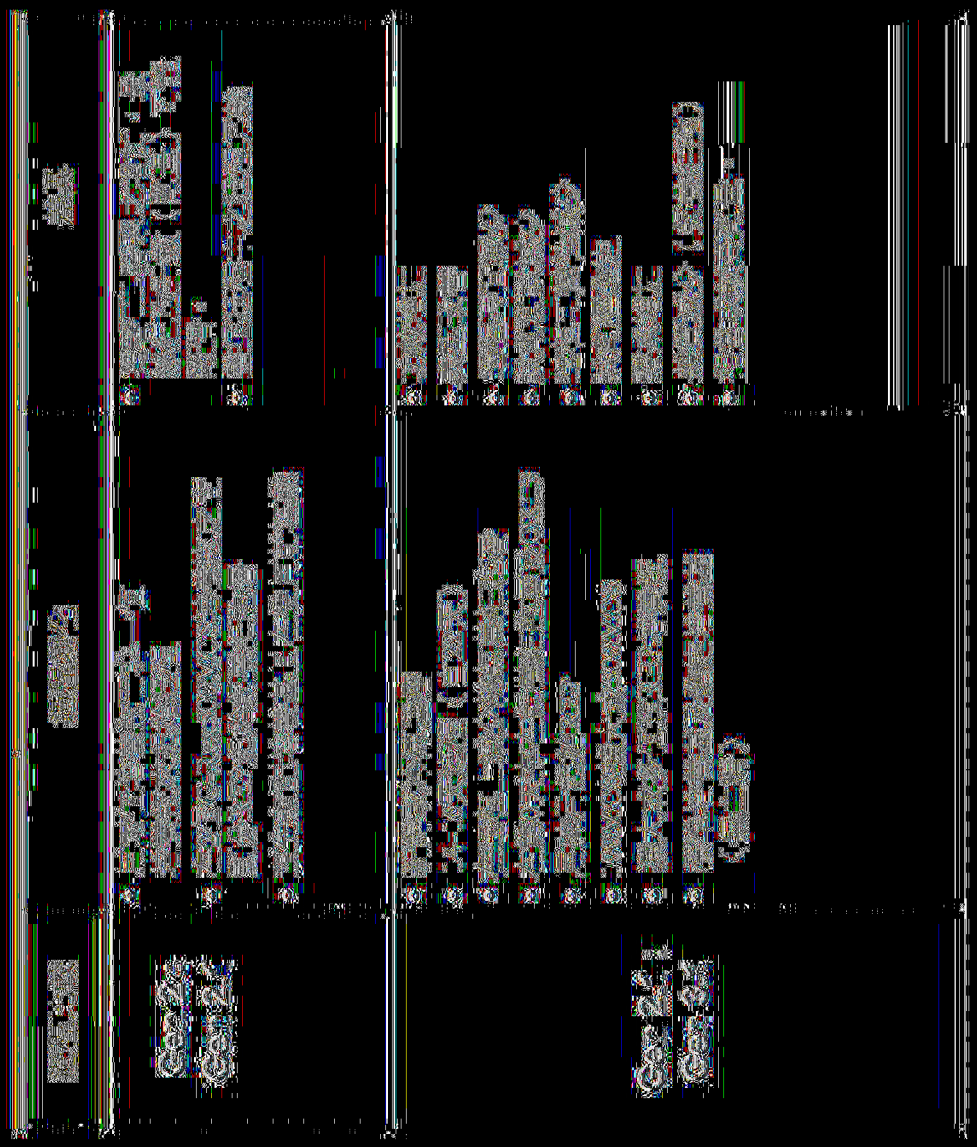


圖 2C

(34)

圖(35)

CONV-202352A
ENSCO
(圖 37)