(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516551
(P2025-516551A)
(43)公表日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2025.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*45/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/06	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ	*38/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/675(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/675	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*31/7076(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7076	４Ｃ２０６

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全651頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-566217(P2024-566217)
(86)(22)出願日　令和5年5月9日(2023.5.9)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月8日(2025.1.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/066795
(87)国際公開番号　WO2023/220608
(87)国際公開日　令和5年11月16日(2023.11.16)
(31)優先権主張番号　63/387,919
(32)優先日　令和4年12月16日(2022.12.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/353,832
(32)優先日　令和4年6月20日(2022.6.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/340,446
最終頁に続く

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

(54)【発明の名称】　ＩＬ－１５Ｒアゴニストと併用した腫瘍浸潤リンパ球療法によるがん患者の治療

(57)【要約】
本発明は、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせて、本明細書に記載のＴＩＬによるがんの治療のための治療効果が増加した治療的ＴＩＬ集団を調製するために、ＴＩＬを調製するための改善及び／または短縮されたプロセス及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒαの組換えヘテロ二量体；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＮＫＴＲ－２５５（ポリマーコンジュゲートＩＬ－１５；Ｎｅｋｔａｒ）、Ｎ－８０３（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）、ＸｍＡｂ３０６（効力低減ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質；Ｘｅｎｃｏｒ）、ＢＪ－００１（腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＢＪ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法であって、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団及びＩＬ－１５Ｒアゴニストを投与することを含む、前記方法。
【請求項２】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＮＩＺ９８５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒαの組換えヘテロ二量体；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＮＫＴＲ－２５５（ポリマーコンジュゲートＩＬ－１５；Ｎｅｋｔａｒ）、Ｎ－８０３（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）、ＸｍＡｂ３０６（効力低減ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質；Ｘｅｎｃｏｒ）、ＢＪ－００１（腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＢＪ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＮＩＺ９８５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒαの組換えヘテロ二量体；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＮＫＴＲ－２５５（ポリマーコンジュゲートＩＬ－１５；Ｎｅｋｔａｒ）である、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、Ｎ－８０３（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）である、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＸｍＡｂ３０６（効力低減ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質；Ｘｅｎｃｏｒ）である、請求項２に記載の方法。
【請求項７】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、前記ＴＩＬ集団を投与するのと同じ日に、前記患者に投与される、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、前記ＴＩＬ集団を投与してから約１～約１０日後に、前記患者に投与される、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、１日に１回、２日に１回、３日に１回、４日に１回、５日に１回、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、または１カ月に１回投与される、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、合計で約１～約２８回の用量で投与される、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、約１μｇ／ｋｇ～約１００μｇ／ｋｇの投与量で投与される、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、２０μｇ／ｋｇの投与量で、５日に１回、最大３回の総用量で投与される、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＴＩＬを前記患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｋｇ／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】
前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｋｇ／日の用量で、及びフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項１４または１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記患者が、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受ける、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で４日間投与し、続いてフルダラビンを３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で４日間投与するステップを含み、任意選択で、前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記患者が、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受けない、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記患者への前記ＴＩＬ集団の投与の翌日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
前記患者への前記ＴＩＬ集団の投与と同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである、請求項２０または２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ＩＬ－２レジメンが、８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、低減された数、例えば、１、２、３、４、もしくは５つの用量の６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む低減された用量のＩＬ－２レジメンである、請求項２０または２１に記載の方法。
【請求項２４】
前記患者が、ＩＬ－２レジメンを受けない、請求項１～１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、前記ＴＩＬ集団の増加した生存及び／または拡張をもたらす、請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、前記ＴＩＬの投与後１４日目、２８日目、及び／または４２日目にＴＩＬの持続をもたらす、請求項１～２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ

、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇの投与量で投与される、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）を前記患者に投与することをさらに含む、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
ＰＤ－１阻害剤またはそのバイオシミラーを前記患者に投与することをさらに含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記ＰＤ－１阻害剤が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはそのバイオシミラーを前記患者に投与することをさらに含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
前記ＰＤ－Ｌ１阻害剤が、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
ＣＴＬＡ－４阻害剤またはそのバイオシミラーを前記患者に投与することをさらに含む、請求項１～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＣＴＬＡ－４阻害剤が、イピルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
化学療法剤を前記患者に投与することをさらに含む、請求項１～３４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３６】
前記ＴＩＬ集団が、
（ａ）患者がＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、前記患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生するステップと、を含む方法を使用して作製され、
前記患者が、前記ＩＣＩまたは化学療法剤による治療中または治療後に進行性疾患を示す場合、前記第１のＴＩＬ集団が、前記ＴＩＬ集団に拡張される、請求項２８～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ＴＩＬ集団が、
（ａ）前記患者が前記ＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記患者から前記腫瘍を切除し、前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの前記第１のＴＩＬ集団を含む前記腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生するステップと、を含む方法を使用して作製され、
前記患者が、前記ＩＣＩまたは化学療法剤による治療中または治療後に進行性疾患を示す場合、前記第１のＴＩＬ集団が、前記ＴＩＬ集団に拡張される、請求項２８～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】

前記第１のＴＩＬ集団の前記拡張が、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、請求項３６または３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記第１のＴＩＬ集団の前記拡張が、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１４日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、請求項３６または３７に記載

の方法。
【請求項４０】
前記第１のＴＩＬ集団の前記拡張が、
（ｃ）前記凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｄ）前記第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第１の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第１の拡張が約１～７／８日の第１の期間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）前記第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、前記急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療用ＴＩＬ集団であり、前記急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｆ）から（ｇ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、請求項３６または３７に記載の方法。
【請求項４１】
前記患者が、凍結保存のステップ（ｂ）の少なくとも約１週間、２週間、３週間、１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月、７カ月、８カ月、９カ月、１０カ月、１１カ月、１２カ月、１３カ月、１４カ月、１５カ月、１６カ月、１７カ月、１８カ月、１９カ月、２０カ月、２１カ月、２２カ月、２３カ月、２４カ月、２５カ月、２６カ月、２７カ月、２８カ月、２９カ月、３０カ月、３１カ月、３２カ月、３３カ月、３４カ月、３５カ月、３６カ月後に進行性疾患を示す、請求項３６～４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
ステップ（ｂ）が、前記腫瘍断片または腫瘍消化物の急速冷凍を含む、請求項３６～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
前記急速冷凍が、
ｉ）前記腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存培地中でインキュベートすることであって、任意選択で、約３０分間～約６０分間、約２℃～約８℃で、１０％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む凍結保存培地中でインキュベートする、前記インキュベートすることと、
ｉｉ）前記腫瘍を冷凍することであって、前記冷凍が、液体窒素の気相を使用して急速冷凍することである、前記冷凍することと、を含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
ステップ（ｂ）が、前記腫瘍断片または腫瘍消化物の制御された速度の冷凍を含む、請求項３６～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４５】

前記制御された速度の冷凍が、
ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加することと、
ｉｉ）制御された速度の冷凍装置中で前記閉鎖可能な容器を予備冷却することと、
ｉｉｉ）凍結保存培地を含む前記閉鎖可能な容器に、前記腫瘍を配置し、前記容器を閉鎖することと、
ｉｖ）前記腫瘍及び凍結保存培地を含む前記閉鎖された容器を、約３０～６０分間、約２～８℃の温度でインキュベートすることと、
ｖ）制御された速度の冷凍装置中で前記容器を緩慢冷凍することと、を含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記ＴＩＬ集団が、
（ａ）前記患者が前記ＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、前記患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｂ）前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項２８～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記ＴＩＬ集団が、
（ａ）前記患者が前記ＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記患者から前記腫瘍を切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含み、任意選択で、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（

抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で、照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記第２のＴＩＬ拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップと、

（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項２８～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４８】

前記患者が、前記ＩＣＩ及び／または化学療法剤による治療にナイーブである、請求項２８～４７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４９】

前記ＴＩＬ集団が、

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

（ｂ）前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１４日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５０】

前記ＴＩＬ集団が、

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

（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

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

～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５１】

前記第２のＴＩＬ集団が、前記第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い、請求項５０に記載の方法。

【請求項５２】

前記ＴＩＬ集団が、

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

（ｂ）前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５３】

前記ＴＩＬ集団が、

（ａ）任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記対象または前記患者から前記腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、第１のＴＩＬ集団を含む、前記切除するステップと、
（ｂ）前記腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第１の拡張が、約３～１１日間行われて、前記第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｄ）前記第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、前記第２の拡張が、約７～１１日間行われて、前記第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）からの前記採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、
（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの前記採取されたＴＩＬ集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記ＴＩＬ集団が、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）前記第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含み、任意選択で、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で、照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記第２のＴＩＬ拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５５】
前記ＴＩＬ集団が、
（ａ）任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、前記患者から前記腫瘍を切除するステップと、

（ｂ）前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、
（ｃ）前記腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）前記第１の細胞培養培地中で前記第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含み、任意選択で、前記プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、前記第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で前記第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で、照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、前記急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記第２のＴＩＬ拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、前記第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む方法を使用して作製される、請求項１～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５６】
前記第３のＴＩＬ集団が、前記急速拡張の開始から７～８日後に、前記第２のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－１５Ｒアゴニストをさらに含む、請求項３８～５６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５８】
前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－１５Ｒアゴニストをさらに含む、請求項３８～５６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５９】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＮＩＺ９８５、ＮＫＴＲ－２５５、Ｎ－８０３、ＸｍＡｂ３０６、ＢＪ－００１、ＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項５７または５８に記載の方法。
【請求項６０】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＮＩＺ９８５である、請求項５７に記載の方法。
【請求項６１】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＮＫＴＲ－２５５である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６２】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、Ｎ－８０３である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６３】
前記ＩＬ－１５ＲアゴニストがＸｍＡｂ３０６である、請求項５９に記載の方法。
【請求項６４】
前記ＩＬ－１５Ｒアゴニストが、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、または約２００ｎｇ／ｍＬの濃度で補充される、請求項５７～６３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６５】
前記ＴＩＬ集団の１つ以上の遺伝子の発現が、調節される、請求項１～６４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６６】
前記１つ以上の遺伝子が、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。

【請求項６８】
ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項６９】
ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７０】
ＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７１】
ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７２】
ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３の発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７３】
ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７４】
ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬ－Ｂの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７５】
ＬＡＧ－３及びＣＩＳＨの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７６】
ＬＡＧ－３及びＣＢＬ－Ｂの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７７】
ＣＩＳＨ及びＣＢＬ－Ｂの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７８】
ＰＤ－１の発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項７９】
ＣＴＬＡ－４の発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項８０】
ＬＡＧ－３の発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項８１】
ＣＩＳＨの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項８２】
ＣＢＬ－Ｂの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項８３】
ＴＩＧＩＴの発現が、前記ＴＩＬ集団において調節される、請求項６６に記載の方法。
【請求項８４】
前記がんが、ＰＤ－１阻害剤及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤またはそれらのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項１～８３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８５】
前記がんが、ＰＤ－１阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項８４に記載の方法。
【請求項８６】

前記ＰＤ－１阻害剤が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記患者が、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはそのバイオシミラーでさらに以前に治療されている、請求項８４に記載の方法。
【請求項８８】
前記ＰＤ－Ｌ１阻害剤が、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
前記がんが、ＣＴＬＡ－４阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている、請求項１～８８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９０】
前記ＣＴＬＡ－４阻害剤が、イピルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される、請求項８９に記載の方法。
【請求項９１】
前記がんが、化学療法レジメンで以前に治療されている、請求項１～９０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９２】
前記化学療法レジメンが、ダカルバジンまたはテモゾリミドを含む、請求項９１に記載の方法。
【請求項９３】
前記第１の拡張が、約１１日間の期間にわたって行われる、請求項３８～９２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９４】
前記ＩＬ－２が、前記第１の拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項３８～９３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９５】
前記ＩＬ－２が、前記初期拡張において、前記細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項３８～９４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９６】
前記第２の拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項３８～９５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９７】
前記急速拡張ステップにおいて、前記ＩＬ－２が、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、前記ＯＫＴ－３抗体が、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する、請求項３８～９６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９８】
前記第１の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項３８～９７に記載の方法。
【請求項９９】
前記初期拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項３８～９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１００】
前記第２の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項３８～９７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０１】
前記急速拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項３８～９７に記載の方法

。
【請求項１０２】
前記第１の細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項３８～１０１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０３】
前記第１の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項３８～１０１に記載の方法。
【請求項１０４】
前記第２の細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項３８～１０３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０５】
前記第２の拡張の前記細胞培養培地が、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項３８～１０３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０６】
治療上有効なＴＩＬ集団が、投与され、かつ約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}ＴＩＬを含む、請求項１～１０５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０７】
前記初期拡張が、２１日以内の期間にわたって行われる、請求項３８～１０６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記初期拡張が、７日以内の期間にわたって行われる、請求項３８～１０７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０９】
前記急速拡張が、７日以内の期間にわたって行われる、請求項３８～１０８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１０】
ステップ（ｃ）における前記第１の拡張及びステップ（ｄ）における前記第２の拡張が、各々１１日間の期間内に個別に行われる、請求項３８～１０９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１１】
ステップ（ａ）～（ｆ）が、約１０日～約２２日で行われる、請求項３８～１１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記がんが、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項１～１１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１３】
前記がんが、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される、請求項１～１１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記がんが、多形性黄色星状膠細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される、請求項１～１１３のいずれか１項に記載の

方法。
【請求項１１５】
前記がんが、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する子宮内膜腺癌である、請求項１～１１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１６】
前記がんが、著しい粘液分化（ＥＣＭＤ）を有する子宮内膜腺癌である、請求項１～１１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１７】
前記がんが、甲状腺乳頭癌である、請求項１～１１６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１８】
前記がんが、低異型度漿液性または境界卵巣癌である、請求項１～１１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１９】
前記がんが、毛様細胞白血病である、請求項１～１１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２０】
前記がんが、ランゲルハンス細胞組織球増殖症である、請求項１～１１９のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２２年１２月１６日に出願された米国仮特許第６３／３８７，９１９号、２０２２年６月２０日に出願された米国仮特許第６３／３５３，８３２号、及び２０２２年５月１０日に出願された米国仮特許第６３／３４０，４４６号の優先権を主張し、これらのすべては参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の養子自家移入を使用した巨大な不応性がんの治療は、予後不良の患者の治療に対する強力なアプローチとなる。Ｇａｔｔｉｎｏｎｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６，６，３８３－３９３。ＴＩＬは、Ｔ細胞に支配され、ＩＬ－２ベースのＴＩＬ拡張とそれに続く「急速拡張プロセス」（ＲＥＰ）は、その速度及び効率のためにＴＩＬ拡張の好ましい方法になっている。Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２００２，２９８，８５０－５４、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－５７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－３９、Ｒｉｄｄｅｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９２，２５７，２３８－４１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２。黒色腫におけるＴＩＬ療法への応答を改善し、ＴＩＬ療法を他の腫瘍タイプに拡張するための多くのアプローチが限られた成功を収めており、この分野は依然として困難である。Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１６，３４，２３８９－９７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－３９、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１１，１７，４５５０－５７。単一免疫チェックポイント阻害剤との併用研究も記載されているが、さらなる研究が進行中であり、追加の治療方法が必要である（Ｋｖｅｒｎｅｌａｎｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０２０，１１（２２），２０９２－２１０５）。
【０００３】
現行のＴＩＬレジメンのプラットフォームは、骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡＬＤ）の投与に続いて、ＴＩＬ細胞療法、及びその後の短期間の高用量ＩＬ－２（アルデスロイキン）に依存する。

【０００４】
ＴＩＬ前のＮＭＡＬＤは、ｉ）リンパ球集団を減少させ、最適な拡張／生存のために入ってくるＴＩＬ細胞療法製品を支持する環境をもたらすことと、ｉｉ）ネオ抗原反応性ＴＩＬの阻害シグナル伝達に寄与し得るＴｒｅｇ及びＭＤＳＣを減少させることによって、腫瘍微小環境を最適化することと、に役立つ。
【０００５】
ＴＩＬ後のＩＬ－２（アルデスロイキン）は、注入されたＴＩＬ細胞産物の生存及び増殖をさらに支持する役割を果たす。
【０００６】
ＮＭＡＬＤにおけるシクロホスファミドの現行の比較的高い用量、及び高用量ＩＬ－２（アルデスロイキン）の安全性プロファイルを考慮すると、ＴＩＬ注入前及び／またはＴＩＬ注入後の高用量ＩＬ－２のＮＭＡＬＤ中の化学療法剤への患者の曝露を低減しながら、ＴＩＬを使用してがんを治療する改善された方法が必要である。
【発明の概要】
【０００７】
ＴＩＬの拡張集団及びＩＬ－１５Ｒアゴニストを使用して患者におけるがんを治療する方法、ならびに少なくとも１つのＩＣＩで前治療された患者または対象からＴＩＬの治療的集団を産生する方法が、本明細書で提供される。
【０００８】
本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団及びＩＬ－１５Ｒアゴニストを投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法を提供する。
【０００９】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒαの組換えヘテロ二量体；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＮＫＴＲ－２５５（ポリマーコンジュゲートＩＬ－１５；Ｎｅｋｔａｒ）、Ｎ－８０３（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）、ＸｍＡｂ３０６（効力低減ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質；Ｘｅｎｃｏｒ）、ＢＪ－００１（腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＢＪ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。
【００１０】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒαの組換えヘテロ二量体；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）である。
【００１１】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＫＴＲ－２５５（ポリマーコンジュゲートＩＬ－１５；Ｎｅｋｔａｒ）である。
【００１２】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、Ｎ－８０３（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）である。
【００１３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＸｍＡｂ３０６（効力低減ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質；Ｘｅｎｃｏｒ）である。
【００１４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＴＩＬの集団を投与するのと同じ日に、患者に投与される。
【００１５】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＴＩＬ集団を投与してから約１～約１０日後に、患者に投与される。
【００１６】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１日に１回、２日に１回、３日に１回、４日に１回、５日に１回、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、または

１カ月に１回投与される。
【００１７】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、合計で約１～約２８回の用量で投与される。
【００１８】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約１μｇ／ｋｇ～約１００μｇ／ｋｇの投与量で投与される。
【００１９】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、２０μｇ／ｋｇの投与量で、５日に１回、最大３回の総用量で投与される。
【００２０】
いくつかの実施形態では、本方法は、ＴＩＬを患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００２１】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｋｇ／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。
【００２２】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｋｇ／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【００２３】
いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。
【００２４】
いくつかの実施形態では、患者は、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受ける。
【００２５】
いくつかの実施形態では、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で４日間投与し、続いてフルダラビンを３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で４日間投与するステップを含み、任意選択で、シクロホスファミドが、メスナとともに投与される。
【００２６】
いくつかの実施形態では、患者は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受けない。
【００２７】
いくつかの実施形態では、本方法は、ＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００２８】
いくつかの実施形態では、本方法は、ＴＩＬ集団を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【００２９】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む高用量ＩＬ－２レジメンである。
【００３０】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、低減された数、例えば、１、２、３、４、もしくは５つの用量の６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む低減された用量のＩＬ－２レジメンである。
【００３１】

いくつかの実施形態では、患者は、ＩＬ－２レジメンを受けない。
【００３２】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＴＩＬ集団の増加した生存及び／または拡張をもたらす。
【００３３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＴＩＬの投与後１４日目、２８日目、及び／または４２日目にＴＩＬの持続をもたらす。
【００３４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約０．５μｇ／ｋｇ、１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇの投与量で投与される。
【００３５】
いくつかの実施形態では、本方法は、免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）を患者に投与することをさらに含む。
【００３６】
いくつかの実施形態では、本方法は、ＰＤ－１阻害剤またはそのバイオシミラーを患者に投与することをさらに含む。
【００３７】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。
【００３８】
いくつかの実施形態では、本方法は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはそのバイオシミラーを患者に投与することをさらに含む。
【００３９】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。
【００４０】
いくつかの実施形態では、本方法は、ＣＴＬＡ－４阻害剤またはそのバイオシミラーを患者に投与することをさらに含む。
【００４１】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。
【００４２】
いくつかの実施形態では、本方法は、化学療法剤を患者に投与することをさらに含む。
【００４３】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、
（ａ）患者がＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生するステップと、を含む方法を使用して作製され、
患者が、ＩＣＩまたは化学療法剤による治療中または治療後に進行性疾患を示す場合、第１のＴＩＬ集団が、ＴＩＬ集団に拡張される。
【００４４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、
（ａ）患者がＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、任意選択で、外科的切除、針生検

、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、患者から腫瘍を切除し、腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を産生するステップと、を含む方法を使用して作製され、

患者が、ＩＣＩまたは化学療法剤による治療中または治療後に進行性疾患を示す場合、第１のＴＩＬ集団が、ＴＩＬ集団に拡張される。

【００４５】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団の拡張は、

（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

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

【００４６】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団の拡張は、

（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｄ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得されたＴＩＬの治療的集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、治療的集団を採取するステップと、

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

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

【００４７】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団の拡張は、

（ｃ）凍結保存された腫瘍断片または腫瘍消化物を解凍し、第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

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

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣで補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、急速な第２の拡張に追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が、約１～１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、前記第３のＴＩＬ集団が、治療用ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得されたＴＩＬの治療的集団を採取するステップであって、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、治療的集団を採取するステップと、

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

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

【００４８】

いくつかの実施形態では、患者は、凍結保存のステップ（ｂ）の少なくとも約１週間、２週間、３週間、１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月、７カ月、８カ月、９カ月、１０カ月、１１カ月、１２カ月、１３カ月、１４カ月、１５カ月、１６カ月、１７カ月、１８カ月、１９カ月、２０カ月、２１カ月、２２カ月、２３カ月、２４カ月、２５カ月、２６カ月、２７カ月、２８カ月、２９カ月、３０カ月、３１カ月、３２カ月、３３カ月、３４カ月、３５カ月、３６カ月後に進行性疾患を示す。

【００４９】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）は、腫瘍断片または腫瘍消化物の急速冷凍を含む。

【００５０】

いくつかの実施形態では、急速冷凍は、

ｉ）腫瘍断片または腫瘍消化物を凍結保存培地中でインキュベートすることであって、任意選択で、約３０分間～約６０分間、約２℃～約８℃で、１０％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む凍結保存培地中でインキュベートする、インキュベートすることと、

ｉｉ）腫瘍を冷凍することであって、冷凍が、液体窒素の気相を使用して急速冷凍することである、冷凍することと、を含む。

【００５１】

いくつかの実施形態では、ステップ（ｂ）は、腫瘍断片または腫瘍消化物の制御された速度の冷凍を含む。

【００５２】

いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍は、

ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加することと、

ｉｉ）制御された速度の冷凍装置中で閉鎖可能な容器を予備冷却することと、

ｉｉｉ）凍結保存培地を含む閉鎖可能な容器に、腫瘍を配置し、容器を閉鎖することと、

ｉｖ）腫瘍及び凍結保存培地を含む閉鎖容器を、約３０～６０分間、約２～８℃の温度でインキュベートすることと、

ｖ）制御された速度の冷凍装置中で容器を緩慢冷凍することと、を含む。

【００５３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、

（ａ）患者がＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

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

【００５４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、

（ａ）患者がＩＣＩまたは化学療法剤を受ける前に、患者から、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、腫瘍を切除するステップと、

（ｂ）腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、

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

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

（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、

（ｇ）ステップ（ｆ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップと、

（ｈ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｇ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、方法を使用して作製される。

【００５５】

いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ及び／または化学療法剤による治療にナイーブである。

【００５６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、

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

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、システムを開くことなく起こる、移すステップと、

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

【００５７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップ

であって、ステップ（ｅ）から（ｆ）移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、

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

【００５８】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い。

【００５９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、

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

（ｂ）第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

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

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

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

【００６０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、

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

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１１日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生するステップと、

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された前記第３のＴＩＬ集団を採取するステップであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取された第３のＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｇ）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、を含む、方法を使用して作製される。
【００６１】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、
（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容するステップと、
（ｃ）第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含み、任意選択で、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で、照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、第２のＴＩＬ拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む、方法を使用して作製される。
【００６２】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、
（ａ）任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から、患者から腫瘍を切除するステップと、
（ｂ）腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、
（ｃ）腫瘍断片を、第１の細胞培養培地と接触させるステップと、
（ｄ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２を含み、任意選択で、プライミングによる第１の拡張が、１～８日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｅ）第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団の急速拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を取得するステップであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３（抗ＣＤ３抗体）、及び任意選択で、照射された同種異系末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、第２のＴＩＬ拡張が、急速な第２の拡張の開始後１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日または１０日にわたって進行することができる、第３のＴＩＬ集団を取得するステップと、
（ｆ）第３のＴＩＬ集団を採取するステップと、を含む、方法を使用して作製される。
【００６３】
いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団は、急速拡張の開始から７～８日後に、第２のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い。
【００６４】
いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－１５Ｒアゴニストをさらに含む。
【００６５】

いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－１５Ｒアゴニストをさらに含む。

【００６６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５、ＮＫＴＲ－２５５、Ｎ－８０３、ＸｍＡｂ３０６、ＢＪ－００１、ＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【００６７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５である。

【００６８】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＫＴＲ－２５５である。

【００６９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、Ｎ－８０３である。

【００７０】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＸｍＡｂ３０６である。

【００７１】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、または約２００ｎｇ／ｍＬの濃度で、第１の細胞培養培地中で補充される。

【００７２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、または約２００ｎｇ／ｍＬの濃度で、第２の細胞培養培地中で補充される。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団の１つ以上の遺伝子の発現が、調節される。

【００７４】

いくつかの実施形態では、１つ以上の遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂからなる群から選択される。

【００７５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００７６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００７７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００７８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００７９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００８０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４及びＬＡＧ－３の発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００８１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４及びＣＩＳＨの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。

【００８２】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４及びＣＢＬ－Ｂの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８３】
いくつかの実施形態では、ＬＡＧ－３及びＣＩＳＨの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８４】
いくつかの実施形態では、ＬＡＧ－３及びＣＢＬ－Ｂの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８５】
いくつかの実施形態では、ＣＩＳＨ及びＣＢＬ－Ｂの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８６】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１の発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８７】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４の発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８８】
いくつかの実施形態では、ＬＡＧ－３の発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００８９】
いくつかの実施形態では、ＣＩＳＨの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００９０】
いくつかの実施形態では、ＣＢＬ－Ｂの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００９１】
いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴの発現は、ＴＩＬ集団において調節される。
【００９２】
いくつかの実施形態では、がんは、ＰＤ－１阻害剤及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている。
【００９３】
いくつかの実施形態では、がんは、ＰＤ－１阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている。
【００９４】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。
【００９５】
いくつかの実施形態では、患者は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤またはそのバイオシミラーでさらに以前に治療されている。
【００９６】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。
【００９７】
いくつかの実施形態では、がんは、ＣＴＬＡ－４阻害剤またはそのバイオシミラーで以前に治療されている。
【００９８】
いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。
【００９９】
がんが、化学療法レジメンで以前に治療されている、請求項１～８０のいずれか１項に記載の方法。
【０１００】
いくつかの実施形態では、化学療法レジメンは、ダカルバジンまたはテモゾリミドを含

む。
【０１０１】
いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約１１日の期間にわたって行われる。
【０１０２】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【０１０３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、初期拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの間の初期濃度で存在する。
【０１０４】
いくつかの実施形態では、第２の拡張ステップにおいて、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【０１０５】
いくつかの実施形態では、急速拡張ステップにおいて、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。
【０１０６】
いくつかの実施形態では、第１の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【０１０７】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【０１０８】
いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【０１０９】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。
【０１１０】
いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【０１１１】
いくつかの実施形態では、第１の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【０１１２】
いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【０１１３】
いくつかの実施形態では、第２の拡張の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。
【０１１４】
いくつかの実施形態では、治療上有効なＴＩＬ集団が、投与され、かつ約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個のＴＩＬを含む。
【０１１５】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、２１日以内の期間にわたって行われる。
【０１１６】
いくつかの実施形態では、初期拡張は、７日以内の期間にわたって行われる。
【０１１７】
いくつかの実施形態では、急速拡張は、７日以内の期間にわたって行われる。

【０１１８】
いくつかの実施形態では、ステップ（ｃ）における第１の拡張及びステップ（ｄ）における第２の拡張は、各々、１１日の期間内で個別に行われる。
【０１１９】
いくつかの実施形態では、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１０日～約２２日で行われる。
【０１２０】
いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、がんは、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、及び結膜悪性黒色腫からなる群から選択される。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、がんは、多形性黄色星状膠細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫からなる群から選択される。
【０１２３】
いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する子宮内膜腺癌である。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、がんは、著しい粘液分化（ＥＣＭＤ）を有する子宮内膜腺癌である。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、がんは、甲状腺乳頭癌である。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、がんは、低異型度漿液性または境界卵巣癌である。
【０１２７】
いくつかの実施形態では、がんは、毛様細胞白血病である。
【０１２８】
いくつかの実施形態では、がんは、ランゲルハンス細胞組織球増殖症である。
【図面の簡単な説明】
【０１２９】
【図１】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）チャート。
【図２Ａ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。
【図２Ｂ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。
【図２Ｃ】ＴＩＬ製造のためのＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のプロセスフローチャート。
【図３】凍結保存されたＴＩＬの例示的な製造プロセス（約２２日）の実施形態のダイアグラムを示す。
【図４】ＴＩＬ製造のための２２日プロセスである、Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施形態のダイアグラムを示す。
【図５】ＴＩＬ製造のためのプロセス１Ｃ及びＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の例示的な実施形態からのステップＡ～Ｆの比較表。
【図６】ＴＩＬ製造のためのプロセス１Ｃの実施形態とＧｅｎ２（プロセス２Ａ）の実施

形態との詳細な比較。
【図７】例示的なＧｅｎ３型ＴＩＬ製造プロセス。
【図８Ａ】ＴＩＬ製造のための２Ａプロセス（およそ２２日間のプロセス）の実施形態と、Ｇｅｎ３プロセス（およそ１４日間～１６日間のプロセス）の実施形態との比較を示す。
【図８Ｂ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセスＧｅｎ３チャート（およそ１４日～１６日プロセス）。
【図８Ｃ】３つのプロセスバリエーションの各々について、ステップＡ～Ｆ（およそ１４日～１６日プロセス）の概要とともに３つの例示的なＧｅｎ３プロセスを提供するチャート。
【図８Ｄ】ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ２様プロセス（およそ２２日プロセス）。
【図８Ｅ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図８Ｆ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図８Ｇ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図８Ｈ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図８Ｉ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図８Ｊ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図８Ｋ】ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの例示的な実施形態を含むステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的な修正Ｇｅｎ　２様プロセス（およそ２２日間プロセス）。
【図９】Ｇｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。
【図１０】様々なＧｅｎ２（プロセス２Ａ）とＧｅｎ３．１プロセス実施形態との比較を示す。
【図１１】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１２】Ｇｅｎ３．１と称される、Ｇｅｎ３プロセスの実施形態のための培地条件の概要。
【図１３】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。
【図１４】Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。
【図１５】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。
【図１６】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図１７】Ｇｅｎ３拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からＴ細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。
【図１８】構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂを提供する。円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬまたは４－１ＢＢに結合する抗体に由来する３つの直線的に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがＩｇＧ１－Ｆｃ（ＣＨ３及びＣＨ２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基ならびに柔軟性

のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたＶ$_H$鎖及びＶ$_L$鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。
【図１９】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２０】Ｇｅｎ３．１プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。
【図２１】Ｇｅｎ３．１試験プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２２】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２３Ａ】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２３Ｂ】例示的なＧｅｎ２プロセス及び例示的なＧｅｎ３プロセスの比較表。
【図２４】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。
【図２５】Ｇｅｎ３プロセス（１４～１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ａ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２６Ｂ】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２７】Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図２８】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図２９】Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１、及びＧｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の実施形態の比較。
【図３０】Ｇｅｎ３実施形態の構成要素。
【図３１】Ｇｅｎ３実施形態のフローチャート比較（Ｇｅｎ３．０、Ｇｅｎ３．１対照、Ｇｅｎ３．１試験）。
【図３２】Ｇｅｎ３プロセス（１６～１７日プロセス）の例示的な実施形態の構成要素が示される。
【図３３】承認基準表。
【図３４】実施例１９に記載の研究に関連するＴＩＬベースの免疫療法製造プロセスの概略図。略語：ＣＭＯ＝受託製造組織、ＧＭＰ＝適正製造規範、ＩＬ－２＝インターロイキン－２、ＯＫＴ３＝ＣＤ３に対するモノクローナル抗体、ＴＩＬ＝腫瘍浸潤リンパ球。
【図３５】本格的なＰＤ－１　ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの実験フロー図。
【図３６】本格的なＰＤ－１　ＫＯ　ＴＩＬ　ＴＡＬＥＮプロセスの実験フロー図。
【図３７Ａ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｂ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｃ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｄ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｅ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｆ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｇ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｈ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｉ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３７Ｊ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タ

ンパク質。
【図３８Ａ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３８Ｂ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３８Ｃ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３８Ｄ】本明細書に記載のＴＩＬに含まれ得る、例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質。
【図３９】がんの治療に使用される例示的なＩＬ－１５剤（Ｗａｌｄｍａｎｎ，Ｔ．Ａ．，ｅｔ．ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１１：１－１０（２０２０）からの図）。
【図４０】例示的なＩＬ－１５剤ＡＬＴ－８０３のダイアグラム（Ｃｈｕ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ，８（２）：１－１４，捕捉内容（２０２０）からのダイアグラム）。
【図４１】実施例１３に開示されている臨床試験の設計の例示。
【０１３０】
配列表の簡単な説明
配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。
【０１３１】
配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。
【０１３２】
配列番号３は、組換えヒトＩＬ－２タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１３３】
配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。
【０１３４】
配列番号５は、ＩＬ－２形態である。
【０１３５】
配列番号６は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。
【０１３６】
配列番号７は、ＩＬ－２形態である。
【０１３７】
配列番号８は、ムチンドメインポリペプチドである。
【０１３８】
配列番号９は、組換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１３９】
配列番号１０は、組換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１４０】
配列番号１１は、組換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１４１】
配列番号１２は、組換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。
【０１４２】
配列番号１３は、ＩＬ－２配列である。
【０１４３】
配列番号１４は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【０１４４】
配列番号１５は、ＩＬ－２ムテイン配列である。
【０１４５】
配列番号１６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２である。
【０１４６】

配列番号１７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２である。
【０１４７】
配列番号１８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３である。
【０１４８】
配列番号１９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２カバットである。
【０１４９】
配列番号２０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２カバットである。
【０１５０】
配列番号２１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３カバットである。
【０１５１】
配列番号２２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２クロチアである。
【０１５２】
配列番号２３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２クロチアである。
【０１５３】
配列番号２４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３クロチアである。
【０１５４】
配列番号２５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２　ＩＭＧＴである。
【０１５５】
配列番号２６は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ２　ＩＭＧＴである。
【０１５６】
配列番号２７は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＨＣＤＲ３　ＩＭＧＴである。
【０１５７】
配列番号２８は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のV_H鎖である。
【０１５８】
配列番号２９は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１の重鎖である。
【０１５９】
配列番号３０は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１カバットである。
【０１６０】
配列番号３１は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２カバットである。
【０１６１】
配列番号３２は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３カバットである。
【０１６２】
配列番号３３は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ１クロチアである。
【０１６３】
配列番号３４は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ２クロチアである。
【０１６４】
配列番号３５は、ＩｇＧ．ＩＬ２Ｒ６７Ａ．Ｈ１のＬＣＤＲ３クロチアである。
【０１６５】
配列番号３６は、V_L鎖である。
【０１６６】
配列番号３７は、軽鎖である。
【０１６７】
配列番号３８は、軽鎖である。
【０１６８】
配列番号３９は、軽鎖である。
【０１６９】
配列番号４０は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。

【０１７０】
配列番号４１は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
【０１７１】
配列番号４２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖である。
【０１７２】
配列番号４３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖である。
【０１７３】
配列番号４４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖可変領域（V_H）である。
【０１７４】
配列番号４５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０１７５】
配列番号４６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１７６】
配列番号４７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ２である。
【０１７７】
配列番号４８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１７８】
配列番号４９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１７９】
配列番号５０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１８０】
配列番号５１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１８１】
配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖である。
【０１８２】
配列番号５３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖である。
【０１８３】
配列番号５４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
【０１８４】
配列番号５５は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
【０１８５】
配列番号５６は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ１である。
【０１８６】
配列番号５７は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ２である。

【０１８７】
配列番号５８は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖ＣＤＲ３である。
【０１８８】
配列番号５９は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０１８９】
配列番号６０は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０１９０】
配列番号６１は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０１９１】
配列番号６２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０１９２】
配列番号６３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９３】
配列番号６４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９４】
配列番号６５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９５】
配列番号６６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９６】
配列番号６７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９７】
配列番号６８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９８】
配列番号６９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０１９９】
配列番号７０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２００】
配列番号７１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２０１】
配列番号７２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２０２】
配列番号７３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
【０２０３】
配列番号７４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２０４】
配列番号７５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２０５】
配列番号７６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
【０２０６】
配列番号７７は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
【０２０７】
配列番号７８は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
【０２０８】
配列番号７９は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２０９】

配列番号８０は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン１の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２１０】

配列番号８１は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２１１】

配列番号８２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体４Ｂ４－１－１バージョン２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２１２】

配列番号８３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２１３】

配列番号８４は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２１４】

配列番号８５は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。

【０２１５】

配列番号８６は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。

【０２１６】

配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖である。

【０２１７】

配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖である。

【０２１８】

配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２１９】

配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２２０】

配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ１である。

【０２２１】

配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ２である。

【０２２２】

配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の重鎖ＣＤＲ３である。

【０２２３】

配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ１である。

【０２２４】

配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ２である。

【０２２５】

配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（ＭＥＤＩ－０５６２）の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０２２６】

配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。

【０２２７】
配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。
【０２２８】
配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２２９】
配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２３０】
配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２３１】
配列番号１０２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２３２】
配列番号１０３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２３３】
配列番号１０４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２３４】
配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２３５】
配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２３６】
配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。
【０２３７】
配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。
【０２３８】
配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２３９】
配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２４０】
配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２４１】
配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２４２】
配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２４３】
配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２４４】
配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２で

ある。
【０２４５】
配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２４６】
配列番号１１７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域（$Ｖ_Ｈ$）である。
【０２４７】
配列番号１１８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域（$Ｖ_Ｌ$）である。
【０２４８】
配列番号１１９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２４９】
配列番号１２０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２５０】
配列番号１２１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２５１】
配列番号１２２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２５２】
配列番号１２３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２５３】
配列番号１２４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
【０２５４】
配列番号１２５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域（$Ｖ_Ｈ$）である。
【０２５５】
配列番号１２６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域（$Ｖ_Ｌ$）である。
【０２５６】
配列番号１２７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ１である。
【０２５７】
配列番号１２８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２である。
【０２５８】
配列番号１２９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３である。
【０２５９】
配列番号１３０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
【０２６０】
配列番号１３１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
【０２６１】

配列番号１３２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。

【０２６２】

配列番号１３３は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。

【０２６３】

配列番号１３４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。

【０２６４】

配列番号１３５は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替可溶性部分である。

【０２６５】

配列番号１３６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２６６】

配列番号１３７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２６７】

配列番号１３８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２６８】

配列番号１３９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２６９】

配列番号１４０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２７０】

配列番号１４１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２７１】

配列番号１４２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２７２】

配列番号１４３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（V_L）である。

【０２７３】

配列番号１４４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【０２７４】

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

【０２７５】

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

【０２７６】

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

【０２７７】

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

【０２７８】

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

【０２７９】
配列番号１５０は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２８０】
配列番号１５１は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２８１】
配列番号１５２は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２８２】
配列番号１５３は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２８３】
配列番号１５４は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２８４】
配列番号１５５は、ヒト化ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２８５】
配列番号１５６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。
【０２８６】
配列番号１５７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。
【０２８７】
配列番号１５８は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２８８】
配列番号１５９は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０２８９】
配列番号１６０は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０２９０】
配列番号１６１は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０２９１】
配列番号１６２は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９２】
配列番号１６３は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９３】
配列番号１６４は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９４】
配列番号１６５は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０２９５】
配列番号１６６は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０２９６】
配列番号１６７は、ＰＤ－１阻害剤ニボルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０２９７】
配列番号１６８は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０２９８】
配列番号１６９は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０２９９】
配列番号１７０は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３００】
配列番号１７１は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３０１】
配列番号１７２は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０２】
配列番号１７３は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０３】
配列番号１７４は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３０４】
配列番号１７５は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３０５】
配列番号１７６は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３０６】
配列番号１７７は、ＰＤ－１阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３０７】
配列番号１７８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
【０３０８】
配列番号１７９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
【０３０９】
配列番号１８０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
【０３１０】
配列番号１８１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
【０３１１】
配列番号１８２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３１２】
配列番号１８３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３１３】
配列番号１８４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。
【０３１４】
配列番号１８５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。
【０３１５】
配列番号１８６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。
【０３１６】

配列番号１８７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤デュルバルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３１７】

配列番号１８８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０３１８】

配列番号１８９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０３１９】

配列番号１９０は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０３２０】

配列番号１９１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０３２１】

配列番号１９２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３２２】

配列番号１９３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３２３】

配列番号１９４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３２４】

配列番号１９５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３２５】

配列番号１９６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３２６】

配列番号１９７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アベルマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３２７】

配列番号１９８は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０３２８】

配列番号１９９は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０３２９】

配列番号２００は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０３３０】

配列番号２０１は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０３３１】

配列番号２０２は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３３２】

配列番号２０３は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３３３】

配列番号２０４は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３３４】

配列番号２０５は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３３５】

配列番号２０６は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３３６】

配列番号２０７は、ＰＤ－Ｌ１阻害剤アテゾリズマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３３７】

配列番号２０８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０３３８】

配列番号２０９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０３３９】

配列番号２１０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０３４０】

配列番号２１１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０３４１】

配列番号２１２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３４２】

配列番号２１３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３４３】

配列番号２１４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３４４】

配列番号２１５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３４５】

配列番号２１６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３４６】

配列番号２１７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤イピリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３４７】

配列番号２１８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０３４８】

配列番号２１９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０３４９】

配列番号２２０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０３５０】

配列番号２２１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０３５１】

配列番号２２２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３５２】

配列番号２２３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３５３】

配列番号２２４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３５４】

配列番号２２５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３５５】

配列番号２２６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３５６】

配列番号２２７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤トレメリムマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３５７】

配列番号２２８は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。

【０３５８】

配列番号２２９は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【０３５９】

配列番号２３０は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【０３６０】

配列番号２３１は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【０３６１】

配列番号２３２は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３６２】

配列番号２３３は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３６３】

配列番号２３４は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの重鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３６４】

配列番号２３５は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ１アミノ酸配列である。

【０３６５】

配列番号２３６は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ２アミノ酸配列である。

【０３６６】

配列番号２３７は、ＣＴＬＡ－４阻害剤ザリフレリマブの軽鎖ＣＤＲ３アミノ酸配列である。

【０３６７】

配列番号２３８は、ＣＤ８ａ膜貫通ドメインである。

【０３６８】

配列番号２３９は、Ｂ７－１膜貫通細胞内ドメインである。

【０３６９】

配列番号２４０～２４５は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質において有用である例示的なグリシン－セリンリンカーである。

【０３７０】

配列番号２４６は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質において有用である例示的なリンカーである。

【０３７１】

配列番号２４７は、２Ａペプチド Ｃ末端配列である。

【０３７２】

配列番号２４８は、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチドである。

【０３７３】
配列番号２４９は、ウマ鼻炎Ａウイルス２Ａペプチドである。
【０３７４】
配列番号２５０は、口蹄疫ウイルス２Ａペプチドである。
【０３７５】
配列番号２５１は、例示的なフリン切断可能な２Ａペプチドである。
【０３７６】
配列番号２５２及び２５３は、ヒトＩｇＥシグナルペプチド配列である。
【０３７７】
配列番号２５４は、ヒトＩＬ－２シグナルペプチド配列である。
【０３７８】
配列番号２５５は、６×ＮＦＡＴ　ＩＬ－２最小プロモーターである。
【０３７９】
配列番号２５６は、ＮＦＡＴ応答性エレメントである。
【０３８０】
配列番号２５７は、ヒトＩＬ－２プロモーター配列である。
【０３８１】
配列番号２５８は、ヒトＩＬ－１５（Ｎ７２Ｄ変異体）である。
【０３８２】
配列番号２５９は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ－Ｓｕ／ＦｃドメインＩＬ－１５である。
【０３８３】
配列番号２６０は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ－Ｓｕ（６５ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０３８４】
配列番号２６１は、ヒトＩＬ－１５アイソフォーム２である。
【０３８５】
配列番号２６２は、ヒトＩＬ－１５アイソフォーム１である。
【０３８６】
配列番号２６３は、ヒトＩＬ－１５（シグナルペプチドを含まない）である。
【０３８７】
配列番号２６４は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ（８５ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０３８８】
配列番号２６５は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファ（１８２ａａ切断細胞外ドメイン）である。
【０３８９】
配列番号２６６は、ヒトＩＬ－１５Ｒ－アルファである。
【０３９０】
配列番号２６７は、ヒトＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットである。
【０３９１】
配列番号２６８は、ヒトＩＬ－１２ｐ４０サブユニットである。
【０３９２】
配列番号２６９は、ヒトＩＬ－１８である。
【０３９３】
配列番号２７０は、ヒトＩＬ－１８バリアントである。
【０３９４】
配列番号２７１は、ヒトＩＬ－２１である。
【０３９５】
配列番号２７２は、ヒトＩＬ－２である。
【０３９６】

配列番号２７３は、ヒトＣＤ４０Ｌである。
【０３９７】
配列番号２７４は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ソチガリマブ）である。
【０３９８】
配列番号２７５は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ソチガリマブ）である。
【０３９９】
配列番号２７６は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ソチガリマブ）である。
【０４００】
配列番号２７７は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ダセツズマブ）である。
【０４０１】
配列番号２７８は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ダセツズマブ）である。
【０４０２】
配列番号２７９は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ダセツズマブ）である。
【０４０３】
配列番号２８０は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（ルカツツズマブ）である。
【０４０４】
配列番号２８１は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（ルカツツズマブ）である。
【０４０５】
配列番号２８２は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（ルカツツズマブ）である。
【０４０６】
配列番号２８３は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＨ（セリクレルマブ）である。
【０４０７】
配列番号２８４は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ＶＬ（セリクレルマブ）である。
【０４０８】
配列番号２８５は、アゴニスト抗ヒトＣＤ４０　ｓｃＦｖ（セリクレルマブ）である。
【０４０９】
配列番号２８６は、標的ＰＤ－１配列である。
【０４１０】
配列番号２８７は、標的ＰＤ－１配列である。
【０４１１】
配列番号２８８は、反復ＰＤ－１左反復配列である。
【０４１２】
配列番号２８９は、反復ＰＤ－１右反復配列である。
【０４１３】
配列番号２９０は、反復ＰＤ－１左反復配列である。
【０４１４】
配列番号２９１は、反復ＰＤ－１右反復配列である。
【０４１５】
配列番号２９２は、ＰＤ－１左ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０４１６】
配列番号２９３は、ＰＤ－１右ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０４１７】
配列番号２９４は、ＰＤ－１左ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０４１８】
配列番号２９５は、ＰＤ－１右ＴＡＬＥＮヌクレアーゼ配列である。
【０４１９】
配列番号２９６は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０４２０】
配列番号２９７は、配列番号３３１のテザリングされたＩＬ－２１をコードする核酸配

列である。
【０４２１】
配列番号２９８は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５融合タンパク質及び配列番号３３１のテザリングされたＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。
【０４２２】
配列番号２９９は、配列番号３０３のテザリングされたＩＬ－１２融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。
【０４２３】
配列番号３００は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。
【０４２４】
配列番号３０１は、配列番号３３１のテザリングされたＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。
【０４２５】
配列番号３０２は、配列番号３２８のテザリングされたＩＬ－１５融合タンパク質及び配列番号３３１のテザリングされたＩＬ－２１融合タンパク質をコードする核酸配列である。核酸配列は、ＮＦＡＴプロモーターを含む。
【０４２６】
配列番号３０３は、例示的なテザリングされたＩＬ－１２（テザリングされたＩＬ－１２－Ｌｒ１－Ａｒ２）のアミノ酸配列である。
【０４２７】
配列番号３０４は、配列番号３０３のテザリングされたＩＬ－１２をコードする核酸配列である。
【０４２８】
配列番号３０５は、例示的なテザリングされたＩＬ－１８（テザリングされたＩＬ－１８－Ｌｒ１－Ａｒ２）のアミノ酸配列である。
【０４２９】
配列番号３０６は、配列番号３０５のテザリングされたＩＬ－１８をコードする核酸配列である。
【０４３０】
配列番号３０７は、例示的なテザリングされたバリアントＩＬ－１８（テザリングされたＤＲ－ＩＬ－１８（６－２７バリアント）－Ｌｒ１－Ａｒ２）のアミノ酸配列である。
【０４３１】
配列番号３０８は、配列番号３０７のテザリングされたバリアントＩＬ－１８をコードする核酸配列である。
【０４３２】
配列番号３０９は、例示的なテザリングされたＩＬ－１２／ＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４３３】
配列番号３１０は、配列番号３０９のテザリングされたＩＬ－１２／ＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０４３４】
配列番号３１１は、例示的なテザリングされたＩＬ－１８／ＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４３５】
配列番号３１２は、配列番号３１１のテザリングされたＩＬ－１８／ＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０４３６】
配列番号３１３は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）

のアミノ酸配列である。
【０４３７】
配列番号３１４は、配列番号３１３のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）をコードする核酸配列である。
【０４３８】
配列番号３１５は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）のアミノ酸配列である。
【０４３９】
配列番号３１６は、配列番号３１５のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）をコードする核酸配列である。
【０４４０】
配列番号３１７は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）のアミノ酸配列である。
【０４４１】
配列番号３１８は、配列番号３１７のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）をコードする核酸配列である。
【０４４２】
配列番号３１９は、例示的なテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）のアミノ酸配列である。
【０４４３】
配列番号３２０は、配列番号３１９のテザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）をコードする核酸配列である。
【０４４４】
配列番号３２１は、配列番号２７３のＣＤ４０Ｌをコードする核酸配列である。
【０４４５】
配列番号３２２は、例示的なテザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４４６】
配列番号３２３は、配列番号３１１のテザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０４４７】
配列番号３２４は、例示的なテザリングされたＩＬ－２のアミノ酸配列である。
【０４４８】
配列番号３２５は、配列番号３１３のテザリングされたＩＬ－２をコードする核酸配列である。
【０４４９】
配列番号３２６は、例示的なテザリングされたＩＬ－１２のアミノ酸配列である。
【０４５０】
配列番号３２７は、配列番号３１５のテザリングされたＩＬ－１２をコードする核酸配列である。
【０４５１】
配列番号３２８は、例示的なテザリングされたＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４５２】
配列番号３２９は、配列番号３１７のテザリングされたＩＬ－１５をコードする核酸配列である。
【０４５３】
配列番号３３０は、ＧＦＰをコードする核酸配列である。
【０４５４】
配列番号３３１は、例示的なテザリングされたＩＬ－２１のアミノ酸配列である。
【０４５５】

配列番号３３２は、ＮＩＺ９８５のヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４５６】
配列番号３３３は、ＮＩＺ９８５のヒト可溶性ＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸配列である。
【０４５７】
配列番号３３４は、ＸｍＡｂ３０６の鎖１のアミノ酸配列である。
【０４５８】
配列番号３３５は、ＸｍＡｂ３０６の鎖２のアミノ酸配列である。
【０４５９】
配列番号３３６は、Ｎ－８０３のＩＬ－１５Ｎ７２Ｄのアミノ酸配列である。
【０４６０】
配列番号３３７は、Ｎ－８０３のＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃのアミノ酸配列である。
【０４６１】
配列番号３３８は、ＣＹＰ０１５０のヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４６２】
配列番号３３９は、ＣＹＰ０１５０のヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列である。
【０４６３】
配列番号３４０は、ＣＹＰ０１５０のヒトＩＬ－１５Ｒα　ｓｕｓｈｉ及びヒンジドメインのアミノ酸配列である。
【０４６４】
配列番号３４１は、ＢＪ－００１の腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃのアミノ酸配列である。
【０４６５】
Ｉ．定義
他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じである。本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。
【０４６６】
本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与すること」、「同時（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ）」、及び「同時（ｃｏｎｃｕｒｒｅｎｔ）」という用語は、対象への２つ以上の医薬品有効成分（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のＴＩＬ）の投与を包含し、医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物の両方が、対象において同時に存在するようにする。同時投与には、別々の組成物での同時投与、別々の組成物での異なる時間での投与、または２つ以上の有効な薬学的成分が存在する組成物での投与が含まれる。別々の組成物での同時投与及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。
【０４６７】
「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。
【０４６８】
「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイには、生きている細胞または死んでいる細胞が用いられる細胞ベースのアッセイが包含され、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも包含され得る。
【０４６９】
「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または臓器に対する治療または処置の実施を伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／または臓器は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。
【０４７０】
「急速拡張」という用語は、１週間の期間にわたって少なくとも約３倍（または４、５、６、７、８、もしくは９倍）、より好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１０倍（または２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、もしくは９０倍）、あるいは最も好ましくは１週間の期間にわたって少なくとも約１００倍の抗原特異的ＴＩＬの数の

増加を意味する。本明細書では、いくつかの急速拡張プロトコルが、説明されている。本明細書では、いくつかの急速拡張プロトコルが、説明されている。

【０４７１】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察される拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、バルクＴＩＬ及び拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」または「ｐｏｓｔ－ＲＥＰ　ＴＩＬ」）が含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬ細胞集団には、遺伝子修飾ＴＩＬが含まれ得る。

【０４７２】

本明細書における「細胞の集団」（ＴＩＬを含む）とは、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。一般に、集団は、概して、１×１０^{6}～１×１０^{10}の数の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は、異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での一次ＴＩＬの初期成長は、およそ１×１０^{8}細胞のバルクＴＩＬの集団をもたらす。ＲＥＰ拡張は、一般に、注入用の１．５×１０^{9}～１．５×１０^{10}細胞の集団を提供するために行われる。

【０４７３】

本明細書における「凍結保存されたＴＩＬ」とは、一次、バルク、または拡張（ＲＥＰ　ＴＩＬ）のいずれかのＴＩＬが、約－１５０℃～－６０℃の範囲で処理及び保存されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法は、実施例を含む本明細書の他の場所にも記載されている。明確にするために、「凍結保存されたＴＩＬ」は、一次ＴＩＬのソースとして使用される可能性のある凍結組織試料と区別することができる。

【０４７４】

本明細書における「解凍された凍結保存ＴＩＬ」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度またはＴＩＬが患者に投与され得る温度を含むがこれらに限定されない、室温以上に戻るように処理されたＴＩＬの集団を意味する。

【０４７５】

ＴＩＬは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。ＴＩＬは、一般に、ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲαβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１、及びＣＤ２５のうちの１つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。

【０４７６】

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

【０４７７】

「セントラルメモリーＴ細胞」という用語は、ヒトではＣＤ４５Ｒ０＋であり、ＣＣＲ７（ＣＣＲ７^{高}）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２^{高}）を構成的に発現するＴ細胞のサブセット

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

【０４７８】

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

【０４７９】

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

【０４８０】

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

【０４８１】

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

【０４８２】

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

【０４８３】

「抗ＣＤ３抗体」という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、抗体またはそのバリアント、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。抗ＣＤ３抗体には、Ｔ３及びＣＤ３εとしても知られるＵＨＣＴ１クローンも含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブが含まれる。

【０４８４】

「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）という用語は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを指し、

市販の形態、例えば、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、ＭＡＣＳ ＧＭＰ ＣＤ３ ｐｕｒｅ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びムロモナブ、またはそれらのバリアント、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、またはバイオシミラーを含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、表１に示す（配列番号１及び配列番号２）。ＯＫＴ－３を生成することができるハイブリドーマは、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎに寄託され、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を生成することができるハイブリドーマは、Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＥＣＡＣＣ）にも寄託され、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。

【０４８５】

【表１】

表１．ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なＯＫＴ－３抗体）。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号１ ムロモナブ重鎖	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号２ ムロモナブ軽鎖	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

【０４８６】

「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）という用語は、インターロイキン－２として知られるＴ細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリアントを含む、ＩＬ－２のすべての形態を含む。ＩＬ－２は、例えば、Ｎｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７２，３９８３－８８及びＭａｌｅｋ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，４５３－７９に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－２のアミノ酸配列を、表２に示す（配列番号３）。例えば、ＩＬ－２という用語は、アルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ、単回使用バイアル当たり２２００万ＩＵで複数の供給業者から市販されている）などのヒト組換えＩＬ－２形態、ならびにＣｅｌｌＧｅｎｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｐｏｒｔｓｍｏｕｔｈ，ＮＨ，ＵＳＡ（ＣＥＬＬＧＲＯ ＧＭＰ）またはＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡによって市販されている組換えＩＬ－２形態（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、およそ１５ｋＤａの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えＩＬ－２形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を、表２に示す（配列番号４）。ＩＬ－２という用語はまた、ペグ化ＩＬ２プロドラッグベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４、平均６個のリジン残基が［（２，７－ビス｛［メチルポリ（オキシエチレン）］カルバモイル｝－９Ｈ－フルオレン－９－イル）メトキシ］カルボニル）で置換されたＮ^{6}である、配列番号４のようなペグ化ヒト組換えＩＬ－２）を含む、本明細書に記載のＩＬ－２のペグ化形態も包含し、Ｎｅｋｔａｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から入手可能であるか、または国際特許出願公開第ＷＯ２０１８／１３２４９６Ａ１号の実施例１９に記載の方法、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０２７５１３３Ａ１号の実施例１に記載の方法など、当

該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンペガルデスロイキン（ＮＫＴＲ－２１４）及び他のペグ化ＩＬ－２分子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３２８７９１Ａ１号及び国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０６５０８６Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化ＩＬ－２の代替形態は、米国特許第４，７６６，１０６号、同第５，２０６，３４４号、同第５，０８９，２６１号、及び同第４，９０２，５０２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なＩＬ－２の配合物は、米国特許第６，７０６，２８９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４８７】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、Ｓｙｎｔｈｏｒｘ，Ｉｎｃ．から入手可能なＴＨＯＲ－７０７である。本発明での使用に好適なＴＨＯＲ－７０７及びＩＬ－２の追加の代替形態の調製ならびに特性は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０１８１２２０Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０３３０６０１Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン２（ＩＬ－２）複合体であり、アミノ酸残基の番号付けは、配列番号５に対応する。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｔ３７、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｒ３８及びＫ６４から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６１、Ｅ６２、及びＥ６８から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、Ｅ６２である。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、Ｋ３５、Ｔ３７、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｆ４２、Ｋ４３、Ｆ４４、Ｙ４５、Ｅ６１、Ｅ６２、Ｅ６８、Ｋ６４、Ｐ６５、Ｖ６９、Ｌ７２、及びＹ１０７から選択されるアミノ酸残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－プロパルギルエトキシ－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－　プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセ

リン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２複合体は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２受容体α（ＩＬ－２Ｒα）サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、ＩＬ－２Ｒαに対する結合親和性の約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、または９９％を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、３０倍、５０倍、１００倍、２００倍、３００倍、５００倍、１０００倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２とＩＬ－２Ｒαとの結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、ポリ（サッカライド）、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ＰＥＧを含む。いくつかの実施形態では、ＰＥＧは、直鎖状ＰＥＧまたは分岐状ＰＥＧである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、Ｆｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＩｇＧのＦｃ部分を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、ＸＴＥＮペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、複合部分は、単離及び精製ＩＬ－２ポリペプチドと直接的に結合される。いくつかの実施形態では、複合部分は、リンカーを介して単離及び精製されたＩＬ－２ポリペプチドと間接的に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマント試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）ＤＳＰ、３′３′－ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（ＤＴＳＳＰ）、ジスクシンイミジルスベラート（ＤＳＳ）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベラート（ＢＳ）、ジスクシンイミジルタータラート（ＤＳＴ）、ジスルホスクシンイミジルタータラート（スルホＤＳＴ）、エチレングリコビス（スクシンイミジルスクシネート）（ＥＧＳ）、ジスクシンイミジルグルタラート（ＤＳＧ）、Ｎ，Ｎ′－ジスクシンイミジルカーボナート（ＤＳＣ）、ジメチルアジピミデート（ＤＭＡ）、ジメチルピメリミデート（ＤＭＰ）、ジメチルスベリミデート（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３′－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）、１，４－

ジ－（３′－（２′－ピリジルジチオ）プロピオンアミド）ブタン（ＤＰＤＰＢ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ハロゲン化アリール含有化合物（ＤＦＤＮＢ）、例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンまたは１，３－ジフルオロ－４，６－ジニトロベンゼン、４，４′－ジフルオロ－３，３′－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）、ビス－［β－（４－アジドサリチルアミド）エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、ｏ－トルイジン、３，３′－ジメチルベンジジン、ベンジジン、α，α′－ｐ－ジアミノジフェニル、ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ′－エチレン－ビス（ヨードアセトアミド）、またはＮ，Ｎ′－ヘキサメチレンビス（ヨードアセトアミド）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ｓＰＤＰ）、長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＬＣ－ｓＰＤＰ）、水溶性長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（スルホ－ＬＣ－ｓＰＤＰ）、スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ｓＭＰＴ）、スルホスクシンイミジル－６－［α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ｓＭＰＴ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（ｓＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノベンゾエート（スルホ－ｓＩＡＢ）、スクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ｓＭＰＢ）、スルホスクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＭＰＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（ＧＭＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢ）、スクシンイミジル６－（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＸ）、スクシンイミジル　６－［６－（（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノイル）アミノ］ヘキサノエート（ｓｌＡＸＸ）、スクシンイミジル　４－（（（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニル　ヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）酪酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（Ｍ２Ｃ２Ｈ）、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンズアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’

－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ρ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ）、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ｐ－ニトロフェニルジアゾピルベート（ｐＮＰＤＰ）、ｐ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、１－（ρ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ｐ－アジドベンゾイルヒドラジド（ＡＢＨ）、４－（ρ－アジドサリチルアミド）ブチルアミン（ＡｓＢＡ）、またはｐ－アジドフェニルグリオキサール（ＡＰＧ）を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、ジペプチドリンカーを含む、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔ、Ｐｈｅ－Ｌｙｓ、Ｖａｌ－Ａｌａ、またはＶａｌ－Ｌｙｓを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、マレイミドカプロイル（ｍｃ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スペーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、ｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ＩＬ－２複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、本明細書に記載のＩＬ－２形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０１８１２２０Ａ１号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０３３０６０１Ａ１号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して少なくとも８０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｋ４３、Ｅ６２、Ｐ６５、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｅ６８、Ｙ４５、Ｖ６９、またはＬ７２の位置でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して１残基のＮ末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＩＬ－２Ｒアルファ鎖会合を欠いているが、中間親和性ＩＬ－２Ｒベーターガンマシグナル伝達複合体との正常な結合を保持している。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｋ４３、Ｅ６２、Ｐ６５、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｅ６８、Ｙ４５、Ｖ６９、またはＬ７２の位置でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｋ４３、Ｅ６２、Ｐ６５、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｅ６８、Ｙ４５、Ｖ６９

、またはＬ７２の位置でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む複合部分に共有結合したＮ６－アジドエトキシ－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含むＩＬ－２ポリペプチドを含む、ＩＬ－２複合体であり、ＩＬ－２ポリペプチドは、配列番号５に対して少なくとも９８％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ＡｚＫは、配列番号５内のアミノ酸位置に関して、Ｋ３５、Ｆ４２、Ｆ４４、Ｋ４３、Ｅ６２、Ｐ６５、Ｒ３８、Ｔ４１、Ｅ６８、Ｙ４５、Ｖ６９、またはＬ７２の位置でアミノ酸を置換する。

【０４８８】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ＡＬＫＳ－４２３０（配列番号６）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（^{60}ＧＧ^{61}）を介してヒトインターロイキン２断片（６２－１３２）と融合し、ペプチジルリンカー（^{133}ＧＳＧＧＧＳ^{138}）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖断片（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で生成され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン２断片（１－５９）、バリアント（Ｃｙｓ^{125}＞Ｓｅｒ^{51}）；Ｇ$_2$ペプチドリンカー（６０－６１）を介してヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（４－７４）－ペプチド（６２－１３２）と融合し、ＧＳＧ$_3$Ｓペプチドリンカー（１３３－１３８）を介してヒトインターロイキン２受容体α鎖（ＩＬ２Ｒサブユニットアルファ、ＩＬ２Ｒα、ＩＬ２ＲＡ）（１－１６５）－ペプチド（１３９－３０３）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞で生成され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン２（ＩＬ－２）（７５－１３３）－ペプチド［Ｃｙｓ^{125}（５１）＞Ｓｅｒ］－変異体（１－５９）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号６に示される。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：３１－１１６、１４１－２８５、１８４－２４２、２６９－３０１、１６６－１９７、または１６６－１９９、１６８－１９９または１６８－１９７（配列番号６の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号６の番号付けを使用する、Ｎ１８７、Ｎ２０６、Ｔ２１２。ネムバロイキンアルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のＩＬ－２は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２１／００３８６８４Ａ１号及び米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または少なくとも９０％の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号６で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、配列番号７のアミノ酸２４～４５２と少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリアント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他のＩＬ－２形態は、米国特許第１０，１８３，９７９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択で、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第２の融合パートナーと連結された第１の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第１の融合パートナーは、ＩＬ－１Ｒα、またはＩＬ－１Ｒαと少なくとも９８％のアミノ酸配列同一性を有し、ＩＬ－Ｒαの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第２の融合パートナーは、Ｆｃ領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号８、または配列番号８と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第２の融合パートナーとの第１の融

合パートナーの融合と比較して改善される。

【０４８９】

【表２】

表２．インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号３ 組換えヒトＩＬ－２ （ｒｈＩＬ－２）	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号４ アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号５ ＩＬ－２形態	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 133
配列番号６ ネムバロイキンアルファ	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE LKPLEEVLNL AQGSGGGSEL CDDDPPEIPE ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI CTG	60 120 180 240 300 303
配列番号７ ＩＬ－２形態	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
配列番号８ ムチンドメインポリペプチド	SESSASSDGP HPVITP	16
配列番号９ 組換えヒトＩＬ－４ （ｒｈＩＬ－４）	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号１０ 組換えヒトＩＬ－７ （ｒｈＩＬ－７）	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
配列番号１１ 組換えヒトＩＬ－１５ （ｒｈＩＬ－１５）	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
配列番号１２ 組換えヒトＩＬ－２１ （ｒｈＩＬ－２１）	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【０４９０】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なＩＬ－２形態は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２７０３３４Ａ１号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、Ｌ

ＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、ＶＨまたはＶＬのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させ、抗体は、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラスの軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラスの重鎖、配列番号３９を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号２９を含むＩｇＧクラス重鎖、配列番号３７を含むＩｇＧクラス軽鎖及び配列番号３８を含むＩｇＧクラス重鎖からなる群から選択されるＩｇＧクラスの重鎖及びＩｇＧクラスの軽鎖をさらに含む。

【０４９１】

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

【０４９２】

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

【０４９３】

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

【０４９４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＩＬ－２分子は、ＩＬ－２ムテインである。いくつかの事例では、ＩＬ－２ムテインは、Ｒ６７Ａ置換を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、配列番号１４または配列番号１５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ムテインは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２７０３３４Ａ１号の表１のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０４９５】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１６、配列番号１９、配列番号２２及び配列番号２５からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号７、配列番号１０、配列番号１３、及び配列番号１６からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１７、配列番号２０、配列番号２３、及び配列番号２６からなる群から選択されるＨＣＤＲ２からなる群から選択されるＨＣＤＲ１を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号１８、配列番号２１、配列番号２４、及び配列番号２７からなる群から選択されるＨＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は

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

【０４９６】

【表３－１】

表３：例示的なパリビズマブ抗体－ＩＬ－２移植タンパク質の配列

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号１３ ＩＬ－２	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
配列番号１４ ＩＬ－２ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号１５ ＩＬ－２ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号１６ ＨＣＤＲ１＿ ＩＬ－２	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
配列番号１７ ＨＣＤＲ２	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号１８ ＨＣＤＲ３	SMITNWYFDV 10
配列番号１９ ＨＣＤＲ１＿ ＩＬ－２カバット	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
配列番号２０ ＨＣＤＲ２カバッ	DIWWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号２１ ＨＣＤＲ３カバッ	SMITNWYFDV 10
配列番号２２ ＨＣＤＲ１＿ ＩＬ－２クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
配列番号２３ ＨＣＤＲ２クロチア	WWDDK 5
配列番号２４ ＨＣＤＲ３クロチア	SMITNWYFDV 10
配列番号２５ ＨＣＤＲ１＿ＩＬ－２　ＩＭＧＴ	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143
配列番号２６ HCDR2 IMGT	IWWDDKK 7
配列番号２７ HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12
配列番号２８ V_H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 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
配列番号２９ 重鎖	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480

【表３－２】

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

【０４９７】

「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）という用語は、インターロイキン４として知られるサイトカインを指し、これは、Ｔｈ２　Ｔ細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって生成される。ＩＬ－４は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２　Ｔ細胞への分化を調節する。Ｓｔｅｉｎｋｅ　ａｎｄ　Ｂｏｒｉｓｈ，Ｒｅｓｐｉｒ．Ｒｅｓ．２００１，２，６６－７０。ＩＬ－４によって活性化されると、Ｔｈ２　Ｔ細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のＩＬ－４を生成する。ＩＬ－４はまた、Ｂ細胞増殖及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現も刺激し、Ｂ細胞からのＩｇＥ及びIgG_1発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４は、ＰｒｏＳｐｅｃ－Ｔａｎｙ　ＴｅｃｈｎｏＧｅｎｅ　Ｌｔｄ．，Ｅａｓｔ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳＡ（カタログ番号ＣＹＴ－２１１）及びＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳＡ（ヒトＩＬ－１５組換えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＣＴＰ００４３）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を、表２に示す（配列番号９）。

【０４９８】

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

えタンパク質、カタログ番号Ｇｉｂｃｏ　ＰＨＣ００７１）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を、表２に示す（配列番号１０）。

【０４９９】

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

【０５００】

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

【０５０１】

「ＩＬ－１５Ｒアゴニスト」（本明細書では「ＩＬ－１５アゴニスト」とも称される）という用語は、ＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）β及び一般的なγ（γＣ）サブユニットに結合することによって、ＩＬ－１５シグナル伝達経路を活性化する分子を指す。ＩＬ－１５は、樹状細胞または他の細胞の表面上のＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒα）の膜結合αサブユニットとの複合体で提示され、この複合体は、ＮＫ、ＮＫＴまたはＴ細胞上で発現されるＩＬ－１５Ｒ　β及びγＣサブユニットと相互作用する、トランス提示機構を通じて機能する。Ｓｔｏｎｉｅｒ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｕｎｓ，Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｌｅｔｔ．２０１０，１２７，８５－９２を参照されたく、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＩＬ－１５アゴニストは、例えば、Ｗｕ，Ｊ　Ｍｏｌ　Ｇｅｎｅｔ　Ｍｅｄ．２０１３，７，８５に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、組換えＩＬ－１５分子であり得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、細胞表面上で提示されるＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα複合体、例えば、１つ以上のＦｃドメインに任意に連結された、ＩＬ－１５野生型または変異体（例えば、Ｎ７２Ｄ、Ｄ３０Ｎ、Ｅ６４Ｑ、Ｎ６５Ｄ）分子及びＩＬ－１５Ｒαの部分的または細胞外ドメイン、例えば、可溶性ＩＬ－１５Ｒα、ＩＬ－１５Ｒαのｓｕｓｈｉドメインなどを含むヘテロ二量体複合体または融合タンパク

質の模倣物であり得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、改変ＩＬ－１５分子、例えば、ＩＬ－１５変異体分子（例えば、Ｎ７２Ｄ、Ｄ３０Ｎ、Ｅ６４Ｑ、Ｎ６５Ｄ）、部位特異的グリコゾール化（複数可）を有するＩＬ－１５などであり得、改善された特徴、例えば、半減期の延長、ＩＬ－１５Ｒに対する親和性の増加などを有する。

【０５０２】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び健康状態の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。一般に、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次ＴＩＬまたは遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球）は、体重１ｋｇ当たり10^4～10^{11}細胞（例えば、体重１ｋｇ当たり10^5～10^6、10^5～10^{10}、10^5～10^{11}、10^6～10^{10}、10^6～10^{11}、10^7～10^{11}、10^7～10^{10}、10^8～10^{11}、10^8～10^{10}、10^9～10^{11}、または10^9～10^{10}細胞）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得ると述べられ得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物も、これらの投与量で複数回投与され得る。ＴＩＬ（場合によっては、遺伝子操作したＴＩＬを含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇ．Ｊ．ｏｆ Ｍｅｄ．１９８８，３１９，１６７６を参照）。特定の患者に最適な投薬量及び治療計画は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜に治療を調整することによって、医学分野の技術者によって容易に決定され得る。

【０５０３】

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

【０５０４】

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

【０５０５】

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

【０５０６】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施

形態では、ＴＩＬ集団が提供され得、患者は、本発明によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ２／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本発明による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【０５０７】

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

【０５０８】

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

【０５０９】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患のあらゆる治療を包含し、（ａ）疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象に疾患が生じるのを予防すること、（ｂ）疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び（ｃ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または１つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

【０５１０】

本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）」という用語は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、免疫阻害チェックポイントタンパク質の機能を阻害する任意の化合物を指す。本明細書で使用される場合、「免疫チェックポイントタンパク質」という用語は、当該技術分野におけるその一般的な意味を有し、Ｔ細胞によって発現される分子であって、シグナルを上昇させる（刺激性チェックポイント分子）か、またはシグナルを低下させる（阻害性チェックポイント分子）分子を指す。免疫チェックポイント分子は、当該技術分野では、ＣＴＬＡ－４及びＰＤ－１依存性経路と同様の免疫チェックポイント経路の要素を構成すると認識されている（例えば、Ｐａｒｄｏｌｌ，２０１２．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ Ｃａｎｃｅｒ １２：２５２－２６４、Ｍｅｌｌｍａｎ ｅｔ ａｈ，２０１１．Ｎａｔｕｒｅ ４８０：４８０－ ４８９を参照）。阻害性チェックポイント分子の例には、Ａ２ＡＲ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＤ２７７、ＩＤＯ、ＫＩＲ、ＶＩＳＴＡ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、

ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＣＢＬ－Ｂ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択されてもよい。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Ｂｌｏｏｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１８，ｉｎ　ｐｒｅｓｓに記載されている。別の実施例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【０５１１】

阻害には、機能の低下及び完全な遮断が含まれる。好ましい免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質を特異的に認識する抗体である。いくつかの免疫チェックポイント阻害剤が既知であり、これらの既知の免疫チェックポイントタンパク質阻害剤と同様に、（近い）将来、代替的な免疫チェックポイント阻害剤が開発され得る。免疫チェックポイント阻害剤としては、ペプチド、抗体、核酸分子、及び小分子が挙げられる。

【０５１２】

「骨髄非破壊的化学療法」、「骨髄非破壊的リンパ球枯渇」、「ＮＭＡＬＤ」、「ＮＭＡ　ＬＤ」、「ＮＭＡ－ＬＤ」、及び前述の任意のバリアントは、患者のリンパ性免疫細胞を枯渇させながら、患者の骨髄性免疫細胞の枯渇を回避するように設計された化学療法レジメンを示すために互換的に使用される。典型的には、患者は、本明細書に記載されるように、腫瘍浸潤リンパ球を患者に投与する前に、骨髄非破壊的化学療法の経過を受ける。

【０５１３】

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

【０５１４】

２つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「同一性パーセント」、及び「配列同一性パーセント」（もしくはそれらの同義語、例えば「９９％同一」）という用語は、同じであるか、または配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大一致のために比較し整列させた場合（必要に応じてギャップを導入する）、特定のパーセンテージの同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する２つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列同一性パーセントの決定に好適なプログラムには、例えば、米国政府の国立生物工学情報センターのＢＬＡＳＴウェブサイ

トから入手可能なＢＬＡＳＴプログラム一式が含まれる。２つの配列間の比較は、ＢＬＡＳＴＮまたはＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して実行することができる。ＢＬＡＳＴＮは、核酸配列を比較するために使用され、ＢＬＡＳＴＰは、アミノ酸配列を比較するために使用される。ＤＮＡＳＴＡＲから入手可能なＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、またはＭｅｇＡｌｉｇｎは、配列を整列させるために使用することができる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者であれば、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントに適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

【０５１５】

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

【０５１６】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。ＴＩＬには、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞（リンパ球）、Ｔｈ１及びＴｈ１７　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにＭ１マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。ＴＩＬには、一次ＴＩＬ及び二次ＴＩＬの両方が含まれる。「一次ＴＩＬ」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次ＴＩＬ」は、本明細書で考察されるように拡張または増殖された任意のＴＩＬ細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクＴＩＬ、拡張ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）、ならびに「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」が含まれるが、これらに限定されない。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡張ＴＩＬまたは第２の追加の拡張ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図８のステップＤに記載されているものなど）を含み得る。

【０５１７】

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

【０５１８】

「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然及び合成の、未修飾及び修飾デオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、及び／またはオリゴヌク

レオチド中のデオキシリボヌクレオチド間の結合への変更が含まれる。

【０５１９】

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

【０５２０】

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

【０５２１】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の１桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、なおより好ましくは１０％以内、さらにより好ましくは５％以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容偏差は、研究中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解され得る。さらに、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、ならびに他の量及び特徴が正確でなく、かつ正確である必要はないが、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、必要に応じて、およそであってもよく、及び／またはそれよりも大きくても小さくてもよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

【０５２２】

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

【０５２３】

「抗体」及びその複数形の「抗体」という用語は、免疫グロブリン全体及び任意の抗原

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

【０５２４】

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

【０５２５】

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

【０５２６】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）V_L、V_H、C_L、及びＣＨ１ドメインからなる一価断片である、Ｆａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された２つのＦａｂ断片を含む二価断片である、Ｆ（ａｂ′）２断片、（ｉｉｉ）V_H及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ

断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）V_HまたはV_Lドメインからなり得るドメイン抗体（ｄＡｂ）断片（Ｗａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８９，３４１，５４４－５４６）、ならびに（ｖｉ）単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。Ｆｖ断片の２つのドメイン、V_L及びV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Ｂｉｒｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　１９８８，２４２，４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１９８８，８５，５８７９－５８８３を参照）。かかるｓｃＦｖ抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、ｓｃＦｖタンパク質ドメインは、V_H部分及びV_L部分を含む。ｓｃＦｖ分子は、V_LドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_L－Ｌ－V_H、またはV_HドメインがｓｃＦｖ分子のＮ末端部分である場合、V_H－Ｌ－V_Lのいずれかとして示される。ｓｃＦｖ分子を作製し、好適なペプチドリンカーを設計するための方法は、米国特許第４，７０４，６９２号、米国特許第４，９４６，７７８号、Ｒ．Ｒａａｇ　ａｎｄ　Ｍ．Ｗｈｉｔｌｏｗ，“Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｈａｉｎ　Ｆｖｓ．”ＦＡＳＥＢ　Ｖｏｌ　９：７３－８０（１９９５）及びＲ．Ｅ．Ｂｉｒｄ　ａｎｄ　Ｂ．Ｗ．Ｗａｌｋｅｒ，Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｈａｉｎ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｖａｒｉａｂｌｅ　Ｒｅｇｉｏｎｓ，ＴＩＢＴＥＣＨ，Ｖｏｌ　９：１３２－１３７（１９９１）に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０５２７】

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

【０５２８】

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

【０５２９】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作成、または単離されるすべてのヒト抗体、例えば（ａ）ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下でさらに説明される）についてトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（マウスなど）から単離された抗体、（ｂ）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（ｃ）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、及び（ｄ）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のＤＮＡ配列にスプライシングすることを含む、任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワーク及びＣＤＲ領域がヒト生殖細胞系免疫グロブ

リン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトＩｇ配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され得、したがって、組換え抗体のＶ$_H$及びＶ$_L$領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系Ｖ$_H$及びＶ$_L$配列に由来し、関連しているが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に自然に存在しない可能性がある配列である。

【０５３０】

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

【０５３１】

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

【０５３２】

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

【０５３３】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、及び「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するＣＤＲ配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の１５超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク（ＦＲ）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的すべてを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　１９８６，３２１，５２２－５２５、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　１９８８，３３２，３２３－３２９、及びＰｒｅｓｔａ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１９９２，２，５９３－５９６を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能及び／またはＦｃＲ結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のＦｃバリアントを用いるように修飾され得る。Ｆｃバリアントは、例えば、国際特許出願公開第ＷＯ１９８８／０７０８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９６／１４３３９Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／０５７８７Ａ１号、同第ＷＯ１９９８／２３２８９Ａ１号、同第ＷＯ１９９９／５１６４２Ａ１号、同第ＷＯ９９／５８５７２Ａ１号、同第ＷＯ２０００／０９５６０Ａ２号、同第ＷＯ２０００／３２７６７Ａ１号、同第ＷＯ２０００／４２０７２Ａ２号、同第ＷＯ２００２／４４２１５Ａ２号、同第ＷＯ２００２／０６０９１９Ａ２号、同第ＷＯ２００３／０７４５６９Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０１６７５０Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０２９２０７Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０３５７５２Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０６３３５１Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０７４４５５Ａ２号、同第ＷＯ２００４／０９９２４９Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０４０２１７Ａ２号、

同第ＷＯ２００５／０７０９６３Ａ１号、同第ＷＯ２００５／０７７９８１Ａ２号、同第ＷＯ２００５／０９２９２５Ａ２号、同第ＷＯ２００５／１２３７８０Ａ２号、同第ＷＯ２００６／０１９４４７Ａ１号、同第ＷＯ２００６／０４７３５０Ａ２号、及び同第ＷＯ２００６／０８５９６７Ａ２号、ならびに米国特許第５，６４８，２６０号、同第５，７３９，２７７号、同第５，８３４，２５０号、同第５，８６９，０４６号、同第６，０９６，８７１号、同第６，１２１，０２２号、同第６，１９４，５５１号、同第６，２４２，１９５号、同第６，２７７，３７５号、同第６，５２８，６２４号、同第６，５３８，１２４号、同第６，７３７，０５６号、同第６，８２１，５０５号、同第６，９９８，２５３号、及び同第７，０８３，７８４号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか１つを含み得る。

【０５３４】

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

【０５３５】

「二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（V_H-V_LまたはV_L-V_H）中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の２つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、２つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第ＥＰ４０４，０９７号、国際特許公開第ＷＯ９３／１１１６１号、及びＢｏｌｌｉｇｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９３，９０，６４４４－６４４８においてより完全に記載されている。

【０５３６】

「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グリコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、１つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、１つ以上のアミノ酸置換を行い、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第５，７１４，３５０号及び同第６，３５０，８６１号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させる可能性がある。加えてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分ＧｌｃＮａｃ構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を生成する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８（アルファ（１，６）フコシルトランスフェラーゼ）を欠く。Ｍｓ７０４、Ｍｓ７０５、及びＭｓ７０９ ＦＵＴ８－／－細胞株は、２つの置換ベクターを使用したＣＨＯ／ＤＧ４４細胞中のＦＵＴ８遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第２００４／０１１０７０４号またはＹａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，２００４，８７，６１４－６２２を参照）。別の例として、欧州特許第ＥＰ１，１７６，１９５号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ１，６結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のＦｃ領域に結合するＮ－アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素

活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株ＹＢ２／０（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６６２）についても説明している。国際特許公開第ＷＯ０３／０３５８３５号は、フコースをＡｓｎ（２９７）結合型炭水化物に結合させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリアントＣＨＯ細胞株、Ｌｅｃ　１３細胞について説明している（Ｓｈｉｅｌｄｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００２，２７７，２６７３３－２６７４０も参照）。国際特許公開第ＷＯ９９／５４３４２号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示し、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす、細胞株について記載している（Ｕｍａｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９９９，１７，１７６－１８０も参照）。代替的に、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を使用して、切断され得る。例えば、フコシダーゼアルファ－Ｌ－フコシダーゼは、Ｔａｒｅｎｔｉｎｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９７５，１４，５５１６－５５２３に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

【０５３７】

「ペグ化」は、１つ以上のＰＥＧ基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、ＰＥＧの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（ＰＥＧ）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性ＰＥＧ分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$）アルコキシ－もしくはアリールオキシ－ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール－マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されているＰＥＧの形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第ＥＰ０１５４３１６号及び同第ＥＰ０４０１３８４号、ならびに米国特許第５，８２４，７７８号（各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

【０５３８】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照生物学的生成物と非常に類似しており、生成物の安全性、純度、及び効力に関して生物学的生成物と参照生成物との間に臨床的に意味のある差異がない、生物学的生成物を意味する。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。生物学的生成物またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照ＩＬ－２タンパク質がアルデスロイキン（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ）である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁（ＥＭＡ）によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正されたＲｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ　７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ　２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ（ＥＣ）Ｎｏ　７２６／２００４の第６条及びＤｉｒｅｃｔｉｖｅ　２００１／８３／ＥＣの第１０（４）条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得

る。既に認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称され得る。バイオシミラーとみなされる生成物に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関するＣＨＭＰガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む生成物固有のガイドラインは、ＥＭＡによって生成物毎に提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、ＥＭＡによって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品（ＥＥＡ認可されていない「コンパレーター」）と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究及びインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、ＥＥＡ認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合部分）、及び融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾（例えば、アミノ酸の欠失、付加、及び／または置換を含む）を有するアミノ酸配列を有し得る。バイオシミラーは、その参照医薬品のアミノ酸配列に対して９７％以上、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性及び／または有効性の変化をもたらさないならば、１つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。加えて、バイオシミラーは、医薬品の安全性及び有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、配合物、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（ＰＫ）及び／または薬力学的（ＰＤ）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、ＥＭＡなどの規制当局によって類似の生物学的生成物としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

【０５３９】

ＩＩ．腫瘍採取からの凍結保存されたＴＩＬ調製物の作製

本明細書で提供される本発明のいくつかの実施形態は、患者が免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）及び／または標準的なケア処置を受ける前に、がん患者から採取された腫瘍試料から凍結保存されたＴＩＬ調製物を作製する方法に関する。

【０５４０】

いくつかの実施形態では、患者は、腫瘍採取及び凍結保存後にＩＣＩ処置（本明細書に記載の抗免疫チェックポイント抗体など）を受ける。

【０５４１】

いくつかの実施形態では、患者は、腫瘍採取及び凍結保存後に、がんの標準的なケア治療を受ける。本明細書に記載の治療方法のいくつかは、標準的なケア治療を患者に施すことを含む。本明細書で使用される場合、「標準的なケア治療」は、特定のタイプの患者、疾患または臨床状況に対して適切、受け入れられ、及び／または広く使用されるように、医師によって認識される薬物、または薬物、放射線療法、手術、または他の医療介入の組み合わせを含む治療プロセスである。異なる種類のがんを治療するための標準的なケア治療は、当業者によって周知である。例えば、米国の２１の主要がんセンターの同盟である全米総合がんセンターネットワーク（ＮＣＣＮ）は、ＮＣＣＮ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ ｉｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（ＮＣＣＮ ＧＵＩＤＥＬＩＮＥＳ（登録商標））を発行し、多種多様ながんの標準的なケア治療に関する詳細な最新情報を提供している（ＮＣＣＮ ＧＵＩＤＥＬＩＮＥＳ（登録商標）、２０１３を参照）。いくつかの実施形態では、標準的なケア治療は、化学療法、放射線療法、手術、標的療法、またはそれらの任意の組み合わせである。

【０５４２】

いくつかの実施形態では、患者または対象からの凍結保存された腫瘍採取物は、患者がＩＣＩ及び／または標準的なケア治療で治療された後にＴＩＬ集団を作製するために使用され、がんの進行を示す。いくつかの実施形態では、腫瘍採取物の凍結保存後、患者または対象は、ＩＣＩ及び／または標準的なケア治療を受け、がんの進行についてモニタリングされる。いくつかの実施形態では、がんの進行は、自己ＴＩＬ療法の必要性を示す。

【０５４３】

他の実施形態では、患者または対象からの腫瘍採取物の凍結保存は、がんの進行の前に完了する。

【０５４４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、患者（ｐａｅｔｉｎｔ）が進行性疾患を発症しない場合、またはそれ以外の場合、将来的にＴＩＬ療法のために示される場合に、ＴＩＬ産生のコストを回避するという形態で薬学的経済的利点を提供する。

【０５４５】

患者が、凍結保存のステップの少なくとも約１週間、２週間、３週間、１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、６カ月、７カ月、８カ月、９カ月、１０カ月、１１カ月、１２カ月、１３カ月、１４カ月、１５カ月、１６カ月、１７カ月、１８カ月、１９カ月、２０カ月、２１カ月、２２カ月、２３カ月、２４カ月、２５カ月、２６カ月、２７カ月、２８カ月、２９カ月、３０カ月、３１カ月、３２カ月、３３カ月、３４カ月、３５カ月、３６カ月後に進行性疾患を示す、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。

【０５４６】

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

【０５４７】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８ｍｍ^{3}の小片に

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

【０５４８】

いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物は、将来の使用のために保存される。いくつかの実施形態では、腫瘍採取の凍結保存は、前進行を完了する。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物の作製後、患者は、ＩＣＩ及び／または標準的なケア治療の上または後に進行性疾患の発現についてモニタリングされる。いくつかの実施形態では、患者は、ＩＣＩ及び／または標準的なケア治療の中または後に進行性癌を示し、自己ＴＩＬ療法に適応される。いくつかの実施形態では、進行後、凍結保存されたＴＩＬ調製物を解凍し、以下のセクションに記載の拡張方法に従って拡張する。

【０５４９】

いくつかの実施形態では、患者は、ＮＳＣＬＣ癌患者である。いくつかの実施形態では、患者は、ＮＳＣＬＣに罹患しているか、罹患しているか、またはＮＳＣＬＣに罹患しやすい。いくつかの実施形態では、患者は、転移性ＮＳＣＬＣを有する。いくつかの実施形態では、患者は、転移性ステージＩＶ ＮＳＣＬＣを有する。

【０５５０】

いくつかの実施形態では、対象または患者は、

ｉ．＜１％のＰＤ－Ｌ１の所定の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）、

ｉｉ．１％～４９％のＰＤ－Ｌ１のＴＰＳスコア、または

ｉｉｉ．１つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも１つを有する。

【０５５１】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、１つ以上の作用可能なドライバー変異を有しない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される作用可能なドライバー変異には、ＥＧＦＲ変異、ＥＧＦＲ挿入、ＥＧＦＲエクソン２０、ＫＲＡＳ変異、ＢＲＡＦ変異、ＢＲＡＦ Ｖ６００Ｅ変異、ＢＲＡＦ Ｖ６００Ｋ変異、ＢＲＡＦ Ｖ６００変異、ＡＬＫ変異、ｃ－ＲＯＳ変異（ＲＯＳ１変異）、ＲＯＳ１融合、ＲＥＴ変異、ＲＥＴ融合、ＥＲＢＢ２変異、ＥＲＢＢ２増幅、ＢＲＣＡ変異、ＭＡＰ２Ｋ１変異、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＰＴＥＮ変異、ＵＭＤ変異、ＮＲＡＳ変異、ＫＲＡＳ変異、ＮＦ１変異、ＭＥＴ変異、ＭＥＴスプライス、及び／または変化したＭＥＴシグナル伝達、ＴＰ５３変異、ＣＲＥＢＢＰ変異、ＫＭＴ２Ｃ変異、ＫＭＴ２Ｄ変異、ＡＲＩＤ１Ａ変異、ＲＢ１変異、ＡＴＭ変異、ＳＥＴＤ２変異、ＦＬＴ３変異、ＰＴＰＮ１１変異、ＦＧＦＲ１変異、ＥＰ３００変異、ＭＹＣ変異、ＥＺＨ２変異、ＪＡＫ２変異、ＦＢＸＷ７変異、ＣＣＮＤ３変異、及びＧＮＡ１１変異が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜１％のＴＰＳを示し、１つ以上のドライバー変異の所定の非存在を有する。

【０５５２】

いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、すべてのがん治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、患者は、標的療法にナイーブである。いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、ＩＣＩ治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、抗ＶＥＧＦ（例えば、アバスチン／ベバシズマブ）治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、化学療法治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、前述の治療のうちの２つ以上の組み合わせにナイーブである。

【０５５３】

いくつかの実施形態では、凍結保存ＴＩＬ調製物が作製されるとき、患者は、すべてのがん治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、患者は、標的療法にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存ＴＩＬ調製物が作製されるとき、患者は、ＩＣＩ治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存ＴＩＬ調製物が作製されるとき、患者は、抗ＶＥＧＦ（例えば、アバスチン／ベバシズマブ）治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存ＴＩＬ調製物が作製されるとき、患者は、化学療法治療にナイーブである。いくつかの実施形態では、凍結保存されたＴＩＬ調製物が作製されるとき、患者は、前述の治療のうちの２つ以上の組み合わせにナイーブである。

【０５５４】

いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、維持療法を受けている。いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者の維持療法は、中断される。いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、維持療法の中断後に休薬期間にあり、続いて、維持療法または異なる療法が再開する。いくつかの実施形態では、維持療法は、腫瘍試料が患者から採取された後に再開される。いくつかの実施形態では、がん（ＮＳＣＬＣなど）は、維持療法の最中または後に処理される。

【０５５５】

いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、がんのための第一選択の（１Ｌ）ＩＣＩ及び／または標準療法を受けることになる。

【０５５６】

いくつかの実施形態では、腫瘍が採取されるとき、患者は、がんのための第二選択の（２Ｌ）ＩＣＩ及び／または標準療法を受けることになる。

【０５５７】

いくつかの実施形態では、患者の採取された腫瘍試料は、急速冷凍方法または制御された速度の冷凍を使用して凍結保存される。例示的な急速冷凍方法及び制御された速度の冷凍方法は、国際特許公開第ＷＯ／２０２０／０６１４２９号に見出すことができ、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０５５８】

いくつかの実施形態では、本発明の急速冷凍方法は、

（ｉ）腫瘍組織を断片化することと、

（ｉｉ）凍結保存培地中で断片をインキュベートすることと、

（ｉｉｉ）冷凍が、液体窒素の気相を使用して急速冷凍することである、断片を冷凍することと、を含む。

【０５５９】

ある実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～約６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。好ましい実施形態では、ほぼ球状の断片は、約６ｍｍの直径を有する。ある実施形態では、ほぼ球形の断片は、約３ｍｍの直径を有する。

【０５６０】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも１．５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～６ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。ある実施形態では、概して立方形の断片は、約６ｍｍのエッジ長を有する。ある実施形態では、概して立方体の断片は、約３ｍｍのエッジ長を有する。

【０５６１】
いくつかの実施形態では、組織試料は、腫瘍組織から非腫瘍組織を分離するようにトリミングされる。
【０５６２】
いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、解剖された腫瘍に由来する。実施形態では、腫瘍組織は、腫瘍生検に由来する。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、切開生検に由来する。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、切除生検に由来する。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、１つ以上のコア針生検からのものであり得る。
【０５６３】
いくつかの実施形態では、新鮮な腫瘍組織は、約１．５ｍｍ×１．５ｍｍ、約２ｍｍ×２ｍｍ、約２．５ｍｍ×２．５ｍｍ、約３ｍｍ×３ｍｍ、約３．５ｍｍ×３．５ｍｍ、約４ｍｍ×４ｍｍ、約４．５ｍｍ×４．５ｍｍ、約５ｍｍ×５ｍｍ、約５．５ｍｍ×５．５ｍｍ、または約６ｍｍ×約６ｍｍの断面を有する断片にトリミングされる。
【０５６４】
ある実施形態では、腫瘍組織は、１２時間未満である。ある実施形態では、腫瘍組織は、８時間未満である。実施形態では、腫瘍組織は、３時間未満、２時間未満、または１時間未満である。
【０５６５】
本開示を考慮して、当業者に知られている任意の好適な凍結保存培地を、本明細書に記載の方法で使用することができる。好適な凍結保存培地の例には、ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌ（登録商標）、またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯ～約１５％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約３％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約４％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約５％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約６％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約７％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約８％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約９％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１０％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１１％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１３％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１４％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１５％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも１つの抗菌剤を含む。本開示を考慮して、当業者に知られている任意の好適な抗菌剤を、本明細書に記載の方法で使用することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも５０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも４０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも３０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも２０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。
【０５６６】
いくつかの実施形態では、腫瘍断片を、凍結保存培地中で約２０分～約７０分間インキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍断片を、凍結保存培地中で約３０分～約６０分間インキュベートする。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、少なくとも１０分、少なくとも２０分、少なくとも２５分、少なくとも３０分、少なくとも３５分、少なくとも４０分、少なくとも４５分、少なくとも５０分、少なくとも５５分、少なく

とも６０分、または少なくとも７０分である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、約１０分、約２０分、約２５分、約３０分、約３５分、約４０分、約４５分、約５０分、約５５分、約６０分、または約７０分である。いくつかの実施形態では、インキュベーションは、１０分未満、２０分未満、２５分未満、３０分未満、３５分未満、４０分未満、４５分未満、５０分未満、５５分未満、６０分未満、または７０分未満である。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、腫瘍断片密度に比例する。いくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、腫瘍断片の表面対体積比に比例する。

【０５６７】

いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約２℃～約８℃の温度で凍結保存媒体中でインキュベートされる。

【０５６８】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、生理学的に緩衝された等張生理食塩水溶液で洗浄される。いくつかの実施形態では、洗浄は、各々、少なくとも３分の３回の連続洗浄を含み、生理学的に緩衝された等張生理食塩水が、各連続洗浄の後に置き換えられる。いくつかの実施形態では、生理学的に緩衝された等張生理食塩水溶液は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的に緩衝された等張生理食塩水は、トリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的に緩衝された等張生理食塩水溶液は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、生理学的に緩衝された等張生理食塩水溶液は、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）を含む。いくつかの実施形態では、１つの連続洗浄中の生理学的に緩衝された等張生理食塩水溶液は、他の連続洗浄のうちの１つ以上で使用されるものとは異なる生理学的に緩衝された等張生理食塩水溶液であり得る。

【０５６９】

ある実施形態では、冷凍は、約－１２５℃～約－１９６℃の範囲の温度で行われる。ある実施形態では、冷凍は、約－１４０℃～約－１８５℃の範囲の温度で行われる。ある実施形態では、冷凍は、約－１４０℃～約－１７５℃の範囲の温度で行われる。ある実施形態では、冷凍は、約－１４５℃の温度で行われる。いくつかの実施形態では、冷凍は、液体窒素の気相中で行われる。

【０５７０】

当該技術分野で公知である問題は、冷凍プロセス中に細胞または組織を損傷することなく凍結保存することである。理論に拘束されることなく、冷凍中の損傷の１つの源は、細胞内氷核形成であり、細胞破裂をもたらす。Ｍｕｌｄｒｅｗ及びＭｃＧａｎｎは、“Ｔｈｅ ｏｓｍｏｔｉｃ ｒｕｐｔｕｒｅ ｈｙｐｏｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｆｒｅｅｚｉｎｇ ｉｎｊｕｒｙ”，Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ，６６：５３２－４１（１９９４）で、細胞、特に全組織凍結保存に関するこの公知であり、広く認識されている困難の定量理論を概説している。Ａｃｋｅｒ及びＭｃＧａｎｎは、後の記事“Ｍｅｍｂｒａｎｅ ｄａｍａｇｅ ｏｃｃｕｒｓ ｄｕｒｉｎｇ ｔｈｅ ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｉｃｅ，” Ｃｒｙｏ Ｌｅｔｔｅｒ，２２：２４１－５４（２００１）で、細胞内氷の形成及び細胞損傷の基本的なメカニズムをさらに開発する。

【０５７１】

解凍時に、組織が実質的に生理学的構造を失ったか、または組織を構成する細胞が実質的に生存能を失った、冷凍中の損傷が検出される。生存率は、成長させる、または正常な細胞機能のマーカーを示すような細胞の数と比較して、培養培地に導入された細胞の割合によって決定され得る。生存細胞の割合を特定するための多数の方法、例えば、限定されないが、トリパンブルー色素排除などの染料排除試験が、当該技術分野で既知である。例えば、ｈｔｔｐｓ：／／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１００２／０４７１１４２７３５．ｉｍａ０３ｂｓ２１で得られる、Ｓｔｒｏｂｅｒ，Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｏｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００１、別表３Ｂを参照されたい。限定されないが、生存率はまた、ＭＴＴアッセイなどの代謝活性アッセイによって決定されてもよく、ＭＴＴ、３－（４，５－ジ

メチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミドは、細胞酵素によってホルマザンに代謝される。この酵素反応は、黄色のＭＴＴを紫色のホルマザンに変換する。例えば、Ｂｅｒｒｉｄｇｅ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ ｄｙｅｓ ａｓ ｔｏｏｌｓ ｉｎ ｃｅｌｌ ｂｉｏｌｏｇｙ：ｎｅｗ ｉｎｓｉｇｈｔｓ ｉｎｔｏ ｔｈｅｉｒ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖｉｅｗ，１１：１２７－１５２（２００５）、Ｍｏｓｍａｎｎ，“Ｒａｐｉｄ ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ ａｓｓａｙ ｆｏｒ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｇｒｏｗｔｈ ａｎｄ ｓｕｒｖｉｖａｌ：ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ ａｓｓａｙｓ，”Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ６５（１－２）：５５－６３（１９８３）を参照されたい。

【０５７２】

理論に拘束されることなく、徐冷は、無害な細胞内氷を生成すると仮定されており、Ａｃｋｅｒ ａｎｄ ＭｃＧａｎｎ，“Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ ｅｆｆｅｃｔ ｏｆ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｉｃｅ ｄｕｒｉｎｇ ｆｒｅｅｚｉｎｇ？”Ｃｒｙｏｂｉｏｌｏｇｙ，４６（２）：１９７－２０２（２００３）を参照されたい。過度の細胞損傷なしに冷凍を達成する、または細胞生存能を著しく低下させることなく冷凍を達成する従来のアプローチは、遅い冷凍速度を採用することであった。Ｗａｔｓｏｎらの米国特許第５，８９１，６１７号は、このアプローチを強調し、例えば、請求項１のステップ（ｃ）は、「約－０．３℃／分以下」という非常に遅い冷却速度を教示する。同様に、Ｃｏｍｈａｉｒｅらの米国特許第９，９３８，４９５号は、幹細胞について「解凍後の高い細胞生存率は、ＤＭＳＯフリーの凍結保存培地を使用してゆっくり冷凍することによって得られた」と教示している。

【０５７３】

これらの例示的な教示に基づいて、本開示の方法及び製品は驚くべきものであり、予想外である。さらに、実施例及びその中のデータを含む本開示は、治療用の腫瘍浸潤リンパ球の製造における使用のために、腫瘍組織、腫瘍断片、または腫瘍標本を迅速かつ効率的に凍結保護する問題に対する技術的解決策を実証する。

【０５７４】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の製造のための腫瘍組織の凍結保存方法は、少なくとも－１３０℃未満の温度で冷凍した断片を保存するステップ（ｉｖ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、冷凍した断片は、液体窒素の気相中に保管される。いくつかの実施形態では、冷凍した断片は、液体窒素に浸されて保管される。いくつかの実施形態では、凍結保存された断片は、自己治療的使用のためのＴＩＬの後の製造のために保管される。

【０５７５】

いくつかの実施形態では、本開示は、制御された速度の冷凍／遅い冷凍方法を使用して腫瘍組織を凍結保存するための方法を本明細書で提供する。

【０５７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに凍結保存された腫瘍組織であって、

（ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加するステップと、

（ｉｉ）制御された速度の冷凍装置中で閉鎖可能な容器を予備冷却するステップと、

（ｉｉｉ）腫瘍組織を断片化して、腫瘍断片を取得するステップと、

（ｉｖ）凍結保存培地を含む閉鎖可能な容器中に、腫瘍断片を配置し、容器を閉鎖するステップと、

（ｖ）任意選択で、腫瘍断片及び凍結保存培地を含む密閉容器をインキュベートするステップと、

（ｖｉ）制御された速度の冷凍装置中で容器を緩慢冷凍するステップと、

（ｖｉｉ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含む、プロセスによって調製される、凍結保存された腫瘍組織を提供する。

【０５７７】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに凍結保存された腫瘍組織であって、
（ｉ）凍結保存培地を含む予備冷却した閉鎖可能な容器中に、腫瘍組織を断片化することから取得された腫瘍断片を配置し、容器を閉鎖するステップと、
（ｉｉ）任意選択で、腫瘍断片及び凍結保存培地を含む密閉容器をインキュベートするステップと、
（ｉｉｉ）制御された速度の冷凍装置中で容器を緩慢冷凍するステップと、
（ｉｖ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含む、プロセスによって調製される、凍結保存された腫瘍組織を提供する。
【０５７８】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに凍結保存された腫瘍組織であって、
（ｉ）凍結保存培地を含む予備冷却した閉鎖可能な容器中に、酵素培地中で腫瘍組織を消化することから取得された腫瘍消化物または腫瘍組織を断片化することから産生された腫瘍断片を配置し、容器を閉鎖するステップと、
（ｉｉ）任意選択で、腫瘍消化物及び凍結保存培地を含む密閉容器をインキュベートするステップと、
（ｉｉｉ）制御された速度の冷凍装置中で容器を緩慢冷凍するステップと、
（ｉｖ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含む、プロセスによって調製される、凍結保存された腫瘍組織を提供する。
【０５７９】
いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍組織を凍結保存するための方法、ならびに凍結保存された腫瘍組織であって、
（ｉ）閉鎖可能な容器に凍結保存培地を添加するステップと、
（ｉｉ）制御された速度の冷凍装置中で閉鎖可能な容器を予備冷却するステップと、
（ｉｉｉ）酵素培地中で腫瘍組織を消化して、腫瘍消化物を取得するステップと、
（ｉｖ）閉鎖可能な容器中の凍結保存培地中に、腫瘍消化物を配置し、容器を閉鎖するステップと、
（ｖ）任意選択で、腫瘍消化物及び凍結保存培地を含む密閉容器をインキュベートするステップと、
（ｖｉ）制御された速度の冷凍装置中で容器を緩慢冷凍するステップと、
（ｖｉｉ）容器を液体窒素冷凍庫に移すステップと、を含む、プロセスによって調製される、凍結保存された腫瘍組織を提供する。
【０５８０】
本開示を考慮して、当業者に知られている任意の好適な凍結保存培地を、本明細書に記載の方法で使用することができる。好適な凍結保存培地の例には、ＣｒｙｏＳｔｏｒ（登録商標）ＣＳ１０、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌ（登録商標）、またはこれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯ～約１５％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約２％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約３％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約４％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約５％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約６％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約７％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約８％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約９％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１０％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１１％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１２％ｖ／

ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１３％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１４％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、約１５％ｖ／ｖ　ＤＭＳＯを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも１つの抗菌剤を含む。本開示を考慮して、当業者に知られている任意の好適な抗菌剤を、本明細書に記載の方法で使用することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも５０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも４０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも３０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、少なくとも２０μｇ／ｍＬの濃度でゲンタマイシンを含む。

【０５８１】

本開示を考慮して、当業者に知られている任意の好適な閉鎖可能な容器を、本明細書に記載の方法で使用することができる。好適な閉鎖可能な容器の例には、キャップ付き微小遠心分離機チューブ、蓋付き微小遠心分離機チューブ、及び低温検体保管バイアルが含まれるが、これらに限定されない。「極低温試料保管バイアル」という用語は、容器を低温（－８０℃以下であることを意味し、任意選択で、液体窒素に浸すか、または約－１９６℃の温度で液体窒素の上の気相に懸濁させることができる）で安全かつ確実に保管することができる、閉鎖された、密封された、または再閉鎖可能な容器（例えば、ねじキャップまたは摩擦密封スナップキャップを有する）を含む、極低温試料保管バイアル、低温容器、極低温チューブなどの用語を含むことを意味する。一般的にポリエチレンまたはポリプロピレンから製造されるキャップ付きまたは蓋付きのマイクロ遠心分離機チューブ及びクライオバイアルは、極低温試料保管バイアルとして使用されることが多い。

【０５８２】

いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約８５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約８５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約７５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約６５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約５０％～約５５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約６０％～約８５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約６０％～約７５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約６０％～約６５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約７０％～約８５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約７０％～約７５％の体積で凍結保存培地で満たされる。いくつかの実施形態では、閉鎖可能な容器は、約８０％～約８５％の体積で凍結保存培地で満たされる。

【０５８３】

いくつかの実施形態では、予備冷却ステップは、閉鎖可能な容器を、約－８０℃～約８℃の温度で、少なくとも約５分～約８時間の期間、制御された速度の冷凍装置中に配置することを含む。いくつかの実施形態では、予備冷却ステップは、約－８０℃、約－７９℃、約－７８℃、約－７７℃、約－７６℃、約－７５℃、約－７０℃、約－６５℃、約－６０℃、約－５５℃、約－５０℃、約－４５℃、約－４０℃、約－３５℃、約－３０℃、約－２５℃、約－２０℃、約－１５℃、約－１０℃、約－５℃、約０℃、約１℃、約２℃、約３℃、約４℃、約５℃、約６℃、約７℃、約８℃、または少なくとも約５分、少なくとも約１０分、少なくとも約１５分、少なくとも約２０分、少なくとも約２５分、少なくとも約３０分、少なくとも約３５分、少なくとも約４０分、少なくとも約４５分、少なくとも約５０分、少なくとも約５５分、少なくとも約１時間、少なくとも約１．５時間、少なくとも約２時間、少なくとも約３時間、少なくとも約４時間、約５時間、少なくとも約６時間、少なくとも約７時間、少なくとも約８時間、またはそれ以上の期間、制御された速

度の冷凍装置中に配置することを含む。

【０５８４】

いくつかの実施形態では、腫瘍断片及び凍結保存培地を含む密閉容器を、制御された速度の冷凍装置中に容器を緩慢冷凍する前に、約３０～６０分間、約２～８℃の温度でインキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍断片及び凍結保存媒体を含む容器を、制御された速度の冷凍装置中に容器を緩慢冷凍する前に、約５分間、約１０分間、約１５分間、約２０分間、約２５分間、約３０分間、約３５分間、約４０分間、約４５分間、約５０分間、約５５分間、約６０分間、またはそれ以上の期間、約２℃、約３℃、約４℃、約５℃、約６℃、約７℃、約８℃、またはその間の任意の温度でインキュベートする。

【０５８５】

本開示を考慮して、当業者に知られている任意の好適な制御された速度の冷凍装置を、本明細書に記載の方法で使用することができる。好適な制御された速度の冷凍装置の例には、Ｃｏｒｎｉｎｇ　ＣｏｏｌＣｅｌｌ（商標）装置またはＮａｌｇｅｎｅ　Ｍｒ．Ｆｒｏｓｔｙ（商標）装置が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置は、約－０．１℃／分～約－１０℃／分の速度で冷却する、ＩＰＡフリーの制御された速度の冷凍装置である。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置は、約－０．１℃／分～約－１０℃／分、約－０．２℃／分～約－５℃／分、約－０．５℃／分～約－２．５℃／分、約－１℃／分～約－２℃／分の速度で冷却する、ＩＰＡフリーの制御された速度の冷凍装置である。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置は、約－１℃／分の速度で冷却する、ＩＰＡフリーの制御された速度の冷凍装置である。

【０５８６】

いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置のすべては、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置の９０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置の８０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置の７０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置の６０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置の５０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。いくつかの実施形態では、制御された速度の冷凍装置の位置の４０％以上は、凍結保存培地を含有する閉鎖可能な容器で満たされる。

【０５８７】

本明細書で使用される「緩慢冷凍方法」という用語は、液体窒素などで最終的に凍結保存する前に、試料を冷却環境で制御された速度で冷却するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、冷却速度は、約－０．１℃／分～約－１０℃／分、約－０．２℃／分～約－５℃／分、約－０．５℃／分～約－２．５℃／分、約－１℃／分～約－２℃／分である。いくつかの実施形態では、冷却速度は、約－１℃／分である。いくつかの実施形態では、冷却環境は、約－９０℃～約－７０℃、例えば、約－９０℃、約－８９℃、約－８８℃、約－８７℃、約－８６℃、約－８５℃、約－８４℃、約－８３℃、約－８２℃、約－８１℃、約－８０℃、約－７９℃、約－７８℃、約－７７℃、約－７６℃、約－７５℃、約－７４℃、約－７３℃、約－７２℃、約－７１℃、約－７０℃、またはその間の任意の温度、もしくはドライアイスなどの間に設定された－８０℃の冷凍庫である。

【０５８８】

いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－７０℃～約－９０℃の温度でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－７５℃～約－８５℃の温度でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－７８℃～約－８０℃の温度でインキュベートすることを含む。いくつか

の実施形態では、緩慢冷凍することは、ドライアイスを含む制御された速度の冷凍装置をインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を－８０℃の冷凍庫中でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、ドライアイス中で制御された速度の冷凍装置をインキュベートすることを含む。

【０５８９】

いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－８０℃の温度で約３～５時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－８０℃の温度で約３時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－８０℃の温度で約４時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、緩慢冷凍することは、制御された速度の冷凍装置を約－８０℃の温度で約５時間インキュベートすることを含む。

【０５９０】

いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約８０％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約７５％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約７０％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約６５％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約６０％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約５５％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約５０％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約４５％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約４０％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約３５％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約３０％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約２５％の解凍後の生存率を有する。いくつかの実施形態では、凍結からの回復後、細胞は、少なくとも約２０％の解凍後の生存率を有する。本開示を考慮して、当該技術分野で知られている解凍後の生存率を測定または決定するための任意の好適な方法は、本明細書に記載の方法で使用することができる。

【０５９１】

いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ　１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプＸＩＶ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【０５９２】

ＩＩＩ．遺伝子編集プロセス

Ａ．概要：ＴＩＬ拡張＋遺伝子編集

本発明の実施形態では、ＴＩＬ集団を拡張するための方法に関し、本方法は、それらの治療効果を増強するために、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、ＤＮＡが細胞のゲノム内で永続的に修飾され、例えば、ＤＮＡが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、ＤＮＡ配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）または阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）させる。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は、ＴＩＬの治療的集団の有効性を増強するために使用される。本発明の例示的な遺伝子編集プロセス／方法、ならびに遺伝子編集されたＴＩＬ産物はまた、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２２／１４４２５号、米国仮出願第６３／３０４，４９８号及び同第６３／２４２，３７３号に見出すことができ、これらのすべてが、すべての関連する目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０５９３】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態に従って実行することができ、本方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。さらなる実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団のＴＩＬに拡張するための方法は、米国特許第１０，５１７，８９４号、米国特許出願公開第２０２０／０１２１７１９　Ａ１号、または米国特許第１０，８９４，０６３号（これらは参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載される方法のうちのいずれかの実施形態に従って実行され、本方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本明細書に記載される任意の実施形態に従って拡張される治療的ＴＩＬ集団を提供し、治療的集団の少なくとも一部は、遺伝子編集されており、例えば、注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部は、永続的に遺伝子編集される。

【０５９４】

ＴＩＬ集団を拡張するための方法を対象とする本発明のいくつかの実施形態では、本方法は、（ｉ）培養物中で拡張するときのサイトカインへの依存性の低減及び／または（ｉｉ）治療効果の増強を伴って、修飾されたＴＩＬを産生するために、免疫調節タンパク質、例えば、膜アンカーに融合した免疫調節タンパク質を含む免疫調節融合タンパク質の一過性発現のために、ＴＩＬ核酸、例えば、ｍＲＮＡの少なくとも一部に導入する１つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「一過性遺伝子編集（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｇｅｎｅ－ｅｄｉｔｉｎｇ）」、「一過性遺伝子編集（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｇｅｎｅ ｅｄｉｔｉｎｇ）」、「一過性表現型改変（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ）」、「一過性表現型修飾（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」、「一時的表現型改変（ｔｅｍｐｏｒａｒｙ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ）」、「一時的表現型修飾（ｔｅｍｐｏｒａｒｙ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」、「一過性細胞変化（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｃｈａｎｇｅ）」、「一過性細胞修飾（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」、「一時的細胞改変（ｔｅｍｐｏｒａｒｙ ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ）」、「一時的細胞修飾（ｔｅｍｐｏｒａｒｙ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」、「一過性発現（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）」、「発現の一過性改変（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）」、「タンパク質発現の一過性改変（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）」、「一過性修飾（ｔｒａｎｓｉｅｎｔ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）」、「一過性表現型改変（ｔｒａｎｓｉｔｏｒｙ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ）」、「非永続的表現型改変（ｎｏｎ－ｐｅｒｍａｎｅｎｔ ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ ａｌｔｅｒａｔｉｏｎ）」、「一過性に修飾された（ｔｒａｎｓｉｅｎｔｌ

ｙ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ）」、「一時的に修飾された（ｔｅｍｐｏｒａｒｉｌｙ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ）」、「非永続的に修飾された（ｎｏｎ－ｐｅｒｍａｎｅｎｔｌｙ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ）」、「一過性に改変された（ｔｒａｎｓｉｅｎｔｌｙ　ａｌｔｅｒｅｄ）」、「一時的に改変された（ｔｅｍｐｏｒａｒｉｌｙ　ａｌｔｅｒｅｄ）」、前述のうちのいずれかの文法的な変化、及び同様の意味の任意の発現は、核酸（例えば、ｍＲＮＡ）が、細胞表面上での膜アンカーされた免疫調節融合タンパク質の一過性表示などの細胞内での一過性または非永久的な表現型の変化をもたらすために、細胞内に導入される、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム輸送、ウイルス導入などによる細胞への核酸の移入、細胞内に発現される（例えば、膜アンカーに融合された免疫調節タンパク質を含む免疫調節融合タンパク質などの免疫タンパク質を発現する）、一種類の細胞修飾または表現型の変化を指す。本発明の実施形態によれば、一過性表現型改変技術は、培養物中のＴＩＬの拡張におけるサイトカインへの依存を低減する、及び／または治療的ＴＩＬ集団の有効性を増強するために使用される。

【０５９５】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、本明細書に提供される免疫調節融合タンパク質をコードする核酸の細胞内送達のために使用される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。ＳＱＺプラットフォームは、Ｔ細胞を含む様々な一次ヒト細胞に核酸及びタンパク質を送達することができる（Ｓｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　２０１３、ならびにＳｈａｒｅｉ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬＯＳ　ＯＮＥ　２０１５及びＧｒｅｉｓｂｅｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　ｖｏｌ．１９５，２０１５）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を細胞内に送達することを可能にする。国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、または同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第２０１８／０２０１８８９Ａ１号、または同第２０１８／０２４５０８９Ａ１号（参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるような方法は、対象の免疫調節融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に送達するために本発明とともに用いることができる。いくつかの実施形態では、送達された核酸は、修飾されたＴＩＬにおける免疫調節融合タンパク質の一過性のタンパク質発現を可能にする。いくつかの実施形態では、ＳＱＺプラットフォームは、免疫調節融合タンパク質をコードする送達核酸をＴＩＬ細胞ゲノムに安定的に組み込むために使用される。ＳＱＺプラットフォーム及びその使用に関する追加の例示的な開示は、国際特許出願公開第ＷＯ／２０１９／１３６４５６号に見出すことができ、これはすべての目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０５９６】

Ａ．ＴＩＬ拡張中の遺伝子編集／一過性表現型改変のタイミング

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及

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

（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｇ）ステップ（ｆ）の注入バッグへの移行前の方法中の任意の時点で、ＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０５９７】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集されたＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行され得る。いくつかの実施形態では、遺伝子編集のための核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬに送達される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０５９８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１のＴＩＬ拡張ステップの後に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１のＴＩＬ拡張ステップの後及び第２の拡張ステップの前に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬが活性化された後に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張ステップの後、及びＴＩＬが活性化された後、しかし第２の拡張ステップの前に実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張ステップの後及びＴＩＬが活性化された後に実行され、ＴＩＬは、遺伝子編集の後及び第２の拡張ステップの前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴ

ニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０５９９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、レンチウイルス形質導入によって実行される。

【０６００】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、

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

（ｆ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

【０６０１】

（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含む。

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後、及び第２の拡張ステップの前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０６０２】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０６０３】

他の実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２及び任意選択でＯＫＴ－３（例えば、ＯＫＴ－３は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～

１４日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得し、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団であり、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）ステップ（ｄ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、
（ｆ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｇ）ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前の方法中の任意の時点で、ＴＩＬ細胞の少なくとも一部に一過性表現型改変を導入して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、一過性表現型改変のための核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬに送達される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６０４】

上記の実施形態のステップ（ｇ）に記載されるように、一過性表現型改変プロセスは、ステップ（ｆ）における注入バッグへの移送前のＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、一過性表現型改変が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、一過性修飾プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が、ＴＩＬ細胞の表面上で免疫調節組成物を発現するように一過的に改変される。いくつかの実施形態では、一過性細胞修飾プロセスは、ＴＩＬを活性化し、活性化されたＴＩＬに対して一過性表現型改変ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って修飾されたＴＩＬを拡張することによって、拡張の前に実行され得る。

【０６０５】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、一過性細胞修飾プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える拡張を含み得、第３または第４の拡張中にＴＩＬに対して一過性細胞修飾が実施され得ることなどが可能である。

【０６０６】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第１

のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、遺伝子編集は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【０６０７】

いくつかの実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の集団、第２の集団、及び第３の集団のうちの１つ以上からのＴＩＬ上で実行される。例えば、一過性細胞修飾は、第１のＴＩＬ集団上で、または第１の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらの一過的に修飾されたＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。代替的に、一過性細胞修飾は、第２もしくは第３の集団からのＴＩＬ上で、または第２もしくは第３の集団から収集されたＴＩＬの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらの修飾されたＴＩＬをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、一過性遺伝子修飾は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、一過性細胞修飾をもたらすために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【０６０８】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０６０９】

他の実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の拡張からのＴＩＬ、または第２の拡張からのＴＩＬ、またはその両方で実行される。例えば、第１の拡張または第２の拡張中に、一過性細胞修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、一過性細胞修飾プロセスの後、それらの修飾されたＴＩＬは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０６１０】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０６１１】

他の実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、第１の拡張後及び第２の拡張前にＴＩＬの少なくとも一部上で実行される。例えば、第１の拡張後に、一過性細胞修飾は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され得、一過性細胞修飾プロセスの後、それらの修飾されたＴＩＬは、その後、例えば、それらを第２の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【０６１２】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、

最中、もしくは後）に実行される。

【０６１３】

代替実施形態によれば、一過性細胞修飾プロセスは、ステップ（ｃ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｂ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｄ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｃ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（ｅ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｄ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（ｆ）の前（例えば、ステップ（ａ）～（ｅ）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【０６１４】

ＯＫＴ－３に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＯＫＴ－３を含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＯＫＴ－３に曝露した後にＴＩＬ上で実行される。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＯＫＴ－３を含み、ＯＫＴ－３が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【０６１５】

４－１ＢＢアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始する４－１ＢＢを含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中で４－１ＢＢに曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢアゴニストを含み、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地中に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中に４－１ＢＢアゴニストを含み、４－１ＢＢアゴニストが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【０６１６】

ＩＬ－２に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（０日目）、または第１の拡張の１日目に開始するＩＬ－２を含んでもよく、その結果、遺伝子編集または一過性細胞修飾は、０日目及び／または１日目に細胞培養培地中でＩＬ－２に曝露した後にＴＩＬ上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。代替的に、細胞培養培地は、第１の拡張中及び／または第２の拡張中にＩＬ－２を含み、ＩＬ－２が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集または一過性細胞修飾が実行される。

【０６１７】

上述のように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、ＯＫＴ－３は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または４－１ＢＢアゴニストは、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはＩＬ－２は、第１の拡張の０日目または１日目に開始する細胞培地中に含まれる。他の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニストを含む。他の実施例によれば、細胞培養培地は、第１の拡張の０日目または１日目に開始するＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト、及びＩＬ－２を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、ＯＫＴ－３、４－１ＢＢアゴニスト及びＩＬ－２のうちの１つ以上を、拡張プロセス中の１つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

【０６１８】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張

するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～２日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を活性化することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、活性化することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、
（ｆ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後、及び第２の拡張ステップ前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、

免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０６１９】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６２０】

他の実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６２１】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０６２２】
いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの遺伝子エディターが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６２３】

他の実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６２４】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの遺伝子エディターが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６２５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６２６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後、及び第２の拡張ステップ前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）

生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０６２７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６２８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～

７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ細胞の表面上に免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む免疫調節組成物を発現させることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後及び第２の拡張ステップ前に静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、遺伝子編集ステップ後、及び第２の拡張ステップ前に、約１～２日間静置される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、約２日間の抗ＣＤ３アゴニスト及び抗ＣＤ２８アゴニストへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニストは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体であり、抗ＣＤ２８アゴニストは、抗ＣＤ２８アゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体は、ＯＫＴ－３である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズへの曝露によって活性化される。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３アゴニスト抗体及び抗ＣＤ２８アゴニスト抗体コンジュゲートビーズは、ＭｉｌｔｅｎｙｉのＴｒａｎｓＡｃｔ（商標）生成物である。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレトロウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、任意選択で、約２日間、ＴＩＬのレンチウイルス形質導入によって実行される。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－１５を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２１を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、２つ以上の異なる膜結合融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で免疫調節組成物を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下でＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＮＦＡＴプロモーターの制御下で、ＩＬ－１５を含む第１の免疫調節融合タンパク質及びＩＬ－２１を含む第２の免疫調節融合タンパク質を発現するように遺伝子編集される。

【０６２９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０６３０】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に送達される少なくとも１つの核酸分子が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０６３１】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６３２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６３３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６３４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ

－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０６３５】
いくつかの実施形態では、前述の方法のうちのいずれかは、第４のＴＩＬ集団を培養するステップが、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生するステップと、
（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬを提供するステップとで置き換えられるように修正される。
【０６３６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６３７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６３８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６３９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法

を提供する。
【０６４６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６４９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６５８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６６３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６６４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６６５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６６６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０６６７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【０６６８】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。
【０６６９】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカー（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）に融合された免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６７０】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６７１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第２のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、
第２のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０６７２】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０６７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０６９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうち

のいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０６９９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７００】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７０１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７０２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７０３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７０４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７０５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７０６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７０７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７０８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７０９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を第１の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちの

いずれかに記載の方法を提供する。

【０７１７】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ））第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０７１８】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ））第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節

剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０７１９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０７２０】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌ

またはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【０７２１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ））第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０７２２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ））第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、

本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０７２３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの遺伝子エディターの移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０７２４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、少なくとも１つの核酸分子を第３のＴＩＬ集団の細胞の一部に移入させ、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含み、

第３のＴＩＬ集団の細胞の一部への少なくとも１つの核酸分子の移入が、その一部における複数の細胞を修飾して、細胞の表面上に免疫調節組成物を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【０７２５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第３の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第４の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０７２６】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を第１の培養培地中で培養するステップにおいて、第１の培養培地は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体をさらに含む。

【０７２７】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体は、第１の培養培地中にＯＫＴ－３を含む。

【０７２８】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップにおいて、第２の培養培地は、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体をさらに含む。

【０７２９】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体は、第２の培養培地中にＯＫＴ－３を含む。

【０７３０】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法は、凍結保存培地を使用して採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地はジメチルスルホキシド系凍結保存培地である。他の実施形態では、凍結保存培地は、ＣＳ１０である。

【０７３１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約２～３日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約３～４日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。

【０７３３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約２日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に

記載の方法を提供する。
【０７３４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の培養培地中で培養するステップが約３日間行われるように、該当する場合に修正された、上記の任意の前段落に記載の方法を提供する。
【０７３５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で培養するステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７３６】
いくつかの実施形態では、本発明は、該当する場合に第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、または１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７３７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７３８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７３９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１４～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７４６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７４９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７５８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の

細胞培養培地中で培養するステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７５９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７７１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７７９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７８０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７８１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７８２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７８３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の

細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【０７９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０７９９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８００】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８０１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を第２または第３の細胞培養培地中で培養するステップが、約１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【０８０２】
いくつかの実施形態によれば、前述の方法のうちのいずれかを使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたＴＩＬ集団を提供することができる。
【０８０３】
Ｂ．ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮノックダウン
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
【０８０４】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【０８０５】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｆ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬを提供することと、を含む。

【０８０６】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬを提供することと、を含む。

【０８０７】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間、約３～８日間、約４～８日間、約５～８日間、約６～８日間、約７～８日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約３～５日間、約４～５日間、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態で

は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。

【０８０８】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間、約１～６日間、約２～６日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約１～５日間、約２～５日間、約３～５日間、約４～５日間、約１～４日間、約２～４日間、約３～４日間、約１～３日間、約２～３日間、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約７日間行われる。

【０８０９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間、約６～１５日間、約７～１５日間、約８～１５日間、約９～１５日間、約１０～１５日間、約１１～１５日間、約１２～１５日間、約１３～１５日間、約１４～１５日間、約５～１４日間、約６～１４日間、約７～１４日間、約８～１４日間、約９～１４日間、約１０～１４日間、約１１～１４日間、約１２～１４日間、約１３～１４日間、約５～１３日間、約６～１３日間、約７～１３日間、約８～１３日間、約９～１３日間、約１０～１３日間、約１１～１３日間、約１２～１３日間、約５～１２日間、約６～１２日間、約７～１２日間、約８～１２日間、約９～１２日間、約１０～１２日間、約１１～１２日間、約５～１１日間、６～１１日間、７～１１日間、約８～１１日間、約９～１１日間、約１０～１１日間、約５～１０日間、６～１０日間、７～１０日間、約８～１０日間、約９～１０日間、約５～９日間、６～９日間、７～９日間、約８～９日間、約５～８日間、約６～８日間、７～８日間、約５～７日間、約６～７日間、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１５日間行われる。

【０８１０】

いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは

、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３１日の期間内で完了する。

【０８１１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、増加した数のＴＩＬが提供される。

【０８１２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団

を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８１９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－

２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８２９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８３０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８３１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８３２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８３３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８３４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８３５】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８３６】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８３７】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８３８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８３９】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８４０】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８４１】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団

を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８４８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）、（ａ）～（ｆ）、または（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）、（ａ）～（ｆ）、または（ａ）～（ｇ）のうちのいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編

集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【０８４９】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｅ）、（ａ）～（ｆ）、または（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０８５０】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【０８５１】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【０８５２】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【０８５３】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間、約３～８日間、約４～８日間、約５～８日間、約６～８日間、約７～８日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約３～５日間、約４～５日間、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を５日間培養するステップ。いくつかの実施形態では、第１のＴＩ

Ｌ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。

【０８５４】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間、約６～１５日間、約７～１５日間、約８～１５日間、約９～１５日間、約１０～１５日間、約１１～１５日間、約１２～１５日間、約１３～１５日間、約１４～１５日間、約５～１４日間、約６～１４日間、約７～１４日間、約８～１４日間、約９～１４日間、約１０～１４日間、約１１～１４日間、約１２～１４日間、約１３～１４日間、約５～１３日間、約６～１３日間、約７～１３日間、約８～１３日間、約９～１３日間、約１０～１３日間、約１１～１３日間、約１２～１３日間、約５～１２日間、約６～１２日間、約７～１２日間、約８～１２日間、約９～１２日間、約１０～１２日間、約１１～１２日間、約５～１１日間、６～１１日間、７～１１日間、約８～１１日間、約９～１１日間、約１０～１１日間、約５～１０日間、６～１０日間、７～１０日間、約８～１０日間、約９～１０日間、約５～９日間、６～９日間、７～９日間、約８～９日間、約５～８日間、約６～８日間、７～８日間、約５～７日間、約６～７日間、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１５日間行われる。

【０８５５】

いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２４日の期間内で完了する。

【０８５６】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団

を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８５７】

いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、第３のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８５８】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｄ）または（ａ）～（ｅ）のいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｄ）または（ａ）～（ｅ）のいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【０８５９】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｄ）または（ａ）～（ｅ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０８６０】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【０８６１】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、

（ｅ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組

み合わせて、拡張された数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。
【０８６２】
いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、
（ｆ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。
【０８６３】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３～９日間、約３～８日間、約４～８日間、約５～８日間、約６～８日間、約７～８日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約３～５日間、約４～５日間、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。
【０８６４】
いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日間、約２～７日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約１～６日間、約２～６日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約１～５日間、約２～５日間、約３～５日間、約４～５日間、約１～４日間、約２～４日間、約３～４日間、約１～３日間、約２～３日間、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。
【０８６５】
いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約３～５日間、約４～５日間、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステッ

プは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約７日間行われる。

【０８６６】

いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２３日の期間内で完了する。

【０８６７】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）または（ａ）～（ｆ）のいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）または（ａ）～（ｆ）のいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【０８６８】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｅ）または（ａ）～（ｆ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０８６９】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【０８７０】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【０８７１】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

【０８７２】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日間、約３～４日間、約２～３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。

【０８７３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５～１５日間、約６～１５日間、約７～１５日間、約８～１５日間、約９～１５日間、約１０～１５日間、約１１～１５日間、約１２～１５日間、約１３～１５日間、約１４～１５日間、約５～１４日間、約６～１４日間、約７～１４日間、約８～１４日間、約９～１４日間、約１０～１４日間、約１１～１４日間、約１２～１４日間、約１３～１４日間、約５～１３日間、約６～１３日間、約７～１３日間、約８～１３日間、約９～１３日間、約１０～１３日間、約１１～１３日間、約１２～１３日間、約５～１２日間、約６～１２日間、約７～１２日間、約８～１２日間、約９～１２日間、約１０～１２日間、約１１～１２日間、約５～１１日間、６～１１日間、７～１１日間、約８～１１日間、約９～１１日間、約１０～１１日間、約５～１０日間、６～１０日間、７～１０日間、約８～１０日間、約９～１０日間、約５～９日間、６～９日間、７～９日間、約８～９日間、約５～８日間、約６～８日間、７～８日間、約５～７日間、約６～７日間、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。いくつ

かの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１５日間行われる。

【０８７４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８７５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８７６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８７７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８７８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８７９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８８０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数

のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８１】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８２】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８５】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８６】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８７】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０８８９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間

の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０８９９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９００】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９０１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９０２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９０３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９０４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９０５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数

のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９０６】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９０７】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９０８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９０９】
いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。
【０９１０】
いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）のいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）のいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。
【０９１１】
拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意された

く、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０９１２】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【０９１３】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第４のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、

（ｆ）第４のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。

【０９１４】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む第２の細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を２～４日間培養して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約１～７日間培養して、第５のＴＩＬ集団の培養物を産生することと、

（ｇ）第５のＴＩＬ集団の培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を、ＩＬ－２を含む第３の細胞培養培地中で約３～７日間培養し、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬを含む第５のＴＩＬ集団を提供することと、を含む。

【０９１５】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第３のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２～４日間、約３～４日間、約２～３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を

培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。

【０９１６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１～７日間、約１～６日間、約２～６日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約１～５日間、約２～５日間、約３～５日間、約４～５日間、約１～４日間、約２～４日間、約３～４日間、約１～３日間、約２～３日間、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、約７日間行われる。

【０９１７】

いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約３～５日間、約４～５日間、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、複数のサブ培養物の各々を培養するステップは、約７日間行われる。

【０９１８】

いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。

【０９１９】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）のいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）のいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され

）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【０９２０】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０９２１】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【０９２２】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約３～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

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

【０９２３】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約３～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｃ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第２の細胞培養培地中で第３のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、拡張された

数のＴＩＬを取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日にわたって進行することができる、拡張された数のＴＩＬを取得することと、を含む。

【０９２４】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約１～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団の急速な第２の拡張を行い、拡張された数のＴＩＬを取得することであって、第２の細胞培養培地が、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含み、急速拡張が、１４日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第２の拡張が、急速な第２の拡張の開始後約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日にわたって進行することができる、拡張された数のＴＩＬを取得することと、を含む。

【０９２５】

いくつかの実施形態では、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法は、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡張（またはプライミングによる第１の拡張）を行い、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、第１の細胞培養培地が、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含み、プライミングによる第１の拡張が、約１～９日の期間にわたって起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

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

【０９２６】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約１～９日間、２～９日間、３～９日間、約４～９日間、約５～９日間、約６～９日間、約７～９日間、約８～９日間、約１～８日間、約２～８日間、約３～８日間、約４～８日間、約５～８日間、約６～８日間、約７～８日間、約１～７日間、約２

～７日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約１～６日間、約２～６日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約１～５日間、約２～５日間、約３～５日間、約４～５日間、約１～４日間、約２～４日間、約３～４日間、約１～３日間、約２～３日間、または約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、初期拡張は、約９日間行われる。

【０９２７】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間、約２～７日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約１～６日間、約２～６日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約１～５日間、約２～５日間、約３～５日間、約４～５日間、約１～４日間、約２～４日間、約３～４日間、約１～３日間、約２～３日間、または約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約７日間行われる。

【０９２８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約５～１５日間、約６～１５日間、約７～１５日間、約８～１５日間、約９～１５日間、約１０～１５日間、約１１～１５日間、約１２～１５日間、約１３～１５日間、約１４～１５日間、約５～１４日間、約６～１４日間、約７～１４日間、約８～１４日間、約９～１４日間、約１０～１４日間、約１１～１４日間、約１２～１４日間、約１３～１４日間、約５～１３日間、約６～１３日間、約７～１３日間、約８～１３日間、約９～１３日間、約１０～１３日間、約１１～１３日間、約１２～１３日間、約５～１２日間、約６～１２日間、約７～１２日間、約８～１２日間、約９～１２日間、約１０～１２日間、約１１～１２日間、約５～１１日間、６～１１日間、７～１１日間、約８～１１日間、約９～１１日間、約１０～１１日間、約５～１０日間、６～１０日間、７～１０日間、約８～１０日間、約９～１０日間、約５～９日間、６～９日間、７～９日間、約８～９日間、約５～８日間、約６～８日間、７～８日間、約５～７日間、約６～７日間、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１２日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１３日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１４日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、約１５日間行われる。

【０９２９】

いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形

態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３１日の期間内で完了する。

【０９３０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、第３のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９３１】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、第３のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９３２】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）または（ａ）～（ｆ）のいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｅ）または（ａ）～（ｆ）のいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。

【０９３３】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｅ）または（ａ）～（ｆ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子

編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

【０９３４】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。

【０９３５】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）ＣＤ３及びＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約５～１５日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第５のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｂ）～（ｆ）の各々が、閉鎖した無菌系で行われ、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、及び／またはステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、を含む。

【０９３６】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象から腫瘍組織を取得するための他の手段によって産生される腫瘍組織の試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）腫瘍組織の試料または腫瘍断片を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、

（ｃ）腫瘍組織を閉鎖系に添加し、ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約３～９日間行われて、第２のＴＩＬ集団を取得する、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＣＤ３及びＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を産生す

ることと、
（ｆ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を培養することによって第２の拡張を行い、第５のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約５～１５日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第５のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第５のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｇ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することであって、ステップ（ｃ）～（ｇ）の各々が、閉鎖した無菌系で行われ、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行、ステップ（ｅ）からステップ（ｆ）への移行、及び／またはステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、を含む。

【０９３７】

いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約３～９日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約３～９日間、約３～８日間、約３～７日間、約３～６日間、約３～５日間、約３～４日間、約４～９日間、約４～８日間、約５～９日間、約５～８日間、約６～９日間、約６～８日間、約７～９日間、約７～８日間、約３～７日間、約４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約３～５日間、約４～５日間、約３～４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、約９日間行われる。

【０９３８】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１～７日間、約２～７日間、約３～７日間、４～７日間、約５～７日間、約６～７日間、約１～６日間、約２～６日間、約３～６日間、約４～６日間、約５～６日間、約１～５日間、約２～５日間、約３～５日間、約４～５日間、約１～４日間、約２～４日間、約３～４日間、約１～３日間、約２～３日間、約１～２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約２日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約３日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約４日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団を活性化するステップは、約７日間行われる。

【０９３９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約５～１５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約５～１５日間、約６～１５日間、約７～１５日間、約８～１５日間、約９～１５日間、約１０～１５日間、約１１～１５日間、約１２～１５日間、約１３～１５日間、約１４～１５日間、約５～１４日間、約６～１４日間、約７～１４日間、約８～１４日間、約９～１４日間、約１０～１４日間、約１１～１４日間、約１２～１４日間、約１３～１４日間、約５～１３日間、約６～１３日間、約７～１３日間、約８～１３日間、約９～１３日間、約１０～１３日間、約１１～１３日間、約１２～１３日間、約５～１２日間、約６～１２日間、約７～１２日間、約８～１２日間、約９～１２日間、約１０～１２日間、約１１～１２日間、約５～１１日間、６～１１日間、７～１１日間、約８～１１日間、約９～１１日間、約１０～１１日間、約５～１０日間、６～１０日間、７～１０日間、約８～１０日間、約９～１０日間、約５～９日間、６～９日間、７～９日間、約８～９日間、約５～８日間、約６～８日間、７～８日間、約５～７日間、約６～７日

間、約５～６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約５日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約６日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約７日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約８日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約９日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１０日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１１日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１２日日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１３日日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１４日日間行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、約１５日日間行われる。

【０９４０】

いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約１９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２２日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２３日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２４日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２５日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２６日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２７日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２８日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約２９日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３０日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３１日の期間内で完了する。いくつかの実施形態では、本方法のステップは、約３２日の期間内で完了する。

【０９４１】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－

２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９４９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９５０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９５１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９５２】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約２日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５３】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５４】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５５】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５６】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５７】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約３日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５８】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９５９】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９６０】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団

を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約４日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６７】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約５日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６８】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－

２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９６９】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７０】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７１】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７２】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約６日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７３】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７４】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約４日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７５】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約５日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約６日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【０９７７】
いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。
【０９７８】
いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）のいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）のいずれかの前もしくは後に、ＴＩＬ上で実行されてもよいことを意味する。いくつかの実施形態では、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で２回以上実行されてもよい。ある特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、培養ステップ中に収集され（例えば、培養ステップは、ＴＩＬの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたＴＩＬは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、培養ステップを継続するために培養ステップに再導入され（例えば、培養培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。
【０９７９】
拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（ａ）～（ｆ）または（ａ）～（ｇ）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＬ拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、２つを超える培養ステップを含み得、例えば、第３または第４の培養ステップ中にＴＩＬに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。
【０９８０】
いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、ＴＩＬがまだ培養培地中にある間、及び培養ステップが実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも培養ステップから「除去」されるわけではない。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集は、培養培地から収集されたＴＩＬ上で実行され、遺伝子編集プロセスの後、それらのＴＩＬは、その後、培養培地に戻される。
【０９８１】
いくつかの実施形態では、第２または第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップは、第２または第３のＴＩＬ集団に対して無菌エレクトロポレーションステップを行うことを含む。
【０９８２】
いくつかの実施形態では、無菌エレクトロポレーションステップは、少なくとも１つの遺伝子エディターの移入を媒介する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、少なくとも１つのタンパク質の発現を調節するためのＴＡＬＥヌクレアーゼ系である。いくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系は、ＰＤ－１の発現を下方調節する。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＴＬＡ－４の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＬＡＧ－３の発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＩＳＨの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＣＢＬ－Ｂの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子エディターは、ＴＩＧＩＴの発現を下方調節するＴＡＬＥヌクレアーゼ系をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４ノックア

ウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３ノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－ＢノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＴＩＧＩＴノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１の下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３の下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨの下方調節された発現、ならびにＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、及びＣＢＬ－Ｂのうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂの下方調節された発現、ならびにＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＴＩＧＩＴ、及びＰＤ－１のうちの１つ以上の下方調節された発現を示す。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＴＬＡ－４ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＰＤ－１／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＬＡＧ－３ダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＴＬＡ－４／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＩＳＨダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＬＡＧ－３／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＣＢＬ－ＢダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＩＳＨ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。いくつかの実施形態によれば、得られるＴＩＬは、ＣＢＬ－Ｂ／ＴＩＧＩＴダブルノックアウトＴＩＬである。

【０９８３】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集のステップは、休止ステップをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、第４のＴＩＬ集団を、約３０～４０℃で、約５％　ＣＯ２でインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約３０℃、約３０．５℃、約３１℃、約３１．５℃、約３２℃、約３２．５℃、約３３℃、約３３．５℃、約３４℃、約３４．５℃、約３５℃、約３５．５℃、約３６℃、約３６．５℃、約３７℃、約３７．５℃、約３８℃、約３８．５℃、約３９℃、約３９．５℃、約４０℃で行われる。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間行われる。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、約３０℃で約１５時間～約２３時間インキュベートする

ことを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間インキュベートし、続いて、約３０℃で約１５時間～約２３時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間、続いて約３０℃で約１５時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間、続いて約３０℃で約１６時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間インキュベートし、続いて、約３０℃で約１７時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、第３または第４のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、３７℃で約１時間、続いて約３０℃で約１８時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間、続いて、約３０℃で約１９時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間インキュベートし、続いて、約３０℃で約２０時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間インキュベートし、続いて、約３０℃で約２１時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間、続いて約３０℃で約２２時間インキュベートすることを含む。いくつかの実施形態によれば、休止ステップは、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、第３または第４のＴＩＬ集団を、３７℃で約１時間インキュベートし、続いて、約３０℃で約２３時間インキュベートすることを含む。

【０９８４】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態によれば、ＰＢＭＣは、放射線照射される。いくつかの実施形態によれば、ＰＢＭＣは、同種異系である。いくつかの実施形態によれば、ＰＢＭＣは、放射線照射され、同種異系である。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。

【０９８５】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、解剖された腫瘍に由来する。

【０９８６】

いくつかの実施形態では、解剖された腫瘍は、８時間未満経過している。

【０９８７】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、黒色腫腫瘍組織、頭頸部腫瘍組織、乳房腫瘍組織、腎臓腫瘍組織、膵臓腫瘍組織、神経膠芽細胞腫腫瘍組織、肺腫瘍組織、結腸直腸腫瘍組織、肉腫腫瘍組織、トリプルネガティブ乳房腫瘍組織、子宮頸部腫瘍組織、卵巣腫瘍組織、及びＨＰＶ陽性腫瘍組織からなる群から選択される。

【０９８８】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５．５ｍｍ～６ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化さ

れる。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４．５ｍｍ～５ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球状の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍ～４ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～３ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２ｍｍ～３ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約２．５ｍｍ～３ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約１．５ｍｍ～２ｍｍの直径を有するほぼ球形の断片に断片化される。

【０９８９】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも１．５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも２ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも２．５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも３ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも３．５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも４ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも４．５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、少なくとも５．５ｍｍの最短エッジ長及び約６ｍｍの最長エッジ長を有する概して矩形の断片に断片化される。

【０９９０】

いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍまたは約６ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約３．５ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約４．５ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約５．５ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍組織は、約６ｍｍのエッジ長を有する概して立方体の断片に断片化される。

【０９９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の方法によって産生される腫瘍浸

潤リンパ球（ＴＩＬ）産物の治療的集団を提供する。

【０９９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、患者におけるがんを治療するための方法であって、患者に、有効量の、本明細書に記載の方法によって産生される治療的ＴＩＬ集団を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、黒色腫、転移性黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、転移性ＮＳＣＬＣ、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮内膜癌、胆管癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌、腎細胞癌、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、皮膚黒色腫、眼黒色腫、ブドウ膜黒色腫、結膜悪性黒色腫、転移性黒色腫、多形性黄色星状膠細胞腫、胚芽異形成神経上皮腫瘍、神経節膠腫、及び毛様細胞性星細胞腫、著しい粘液分化（ＥＣＭＤ）を有する子宮内膜腺癌、甲状腺乳頭癌、低異型度漿液性または境界卵巣癌、毛様細胞白血病、及びランゲルハンス細胞組織球増殖症からなる群から選択される。

【０９９３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に５０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に５５００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４０００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に４５００ＩＵ／ｍＬ～５０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する

。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３０００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に３５００ＩＵ／ｍＬ～４０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２０００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に２５００ＩＵ／ｍＬ～３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１０００ＩＵ／ｍＬ～２０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、第１の拡張において、細胞培養培地中に１５００ＩＵ／ｍＬ～２０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【０９９４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップ、ＩＬ－２は、１０００ＩＵ／ｍＬ～６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、ＯＫＴ－３抗体は、約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。

【０９９５】

いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地及び／または第２の細胞培養培地は、４－１ＢＢアゴニスト及び／またはＯＸ４０アゴニストをさらに含む。

【０９９６】

いくつかの実施形態では、第１の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【０９９７】

いくつかの実施形態では、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。いくつかの実施形態では、第２の細胞培養培地及び／または第３の培養培地は、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【０９９８】

いくつかの実施形態では、本方法は、ＴＩＬまたはＰＢＬ産物を患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ＴＩＬまたはＰＢＬ産物を患者に投与した翌日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ＴＩＬまたはＰＢＬ産物を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、アルデスロイキン、ネムバロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む。

【０９９９】

いくつかの実施形態では、治療上有効な量のＴＩＬ産物は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}のＴＩＬを含む。

【１０００】

いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも５０倍多い。

【１００１】

ＰＤ－１　ＴＡＬＥＮノックダウンの例示的な開示は、米国仮出願第６３／２４２，３

７３号に提供され、これはすべての関連目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１００２】

Ｃ．遺伝子編集方法

上で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果（例えば、その細胞表面上の免疫調節融合タンパク質の発現）を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。

【１００３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号に記載されており、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１００４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示

は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺

伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム配合物を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１００５】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【１００６】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１００７】

本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらの実施形態は以下でより詳細に説明される。いくつかの実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、改善された治療効果について評価され得る。

【１００８】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲシステム

、ＴＡＬＥＮシステム、及びＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ ＳＴＸシステムである。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅシステムもしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【１００９】

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、遺伝子編集系の送達のために使用される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１０１０】

ａ．ＣＲＩＳＰＲ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０１１】

ＣＲＩＳＰＲは、「Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＣＲＩＳＰＲシステムは、クラス１及びクラス２の２つの主要なクラスに分類され得、これらは、異なるタイプ及びサブタイプにさらに分類される。ＣＲＩＳＰＲシステムの分類は、特定の核酸を切断することができるエフェクターＣａｓタンパク質に基づいている。クラス１のＣＲＩＳＰＲシステムでは、エフェクターモジュールは、マルチタンパク質複合体

からなるが、クラス２のシステムは、１つのエフェクタータンパク質のみを使用する。クラス１のＣＲＩＳＰＲには、Ｉ型、ＩＩＩ型、及びＩＶ型が含まれ、クラス２のＣＲＩＳＰＲには、ＩＩ型、Ｖ型、及びＶＩ型が含まれる。これらの型のＣＲＩＳＰＲシステムのうちのいずれかは、本発明に従って使用され得るが、ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用されることが好ましいＣＲＩＳＰＲシステムには、３つの型：Ｉ型（Ｃａｓ３によって例示される）、ＩＩ型（Ｃａｓ９によって例示される）、及びＩＩＩ型（Ｃａｓ１０によって例示される）がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲは、最もよく特徴付けられている系のうちの１つである。

【１０１２】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。したがって、ある特定の実施形態によれば、Ｃａｓ９は、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ認識時にＤＮＡを切断するＲＮＡ誘導ＤＮＡエンドヌクレアーゼとして機能する。天然システムにおけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ｓｇＲＮＡは、Ｃａｓ結合に必要な足場配列と、修飾されるゲノム標的を定義するユーザー定義のおよそ１７～２０ヌクレオチドスペーサーと、を含む合成ＲＮＡである。したがって、ユーザーは、ｓｇＲＮＡに存在する標的配列を変更することによって、Ｃａｓタンパク質のゲノム標的を変更することができる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドとＲＮＡ成分（例えば、ｓｇＲＮＡ）を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、Ｃｐｆ１などのオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１０１３】

いくつかの実施形態によれば、操作された、プログラム可能な、天然に存在しないＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ系は、Ｃａｓ９タンパク質及びＴＩＬにおいてＤＮＡ分子の標的配列を標的とし、それにハイブリダイズする少なくとも１つのガイドＲＮＡを含み、ＤＮＡ分子が少なくとも１つの免疫チェックポイント分子をコードし、ＴＩＬが少なくとも１つの免疫チェックポイント分子を発現し、Ｃａｓ９タンパク質がＤＮＡ分子を切断し、それによって、少なくとも１つの免疫チェックポイント分子の発現が改変され、Ｃａｓ９タンパク質及びガイドＲＮＡが、天然に一緒に存在しない。いくつかの実施形態によれば、２つ以上の免疫チェックポイント分子の発現が改変される。いくつかの実施形態によれば、ガイドＲＮＡ（複数可）は、ｔｒａｃｒ配列に融合したガイド配列を含む。例えば、ガイドＲＮＡは、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡを含み得る。本発明の態様によれば、「ガイドＲＮＡ」、「単一ガイドＲＮＡ」及び「合成ガイドＲＮＡ」という用語は、互換的に使用され得、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列を指し、これは、標的部位を特定するガイドＲＮＡ内の約１７～２０ｂｐの配列である。

【１０１４】

Ｃａｓ９と比較して改善されたオンターゲット特異性を有するＣａｓ９のバリアントもまた、本発明の実施形態に従って使用され得る。そのようなバリアントは、高忠実度Ｃａｓ－９と称され得る。いくつかの実施形態によれば、デュアルニッカーゼアプローチを利用してもよく、反対のＤＮＡ鎖を標的とする２つのニッカーゼは、標的ＤＮＡ内でＤＳＢを生成する（多くの場合、ダブルニッカーゼまたはデュアルニッカーゼＣＲＩＳＰＲ系と称される）。例えば、このアプローチは、２つのＣａｓ９ヌクレアーゼドメインのうちの１つの変異を伴い、Ｃａｓ９をヌクレアーゼからニッカーゼに変えることを伴い得る。高忠実度Ｃａｓ９の非限定的な例としては、ｅＳｐＣａｓ９、ＳｐＣａｓ９－ＨＦ１及びＨｙｐａＣａｓ９が挙げられる。そのようなバリアントは、非標的ＤＮＡ部位における望ましくない変化を低減または排除し得る。例えば、Ｓｌａｙｍａｋｅｒ ＩＭ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１５ Ｄｅｃ １、Ｋｌｅｉｎｓｔｉｖｅｒ ＢＰ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１６ Ｊａｎ ６、及びＲａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３ Ｎｏｖ；８（１１）：２２８１－２３０８（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【１０１５】

追加として、特定の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１６／０１０２３２４号に開示されているものなどの、細胞へのＣａｓ９の遺伝子送達を改善し、標的特異性を改善する、Ｃａｓ９足場を使用することができる。例えば、Ｃａｓ９足場は、（Ｄ－［Ｉ／Ｌ］－Ｇ－Ｘ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｇ－Ｗ－Ａ）によって定義されるＲｕｖＣモチーフ及び／または（Ｙ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｈ－Ｘ－Ｘ－Ｐ－Ｘ－Ｓ－Ｘ－Ｘ－Ｘ－Ｄ－Ｘ－Ｓ）によって定義されるＨＮＨモチーフを含んでよく、Ｘは、２０個の天然に存在するアミノ酸のうちのいずれか１つを表し、［Ｉ／Ｌ］は、イソロイシンまたはロイシンを表す。ＨＮＨドメインは、標的ｄｓＤＮＡの一方の鎖をニッキングすることに関与し、ＲｕｖＣドメインは、ｄｓＤＮＡの他方の鎖の切断に関与する。したがって、これらのドメインの各々は、ＰＡＭのすぐ近くのプロトスペーサー内の標的ＤＮＡの鎖をニックし、ＤＮＡの鈍い切断をもたらす。これらのモチーフを互いに組み合わせて、よりコンパクト及び／またはより特異的なＣａｓ９足場を作製してもよい。さらに、モチーフを使用して、分割されたＣａｓ９タンパク質（すなわち、ＲｕｖＣドメインまたはＨＮＨドメインのいずれかを含むＣａｓ９タンパク質またはＣａｓ９バリアントの還元型または切断型）を作製してもよく、分割されたＣａｓ９タンパク質は、２つの別個のＲｕｖＣドメイン及びＨＮＨドメインに分割され、標的ＤＮＡを一緒にまたは別個に処理することができる。

【１０１６】

特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｃａｓ９ヌクレアーゼ及び免疫チェックポイント遺伝子（複数可）の標的ＤＮＡ配列に特異的なおよそ１７～２０ヌクレオチドの配列を含むガイドＲＮＡ（例えば、ｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡまたはｓｇＲＮＡ）を導入することによって、ＴＩＬにおける１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。ガイドＲＮＡは、ＲＮＡとして、またはプロモーターの下でガイドＲＮＡコード配列を有するプラスミドを形質転換することによって送達され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素は、ｓｇＲＮＡにより定義された標的配列に基づいて、特定の位置に二本鎖切断（ＤＳＢ）を導入する。ＤＳＢは、ＤＮＡの挿入または欠失（インデル）を頻繁に引き起こす機序である、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）によって細胞内で修復され得る。インデルは、多くの場合、フレームシフトをもたらし、例えば、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）内で早期停止コドンを引き起こすことによって、機能対立遺伝子の喪失を引き起こす。ある特定の実施形態によれば、結果は、標的免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

【１０１７】

代替的に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ酵素によって誘導されるＤＳＢは、ＮＨＥＪの代わりに相同性指向修復（ＨＤＲ）によって修復され得る。ＮＨＥＪ媒介ＤＳＢ修復は、しばしば遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊するが、相同指向修復（ＨＤＲ）を使用

して、単一ヌクレオチド変化から大きな挿入までの範囲の特異的なヌクレオチド変化を生成することができる。いくつかの実施形態によれば、ＨＤＲは、ｓｇＲＮＡ（複数可）及びＣａｓ９またはＣａｓ９ニッカーゼを有するＴＩＬに所望の配列を含むＤＮＡ修復テンプレートを送達することによって、免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集、ならびに標的遺伝子のすぐ上流及び下流の追加の相同配列（多くの場合、左及び右の相同アームと称される）を含む。

【１０１８】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、開始を遮断することによって転写を抑制するために、転写開始部位を標的とし得る。したがって、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに抑制され得る。ｄＣａｓ９分子は、ｓｇＲＮＡ標的化配列に基づいて標的ＤＮＡに結合する能力を保持している。本発明のいくつかの実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法は、Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインなどの転写リプレッサードメインをＣａｓ９の酵素不活性バージョンに融合させ、それによって、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＫＲＡＢを形成し、遺伝子の転写の阻害または防止をもたらすことを含み得る。好ましくは、リプレッサードメインは、転写開始部位の下流、例えば、約５００ｂｐ下流のウィンドウを標的とする。ＣＲＩＳＰＲ干渉（ＣＲＩＳＰＲｉ）と称され得るこのアプローチは、標的ＲＮＡの転写還元を介して堅牢な遺伝子ノックダウンをもたらす。

【１０１９】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのＣａｓ９（ｄｅａｄＣａｓ９またはｄＣａｓ９）は、転写を活性化するために、転写開始部位を標的とし得る。このアプローチは、ＣＲＩＳＰＲ活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）と称され得る。いくつかの実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を活性化することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増加させることを含む。そのような実施形態によれば、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、ＤＳＢを使用せずに活性化され得る。ＣＲＩＳＰＲ法は、例えば、ＶＰ６４などの転写活性化因子をｄＣａｓ９に融合させ、それによって例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするｄＣａｓ９－ＶＰ６４を形成することによって、転写活性化ドメインを転写開始部位に標的化することを含み得、遺伝子の転写の活性化をもたらす。好ましくは、活性化因子ドメインは、転写開始部位から上流のウィンドウ、例えば、約５０～４００ｂｐ下流を標的とする。

【１０２０】

本発明の追加の実施形態は、哺乳動物細胞における標的遺伝子の強力な活性化のために開発された活性化戦略を利用し得る。非限定的な例としては、エピトープタグ付きｄＣａｓ９及び抗体活性化剤エフェクタータンパク質（例えば、ＳｕｎＴａｇ系）の共発現、複数の異なる活性化ドメインに直列に融合したｄＣａｓ９（例えば、ｄＣａｓ９－ＶＰＲ）、またはｄＣａｓ９－ＶＰ６４と修飾された足場ｇＲＮＡ及び追加のＲＮＡ結合ヘルパー活性化因子（例えば、ＳＡＭ活性化因子）との共発現が挙げられる。

【１０２１】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、ＣＲＩＳＰＲ支援合理的タンパク質操作（ＣＡＲＰＥ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介ゲノム編集方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＣＡＲＰＥは、一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）または二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）編集カセットからの指向性変異をゲノムに直接組み込む「ドナー」及び「デスティネーション」ライブラリーの生成を伴う。ドナーライブラリーの構築は、標的ＤＮＡ配列にハイブリダイズするガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を用いて、合理的に設計された編集オリゴヌクレオチ

ドを細胞に同時形質転換することを伴う。編集オリゴヌクレオチドは、ＰＡＭの欠失または変異を、隣接遺伝子内の１つ以上の所望のコドンの変異とカップリングするように設計される。これにより、ドナーライブラリー全体を単一の形質転換で生成することができる。ドナーライブラリーは、編集オリゴヌクレオチドからの合成特徴、すなわち、遺伝子の３’末端に同時に組み込まれる第２のＰＡＭ欠失または変異を使用して、ＰＣＲ反応などによる組換え染色体の増幅によって回収される。これは、ＰＡＭ欠失に指向されたコドン標的変異を共有結合する。次いで、ドナーライブラリーを、デスティネーションｇＲＮＡベクターを有する細胞に同時形質転換して、合理的に設計されたタンパク質ライブラリーを発現する細胞の集団を作製する。

【１０２２】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，９８２，２７８号に開示されるように、追跡可能なＣＲＩＳＰＲ濃縮組換えによるゲノム操作（ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ）と称されるＣＲＩＳＰＲ媒介系を使用する、追跡可能な精密ゲノム編集のための方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。ＧＥｎ－ＴｒａＣＥＲ方法及びベクターは、編集カセットを、単一のベクター上のｇＲＮＡをコードする遺伝子と組み合わせる。カセットは、所望の変異及びＰＡＭ変異を含有する。Ｃａｓ９もコードし得るベクターは、細胞または細胞集団に導入される。これは、細胞または細胞集団におけるＣＲＩＳＰＲ系の発現を活性化し、ｇＲＮＡにＣａｓ９を標的領域に動員させ、ｄｓＤＮＡ切断が発生し、ＰＡＭ変異の組み込みを可能にする。

【１０２３】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１０２４】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１０２５】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための供給源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１０２６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第ＵＳ９，７９０，４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して行

うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系は、Ｃｐｆ１関連ＣＲＩＳＰＲアレイが追加のｔｒａｃｒＲＮＡを必要とすることなく成熟したｃｒＲＮＡに処理されるという点で、ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９系とは機能的に異なる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系で使用されるｃｒＲＮＡは、スペーサーまたはガイド配列及び直接反復配列を有する。この方法を使用して形成されるＣｐｆ１ｐ－ｃｒＲＮＡ複合体は、それ自体で標的ＤＮＡを切断するのに十分である。

【１０２７】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９系及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つのチェックポイントタンパク質発現を調節する。

【１０２８】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透

過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）／Ｃａｓ９系及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１系からなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を阻害する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０２９】

ｂ．ＴＡＬＥ法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＷＯ２０１８０８１４７３、ＷＯ２０１８１２９３３２、またはＷＯ２０１８１８２８１７に記載されるように実行することができ、この方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１０３０】

ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ Ａｃｔｉｖａｔｏｒ－Ｌｉｋｅ Ｅｆｆｅｃｔｏｒ（転

写活性化因子様エフェクター）」タンパク質の略語である。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

【１０３１】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザー定義配列を認識することができることが示されている。カスタムＴＡＬＥアレイの迅速な組み立てを可能にする戦略には、ゴールデンゲート分子クローニング、高スループット固相組み立て、及びライゲーション非依存性クローニング技術が含まれる。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。追加として、所望の標的のためのカスタムＴＡＬエフェクター反復アレイの設計を可能にし、また、予測されるＴＡＬエフェクター結合部位を提供する、ＴＡＬエフェクター－ヌクレオチドターゲット２．０などのウェブベースのツールが利用可能である。Ｄｏｙｌｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１２，Ｖｏｌ．４０，Ｗ１１７－Ｗ１２２を参照されたい。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法の例は、米国特許公開第ＵＳ２０１１／０２０１１１８Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１１７８６９Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０３１５８８４Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０２０３８７１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１６／０１２０９０６Ａ１号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０３２】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＫＲＡＢ－ＴＡＬＥを利用することを含み得、この方法は、転写Ｋｒｕｐｐｅｌ関連ボックス（ＫＲＡＢ）ドメインを、遺伝子の転写開始部位を標的とするＤＮＡ結合ドメインに融合することを含み、遺伝子の転写の阻害または防止につながる。

【１０３３】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥ法は、標的遺伝子（複数可）に変異を導入することによって１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、ＴＡＬＥ法は、ＦｏｋｌなどのヌクレアーゼエフェクタードメインをＴＡＬＥ ＤＮＡ結合ドメインに融合させ、ＴＡＬＥＮをもたらすことを含み得る。Ｆｏｋｌは、二量体として活性であり、したがって、この方法は、ＦＯＫＬヌクレアーゼドメインを隣接するゲノム標的部位に位置決めするためのＴＡＬＥＮ対を構築することを含み、ＤＮＡ二本鎖切断を導入する。Ｆｏｋｌの正しい位置決め及び二量体化後、二本鎖切断が完了し得る。二本鎖切断が導入されると、ＤＮＡ修復は、高忠実度相同組換え対（ＨＲＲ）（相同性指向修復またはＨＤＲとしても知られる）またはエラーが発生しやすい非相同性末端結合（ＮＨＥＪ）の２つの異なる機序を介して達成することができる。ＮＨＥＪを介した二本鎖切断の修復は、好ましくは、ＤＮＡ標的部位の欠失、挿入または置換を

もたらす、すなわち、ＮＨＥＪは、典型的には、切断部位での小さな挿入及び欠失の導入をもたらし、多くの場合、遺伝子機能をノックアウトするフレームシフトを誘導する。特定の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮ対は、遺伝子の最５’エクソンを標的とし、早期フレームシフト変異または早期停止コドンを促進する。ＴＡＬＥＮによって導入される遺伝子変異（複数可）は、好ましくは永続的である。したがって、いくつかの実施形態によれば、この方法は、二量体化ＴＡＬＥＮを利用して、エラーが発生しやすいＮＨＥＪを介して修復される部位特異的二本鎖切断を誘導し、標的免疫チェックポイント遺伝子に１つ以上の変異をもたらすことによって、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。

【１０３４】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、非ランダム点変異、標的欠失、またはＤＮＡ断片の付加などのＨＲＲを介して遺伝子改変を導入するために利用される。ＤＮＡ二本鎖切断の導入は、好適なドナーＤＮＡの存在下での相同組換えを介した遺伝子編集を可能にする。いくつかの実施形態によれば、この方法は、部位特異的二本鎖切断を誘導し、１つ以上の導入遺伝子をＤＮＡに組み込むために、二量体化ＴＡＬＥＮ及び遺伝子座特異的相同性アームを有するドナープラスミドを同時送達することを含む。

【１０３５】

他の実施形態によれば、米国特許公開第２０１１／０２０１１１８号に開示されているように、ＦｏｋＩ及びＡｖｒＸａ７に由来するハイブリッドタンパク質であるＴＡＬＥＮを、本発明の実施形態に従って使用してもよい。このＴＡＬＥＮは、ＡｖｒＸａ７の標的ヌクレオチド及びＦｏｋＩの二本鎖ＤＮＡ切断活性に対する認識特異性を保持する。同じ方法を使用して、異なる認識特異性を有する他のＴＡＬＥＮを調製することができる。例えば、コンパクトＴＡＬＥＮは、ＤＮＡ結合特異性を変化させ、特定の単一のｄｓＤＮＡ標的配列を標的とするために、ＲＶＤの異なるセットを有するコアＴＡＬＥ足場を操作することによって生成され得る。米国特許公開第２０１３／０１１７８６９号を参照されたい。触媒ドメインの選択は、ＤＮＡ処理をもたらすために足場に付着させることができ、これは、触媒ドメインが、コアＴＡＬＥ足場に融合されたときに、単一のｄｓＤＮＡ標的配列の近くでＤＮＡを処理することができることを確実にするように操作され得る。ペプチドリンカーはまた、触媒ドメインを足場に融合させて、特定の単一のｄｓＤＮＡ配列を標的とするために二量体化を必要としない単一のポリペプチド鎖からなるコンパクトなＴＡＬＥＮを作製するように操作されてもよい。コアＴＡＬＥ足場はまた、ＴＡＬモノマーであり得る触媒ドメインをそのＮ末端に融合させることによって修飾され得、この触媒ドメインが別のＴＡＬモノマーに融合された別の触媒ドメインと相互作用する可能性を可能にし、それによって標的配列の近傍でＤＮＡを処理する可能性が高い触媒エンティティを作製する。米国特許公開第２０１５／０２０３８７１号を参照されたい。このアーキテクチャは、１つのＤＮＡ鎖のみを標的とすることを可能にするが、これは古典的なＴＡＬＥＮアーキテクチャの選択肢ではない。

【１０３６】

本発明のいくつかの実施形態によれば、従来のＲＶＤを使用して、遺伝子発現を大幅に低減することができるＴＡＬＥＮを作製してもよい。いくつかの実施形態では、４つのＲＶＤ、ＮＩ、ＨＤ、ＮＮ、及びＮＧを使用して、それぞれ、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンを標的とする。これらの従来のＲＶＤを使用して、例えば、ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥＮを作製することができる。従来のＲＶＤを使用するＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｄｅｃ．２０１７，Ｖｏｌ．９：３１２－３２１（Ｇａｕｔｒｏｎ）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているＴ３ｖ１及びＴ１ ＴＡＬＥＮが挙げられる。Ｔ３ｖ１及びＴ１ ＴＡＬＥＮは、ＰＤ－Ｌ１結合部位が位置するＰＤＣＤ１遺伝子座の第２のエクソンを標的とし、ＰＤ－１産生を著しく低減することができる。いくつかの実施形態では、Ｔ１ ＴＡＬＥＮは、標的配列番号２５６を使用することによってそれを行い、Ｔ３ｖ１ ＴＡＬＥＮは、標的配列番号２５７を使

用することによってそれを行う。

【１０３７】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは、Ｇａｕｔｒｏｎに開示されるような、標的遺伝子に対するそれらの活性及び特異性を改善するために、非従来型ＲＶＤを使用して修飾される。天然に存在するＲＶＤは、超可変アミノ酸位置の潜在的な多様性レパートリーのごく一部のみをカバーする。非従来のＲＶＤは、天然のＲＶＤの代替物を提供し、ＴＡＬＥＮによるオフサイト標的（標的配列に対していくつかのミスマッチを含むゲノム内の配列）の標的化を除外するために使用され得る、新規の固有の標的化特異性特徴を有する。非従来型ＲＶＤは、Ｊｕｉｌｌｅｒａｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ ５，Ａｒｔｉｃｌｅ Ｎｕｍｂｅｒ ８１５０（２０１５）（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるようなアレイの定義された位置における２つの超可変アミノ酸位置にアミノ酸の代替組み合わせを含むＴＡＬＥＮの集合を生成及びスクリーニングすることによって同定され得る。次に、非従来型ＲＶＤは、ミスマッチの位置に存在するヌクレオチドを区別する非従来型ＲＶＤが選択され得、これは、標的位置の適切な処理を依然として可能にしつつ、オフサイト配列でのＴＡＬＥＮ活性を防止することができる。次いで、選択された非従来型ＲＶＤは、ＴＡＬＥＮ内の従来のＲＶＤを置き換えるために使用され得る。従来のＲＶＤが非従来型ＲＶＤに置き換えられたＴＡＬＥＮの例としては、Ｇａｕｔｒｏｎによって産生されたＴ３ｖ２及びＴ３ｖ３ ＰＤ－１ ＴＡＬＥＮが挙げられる。これらのＴＡＬＥＮは、従来のＲＶＤを使用したＴＡＬＥＮと比較した場合、特異性が増加していた。

【１０３８】

追加の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮを利用して、２つの遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させるための遺伝子改変を導入してもよい。例えば、２つの異なる遺伝子を標的とするために２つの別個のＴＡＬＥＮを生成し、次いで一緒に使用してもよい。２つのＴＡＬＥＮによってそれぞれの遺伝子座及び潜在的なオフターゲット部位で生成される分子事象は、ハイスループットＤＮＡ配列決定によって特徴付けられ得る。これにより、オフターゲット部位の分析、及び両方のＴＡＬＥＮの使用から生じる可能性のある部位の特定が可能になる。この情報に基づいて、一緒に使用されても特異性及び活性が増加したＴＡＬＥＮを操作するために、適切な従来型及び非従来型のＲＶＤが選択され得る。例えば、Ｇａｕｔｒｏｎは、Ｔ３ｖ４ ＰＤ－１及びＴＲＡＣ ＴＡＬＥＮを併用して、強力なインビトロ抗腫瘍機能を維持したダブルノックアウトＣＡＲ Ｔ細胞を産生することを開示する。

【１０３９】

いくつかの実施形態では、Ｇａｕｔｒｏｎの方法または本明細書に記載の他の方法は、ＴＩＬを遺伝子編集するために用いられてもよく、このＴＩＬは、次いで、本明細書に記載の手順のうちのいずれかによって拡張され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を阻害する、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、

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

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約７～１４日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる、ステップと、を含む。

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０４０】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を阻害する、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる、ステップと、を含む。

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態

では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０４１】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第２のＴＩＬ集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質の発現を阻害する、第２のＴＩＬ集団を取得するステップと、

（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、

（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、

（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、

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

（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる、ステップと、を含む。

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０４２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０４３】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｅ）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｆ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｇ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０４４】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／また

は受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊することによって第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集して、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させ、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１０４５】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊することによって第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集して、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させ、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させる、第４のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。

【１０４６】

いくつかの実施形態では、第４のＴＩＬ集団を培養するステップは、第４のＴＩＬ集団を第２の細胞培養培地中で約１～７日の第１の期間培養することによって行われ、第１の期間の終了時に、培養物が複数のサブ培養物に分割され、複数のサブ培養物の各々が、ＩＬ－２を含む第３の培養培地中で約３～７日の第２の期間培養され、第２の期間の終了時に、複数のサブ培養物が組み合わされて、拡張された数のＴＩＬが提供される。

【１０４７】

他の実施形態によれば、ＴＡＬＥＮは特異的に設計されてもよく、これにより、遺伝子の特異的選択を標的とすることができる標的細胞（複数可）内の、より高い割合のＤＳＢ事象が可能になる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号を参照されたい。そのようなまれな切断エンドヌクレアーゼの使用は、トランスフェクトされた細胞内で標的遺伝子の二重不活性化を得る可能性を高め、Ｔ細胞などの操作された細胞の産生を可能にする

。さらに、変異誘発を増加させ、標的遺伝子不活性化を強化するために、追加の触媒ドメインをＴＡＬＥＮで導入することができる。米国特許公開第２０１３／０３１５８８４号に記載されているＴＡＬＥＮは、免疫療法に適するようにＴ細胞を操作するために首尾よく使用された。ＴＡＬＥＮを使用して、単一のＴ細胞内の少なくとも２つの遺伝子の不活性化を含む、Ｔ細胞内の様々な免疫チェックポイント遺伝子を不活性化することもできる。米国特許公開第２０１６／０１２０９０６号を参照されたい。追加として、ＴＡＬＥＮを使用して、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第２０１８／００２１３７９号に開示されるように、免疫抑制剤及びＴ細胞受容体の標的をコードする遺伝子を不活性化することができる。さらに、ＴＡＬＥＮは、米国特許公開第２０１９／００１０５１４号（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるように、ベータ２－ミクログロブリン（Ｂ２Ｍ）及び／またはクラスＩＩ主要組織適合性複合体トランスアクチベーター（ＣＩＩＴＡ）の発現を阻害するために使用され得る。

【１０４８】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１０４９】

ＰＤ－１遺伝子を標的とするＴＡＬＥヌクレアーゼの非限定的な例を、以下の表に提供する。これらの実施例では、標的化ゲノム配列は、１５ｂｐのスペーサー（小文字で示される）によって分離された２つの１７塩基対（ｂｐ）の長い配列（大文字で示される、半分の標的と称される）を含有する。各半分の標的は、表１１に列挙される半分のＴＡＬＥヌクレアーゼの反復によって認識される。したがって、特定の実施形態によれば、本発明によるＴＡＬＥヌクレアーゼは、配列番号２８６及び配列番号２８７からなる群から選択される標的配列を認識し、切断する。ＴＡＬＥＮ配列及び遺伝子編集方法はまた、上述のＧａｕｔｒｏｎに記載されている。

【１０５０】

【表４－１】

表１１－ＴＡＬＥＮ　ＰＤ－１配列。

TALEN PD-1 の１番目の配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 286)	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA
反復 PD-1-左 (配列番号 288)	LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAI ASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLL PVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALE TVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVL CQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPE QVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQV VAIASNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 289)	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAI ASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQAL ETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV LCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN NGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQ AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQV VAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGG KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA IASNGGGRPALE

【表４－２】

PD-1-左 TALEN (配列番号 290)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCA TACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGC ACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACC GAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCA ACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGA CATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCG TTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGG CCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC AGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG GCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCA CTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT AATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT

【表４－３】

	GCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACG GCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATG GCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTT GCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACC AACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCT GCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAG CCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAAT CCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTAC ATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCG TATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTA CGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCG ACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCG TGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGC CCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAG AACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTG GAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTT CGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGAC CAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTC CGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCG GCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAAC GGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表４－４】

PD-1-右 TALEN (配列番号 291)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGA GACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCA TCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGC AACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACC GTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAG GCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTC CGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGA GTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCT CAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAG TGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACT TGACCCCCCAGCAAGTCGTCGCAATCGCCAGCAATAACGGAG GGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGC TCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCAAGTAACATTGGAGGAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTG CAGGCCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACACGGCCTCACA CCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCAACATCGGGGGGAA ACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGGCCCTGCTGCCCGTCCTCTG TCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGC CTCTAATAACGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGA GACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCA ACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACAACGGGGGCAAGCAGG CCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGG CTCACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCA ACGGCGGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTC CTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACCACAACAA GTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCTT GAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACAC GGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATAAT GGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTCCAGCGCCTGCTGCC AGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCGAACAGGTCGT GGCAATCGCCTCCAACGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGACCG TGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGACTCA

【表４－５】

	CACCTCAGCAGGTCGTCGCCATTGCCTCTAACAACGGGGGCA AACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGTTGT GCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCATCG CCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAG AGGTTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCC CAACAGGTCGTCGCCATTGCCAGCAACGGCGGAGGAAAGCA GGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTGTCA GGCTCATGGGCTGACCCCCCAGCAAGTGGTGGCTATTGCCTC TAACAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGC TGTTGCCAGTGCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGC AGGTGGTCGCCATCGCCAGTAACGGCGGGGGCAAACAGGCA TTGGAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCA CACGGACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCAT GATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAGAGACTCCT GCCAGTGTTGTGCCAAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGT CGTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGGGGCCGGCCTGCACTGG AGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGG CCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCG GCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGG GATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAG GAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCC CCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCA CCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCA TGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCC AGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATC GACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGC TACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTA CGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCA ACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCA AGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCG CCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGA TCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAG TTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表４－６】

TALEN PD-1 の２番目の配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 287)	TACCTCTGTGGGGCCATctccctggcccccaaGGCGCAGATCAAAGAGA
反復 PD-1-左 (配列番号 292)	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 293)	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE

10

20

30

40

50

【表４－７】

PD-1-左 TALEN (配列番号 294)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCA TACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGC ACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACC GAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGT CGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCA ACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGA CATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCG TTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGG CCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTAC AGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG GCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCA CTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT AATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGG

【表４－８】

	AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACG GCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTT GACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAA GCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTG CCAGGCCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTTG CCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCA ACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTG CGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGC CGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATC CGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACAT CGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTA TCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACG GCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGAC GGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTG ATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCC ATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAA CCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGA AGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCG TGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCA GGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCG TGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGC ACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGG CGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【表４－９】

PD-1-右 TALEN (配列番号 295)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGA GACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCA TCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGC AACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCG CAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACC GTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAG GCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTC CGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGA GTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCT CAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAG TGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACT TGACCCCCGAGCAAGTCGTCGCAATCGCCAGCCATGATGGAG GGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGTTGCTTCCTGTGC TCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCA TCGCAAGTAACGGAGGAGGAAAGCAAGCCTTGGAGACAGTG CAGCGCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACACGGCCTCACA CCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCCATGACGGGGGGAA ACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGAGGCTGCTGCCCGTCCTCTG TCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGC CTCTAATGGCGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGA GACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCA ACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACGGGGGGGGCAAGCAGG CCCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGG CTCACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCA ACGGCGGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTC CTGCCCGTGCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACCACAACAA GTCGTGGCCATCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCTT GAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACAC GGGCTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATATT GGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTCCAGGCCCTGCTGCC AGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCCCAGCAGGTCGT GGCAATCGCCTCCAACGGCGGAGGGAAGCAGGCTCTGGAGA CCGTGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACGGAC TCACACCTGAACAGGTCGTCGCCATTGCCTCTCACGATGGGG GCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGT

【表４－１０】

	TGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCA TCGCCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTG CAGAGGTTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACT CCCCAACAGGTCGTCGCCATTGCCAGCAACAACGGAGGAAA GCAGGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTG TCAGGCTCATGGGCTGACCCCCGAGCAAGTGGTGGCTATTGC CTCTAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCT GTTGCCAGTGCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCA GGTGGTCGCCATCGCCAGTAACAACGGGGGCAAACAGGCAT TGGAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCAC ACGGACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATG ATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAGAGACTCCTG CCAGTGTTGTGCCAAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTC GTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGGGGCCGGCCTGCACTGGA GAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCC GCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGC GGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGA TCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGA GAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCC ACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACC CAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATG AAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAG GAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGA CTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTA CAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACG TGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAAC GAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAG TTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCC CAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCC GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTT CAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

【１０５１】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中のＰＤ－１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子

編集するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる、ステップと、を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０５２】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集することであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中のＰＤ－１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第４のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された

免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０５３】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊することによって第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、ＰＤ－１を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させ、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、第４のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０５４】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１４９または配列番号１５０を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－

１の発現を阻害する、遺伝子編集するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる、ステップと、を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０５５】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集することであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１４９または配列番号１５０を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第４のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例え

ば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０５６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、配列番号１４９または配列番号１５０を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸を、第３のＴＩＬ集団に移入させることによって、第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、第４のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０５７】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）ＣＤ３及びＣＤ２８活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬの第１の集団を１～５日間活性化するステップと、

（ｂ）第１のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１５７及び配列番号１５８または配列番号１５３及び配列番号１５４に従って転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第２のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの

免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集するステップと、
（ｃ）任意選択で、第２のＴＩＬ集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートするステップと、
（ｄ）ＩＬ－２、及び任意選択でＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第２のＴＩＬ集団を培養することによって第１の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第１の拡張が、約６～９日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得する、第３のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｅ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第４のＴＩＬ集団を産生するステップであって、第２の拡張が、約９～１１日間行われて、第４のＴＩＬ集団を取得し、第４のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第４のＴＩＬ集団を産生するステップと、
（ｆ）ステップ（ｅ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取するステップと、
（ｇ）ステップ（ｅ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すステップと、
（ｈ）ステップ（ａ）～（ｇ）のうちの１つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる、ステップと、を含む。
いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０５８】
いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、
（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集することであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中の配列番号１５７及び配列番号１５８または配列番号１５３及び配列番号１５４に従って転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードする核酸のエレクトロポレーションを使用して、第４のＴＩＬ集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、遺伝子編集することと、
（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、
（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。
いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例え

ば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０５９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、拡張された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を調製するための方法であり、

（ａ）対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～９日間培養して、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｃ）抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８ビーズまたは抗体を使用して、第２のＴＩＬ集団を１～７日間活性化して、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊して、配列番号１５７及び配列番号１５８または配列番号１５３及び配列番号１５４に記載の転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼをコードするｍＲＮＡを、第３のＴＩＬ集団に移入させることによって、第３のＴＩＬ集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第４のＴＩＬ集団を取得することであって、遺伝子編集が、第３のＴＩＬ集団の細胞の一部において、細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１の発現を阻害する、第４のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）任意選択で、第４のＴＩＬ集団をインキュベートすることであって、インキュベーションが、約３０～４０℃で、約５％のCO_2で行われる、インキュベートすることと、

（ｆ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む第２の細胞培養培地中で第４のＴＩＬ集団を約５～１５日間培養して、拡張された数のＴＩＬを産生することと、を含む。

いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０６０】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の他の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１０６１】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号

に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。これらの開示される例は、反復ＲＶＤを含有する２つ以上のＴＡＬＥ反復単位を有する天然に存在しないＤＮＡ結合ポリペプチド、ＴＡＬＥタンパク質の残基からなるＮ－キャップポリペプチド、及びＴＡＬＥタンパク質の全長Ｃ末端領域の断片からなるＣ－キャップポリペプチドの使用を含む。

【１０６２】

ＴＡＬＥＮ介在性遺伝子組み込み及び不活性化を効率的に行うために使用することができ、本発明の実施形態に従って使用することができるＴＡＬＥＮ設計及び設計戦略、活性評価、スクリーニング戦略、ならびに方法の例は、Ｖａｌｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０１４，６９，１５１－１７０（これは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【１０６３】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４

０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０６４】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０６５】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張

するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させるための第２のＴＩＬ集団上での無菌エレクトロポレーションステップと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合されたサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０６６】
いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ＴＡＬＥヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０６７】

ｃ．ジンクフィンガー法

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従って、またはＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０５８６１０、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６０５、もしくはＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１２６３３に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。代替的に、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１０６８】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含

む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【１０６９】

個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。代替的に、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）と協同して、ジンクフィンガー構築のための独自のプラットフォーム（ＣｏｍｐｏＺｒ（登録商標））を開発した。

【１０７０】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２　（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１０７１】

ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１が含まれる。

【１０７２】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【１０７３】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１０７４】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０７５】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者か

ら切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、少なくとも１つの免疫チェックポイントタンパク質及び／または接着分子の発現を調節する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。
【１０７６】
いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過

性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０７７】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団の細胞膜を一過的に破壊して、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の

拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われて、第３のＴＩＬ集団を取得し、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

少なくとも１つの遺伝子エディターの移入ステップが、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現を抑制する、ジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームを使用して、第３のＴＩＬ集団の細胞膜を一時的に破壊する。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニストからなる群から選択される。

【１０７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３のまたは第４のＴＩＬ集団を培養するステップ、または第２の拡張ステップが、第３のまたは第４のＴＩＬ集団を約１～７日間の第１の期間にわたって培養することによって行われるか、または第２の拡張を約１～７日間の第１の期間にわたって行い、第１の期間の終わりに、培養物を複数のサブ培養物に分割し、複数のサブ培養物の各々を追加のＩＬ－２で約３～７日間の第２の期間にわたって培養し、第２の期間の終わりに、複数のサブ培養物を組み合わせて、拡張された数のＴＩＬまたは治療的ＴＩＬ集団を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日または１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１

の拡張ステップが、約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０８９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１０９５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１０９６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１０９７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１０９８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１０９９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１００】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１０７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１

の拡張ステップが、約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１０９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１１９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１２０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第１の拡張ステップが、約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２３】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化するステップが約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２４】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２５】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２６】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２７】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２８】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１２９】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１３０】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１３１】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１３２】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１３３】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１３４】
いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１３５】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３６】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３７】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３８】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４０】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４１】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４２】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４３】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４～５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４４】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４５】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４６】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４７】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４８】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１４９】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１５０】

いくつかの実施形態では、本発明は、活性化ステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１５１】

いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約１日、２日、または３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する

。
【１１５２】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約１～２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５３】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約２～３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５４】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５５】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５６】
いくつかの実施形態では、本発明は、刺激ステップが約３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３または第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが、約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、または１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１５９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１６０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１６１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１６２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１６３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１６４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１６５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１３～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１４～１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１３～１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１２日間行われるように修正された、上記の該当す

る前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１７８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１７９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５～６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１８９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１１９０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６～７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９３】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９４】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７～８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１１９９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２００】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８～９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１３日間行われるように修正された、上記の該当す

る前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０５】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９～１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０６】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０７】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０８】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０～１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２０９】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１０】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１～１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１１】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２～１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１２】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１３】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約６日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１４】
いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約７日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【１２１５】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約８日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２１６】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約９日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２１７】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１０日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２１８】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１１日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２１９】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１２日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２２０】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１３日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２２１】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１４日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２２２】

いくつかの実施形態では、本発明は、第３もしくは第４のＴＩＬ集団を培養するステップまたは第２の拡張ステップが約１５日間行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１２２３】

Ｄ．一過性細胞修飾

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、ＴＩＬ集団へのリボ核酸（ＲＮＡ）挿入（メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の挿入を含む）などのヌクレオチド挿入による一過性細胞修飾を含む。

【１２２４】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の改変を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の改変は、第１の拡張前にバルクＴＩＬ集団において生じる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の改変は、第１の拡張後に生じる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の改変は、第２の拡張前にバルクＴＩＬ集団において生じる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の改変は、第２の拡張後に生じる。

【１２２５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、免疫調節組成物の一過性の発現をもたらす。いくつかの実施形態では、免疫調節組成物は、免疫調節融合タンパク

質である。いくつかの実施形態では、免疫調節融合タンパク質は、免疫調節剤に融合した膜アンカーを含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択されるインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択されるインターロイキンである。

【１２２６】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するためにタンパク質発現の一過性の改変を介して一過的に修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、免疫調節組成物の発現のために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（例えば、ＲＮＡ）による一過性の修飾を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療用集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬの一過性の修飾を含む。ＴＩＬ集団を一過的に修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。

【１２２７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に改変する方法は、ＴＩＬを、免疫調節組成物をコードする核酸（例えば、ｍＲＮＡ）と接触させ、次いで、細胞にエレクトロポレーションステップを課すことを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーショ

ン法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。

【１２２８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウム核酸沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム配合物を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に改変させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１２２９】

いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが

、タンパク質発現を一過的に改変するために使用される。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１８／０２０１８８９Ａ１、もしくは同第ＵＳ２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のためのＴＩＬの細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、一過的に発現されるタンパク質をコードする核酸を送達することを可能にする。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１２３０】

Ｅ．免疫チェックポイント

本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ集団は、ＴＩＬ集団におけるＴＩＬ細胞の細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ集団における１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子修飾するように遺伝子編集される。別の言い方をすると、細胞表面で１つ以上の免疫調節組成物を発現させるようにＴＩＬ集団を改変することに加えて、ＴＩＬの１つ以上の免疫チェックポイントをコードするＴＩＬ内のＤＮＡ配列が、ＴＩＬのゲノム内で永続的に修飾される、例えば、挿入される、欠失される、または置換される。免疫チェックポイントは、阻害経路または刺激経路を介して免疫応答を調節するリンパ球によって発現される分子である。がんの場合、免疫チェックポイント経路は、しばしば活性化されて抗腫瘍応答を阻害する、すなわち、悪性細胞によるある特定の免疫チェックポイントの発現は、抗腫瘍免疫を阻害し、がん細胞の成長を促進する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。したがって、ある特定の阻害チェックポイント分子は、本発明の免疫療法の標的として機能する。特定の実施形態によれば、ＴＩＬは、ある特定の免疫チェックポイント経路を遮断または刺激し、それによって腫瘍に対する体の免疫学的活性を増強するように遺伝子編集される。

【１２３１】

本明細書で使用される場合、免疫チェックポイント遺伝子は、免疫チェックポイント分子をコードするＤＮＡ配列を含む。本発明の特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。例えば、遺伝子編集は、免疫反応を増強するために、ＰＤ－１またはＣＴＬＡ－４などの阻害性受容体の発現をサイレンシングまたは減少させ得る。

【１２３２】

最も広く研究されているチェックポイントには、プログラムされた細胞死受容体－１（ＰＤ－１）及び細胞傷害性Ｔリンパ球関連分子－４（ＣＴＬＡ－４）が含まれ、これらは、それらが阻害リガンドと相互作用するときに、主要なエフェクター機能（例えば、活性化、増殖、サイトカイン放出、細胞傷害性など）を阻害する免疫細胞上の阻害性受容体である。以下でさらに詳細に論じられるように、ＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４に加えて、多数のチェックポイント分子が免疫療法の潜在的な標的として浮上している。

【１２３３】

本発明のＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、Ｉ

ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。例えば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、Ｃｉｓｈ、ＣＢＬ－Ｂ、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＴＧＦβ、及びＰＫＡを含む群から選択されてもよい。ＢＡＦＦ（ＢＲ３）は、Ｂｌｏｏｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１８，ｉｎ　ｐｒｅｓｓに記載されている。別の実施例によれば、本発明のＴＩＬにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【１２３４】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択でＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガーシステムからなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系は、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＴＥＴ２、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＲＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、その分子の発現を阻害する。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）

を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２３５】

１．ＰＤ－１

チェックポイント遮断の誘導のために最も研究されている標的のうちの１つは、Ｔ細胞調節因子のＣＤ２８スーパーファミリーのメンバーであるプログラム死受容体（ＰＤ１またはＰＤ－１、ＰＤＣＤ１としても知られている）である。そのリガンドであるＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２は、メラノーマを含む様々な腫瘍細胞上で発現する。ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との相互作用は、Ｔ細胞エフェクター機能を阻害し、慢性刺激の設定においてＴ細胞疲弊をもたらし、腫瘍微小環境においてＴ細胞アポトーシスを誘導する。ＰＤ１はまた、免疫監視からの腫瘍特異的エスケープにおいても役割を果たし得る。

【１２３６】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ１の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＰＤ１の発現をサイレンシングまたは抑制することによって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＤ１などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ１の発現をサイレンシングまたは減少させることができる。

【１２３７】

２．ＣＴＬＡ－４

ＣＴＬＡ－４発現は、活性化Ｔ細胞上でのＴ細胞活性化時に誘導され、抗原提示細胞活性化抗原ＣＤ８０及びＣＤ８６との結合について競合する。ＣＴＬＡ－４とＣＤ８０またはＣＤ８６との相互作用は、Ｔ細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持するのに役立つ。しかしながら、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４相互作用の阻害は、Ｔ細胞の活性化を延長し、したがって、がん抗原に対する免疫応答のレベルを増加させ得る。

【１２３８】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＴＬＡ－４などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣＴＬＡ－４の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＴＬＡ－４の発現

をサイレンシングまたは減少させることができる。
【１２３９】
３．ＬＡＧ－３
リンパ球活性化遺伝子－３（ＬＡＧ－３、ＣＤ２２３）は、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩＩのライゲーション後に、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞によって発現される。その機序は不明なままであるが、その調節は、Ｔ細胞機能に対して負の調節効果を引き起こし、組織損傷及び自己免疫を防止する。ＬＡＧ－３及びＰＤ－１は、ＴＩＬ上でしばしば共発現及び上方制御され、免疫疲弊及び腫瘍成長につながる。したがって、ＬＡＧ－３遮断は、抗腫瘍応答を改善する。例えば、Ｍａｒｉｎ－Ａｃｅｖｅｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（２０１８）１１：３９を参照されたい。
【１２４０】
特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＬＡＧ－３の両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＬＡＧ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。特定の実施形態によれば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＬＡＧ－３の発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト ＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。
【１２４１】
４．ＴＩＭ－３
Ｔ細胞免疫グロブリン－３（ＴＩＭ－３）は、Ｔ細胞の直接的な負の調節因子であり、ＮＫ細胞及びマクロファージ上で発現する。ＴＩＭ－３は、骨髄由来サプレッサー細胞（ＭＤＳＣ）の拡張を誘導することにより、間接的に免疫抑制を促進する。そのレベルは、機能不全及び疲弊したＴ細胞で特に上昇することが見出されており、悪性腫瘍における重要な役割を示唆している。
【１２４２】
特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＭ－３などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＭ－３の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくと

も１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２４３】

５．Ｃｉｓｈ

サイトカインシグナル伝達（ＳＯＣＳ）ファミリーのサプレッサーのメンバーであるＣｉｓｈは、ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＴＣＲ刺激によって誘導され、腫瘍に対するそれらの機能的不活性を阻害する。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＣｉｓｈの遺伝的欠失は、それらの拡張、機能的親和性、及びサイトカイン多機能性を増強し得、確立された腫瘍の顕著で持続的な退縮をもたらす。例えば、Ｐａｌｍｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２１２（１２）：２０９５（２０１５）を参照されたい。

【１２４４】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣｉｓｈの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、Ｃｉｓｈなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣｉｓｈの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２４５】

６．ＴＧＦβ

ＴＧＦβシグナル伝達経路は、細胞増殖、分化、アポトーシス、運動性及び侵入、細胞外マトリックス産生、血管新生、ならびに免疫応答を調節することにおいて複数の機能を有する。ＴＧＦβシグナル伝達の調節解除は、腫瘍において頻繁に行われ、腫瘍の開始、発達及び転移において重要な役割を有する。微小環境レベルでは、ＴＧＦβ経路は、発がん全体にわたる腫瘍成長及び転移のための好ましい微小環境を生成することに寄与する。例えば、Ｎｅｕｚｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ＆Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１４７，ｐｐ．２２－３１（２０１５）を参照されたい。

【１２４６】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＧＦβの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、Ｔ

ＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＧＦβなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＧＦβの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２４７】

いくつかの実施形態では、ＴＧＦβＲ２（ＴＧＦベータ受容体２）は、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９系を使用してＴＧＦβＲ２をサイレンシングすることによって、または当該技術分野で知られている方法を使用してＴＧＦβＲ２優性陰性細胞外トラップを使用することによって抑制され得る。

【１２４８】

７．ＰＫＡ

タンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）は、セリン－スレオニンタンパク質キナーゼスーパーファミリーの周知のメンバーである。ｃＡＭＰ依存性タンパク質キナーゼとしても知られるＰＫＡは、ｃＡＭＰ結合時の活性化を介してＧタンパク質結合受容体のシグナル伝達を媒介するマルチユニットプロテインキナーゼである。それは、代謝からイオンチャネル活性化、細胞成長及び分化、遺伝子発現及びアポトーシスまでの多種多様な細胞プロセスの制御に関与する。重要なことに、ＰＫＡは、多くの腫瘍の開始及び進行に関与している。例えば、Ｓａｐｉｏ ｅｔ ａｌ．，ＥＸＣＬＩ Ｊｏｕｒｎａｌ；２０１４；１３：８４３－８５５．

【１２４９】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＰＫＡの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＰＫＡなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＰＫＡの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２５０】

８．ＣＢＬＢ

ＣＢＬＢ（またはＣＢＬ－Ｂ）は、Ｅ３ユビキチン－タンパク質リガーゼであり、Ｔ細胞活性化の負の制御因子である。Ｂａｃｈｍａｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０００，４０３，２１１－２１６、Ｗａｌｌｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，６９２６３９。

【１２５１】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＣＢＬＢの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＣＢＬＢなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＰＫＡの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＣＢＬ－Ｂの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ＣＢＬＢは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Ｂｏｅｔｔｃｈｅｒ ａｎｄ ＭｃＭａｎｕｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ，２０１５，５８，５７５－５８５に見出すことができる。

【１２５２】

９．ＴＩＧＩＴ

Ｉｇ及びＩＴＩＭ（免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ）ドメインまたはＴＩＧＩＴを有するＴ細胞免疫受容体は、Ｉｇ様Ｖ型ドメインを有し、その細胞質ドメイン内にＩＴＩＭを有する膜貫通糖タンパク質受容体である。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８、Ｙｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，２００９，Ｖｏｌ．１０，Ｎｏ．１，４８－５７。ＴＩＧＩＴは、いくつかのＴ細胞及びナチュラルキラー細胞によって発現される。さらに、ＴＩＧＩＴは、特にメラノーマを有する個体から、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＴＩＬ上で過剰発現することが示されている。研究では、ＴＩＧＩＴ経路が腫瘍免疫回避に寄与し、ＴＩＧＩＴ阻害がポリクローナル及び抗原特異的刺激に応答して、Ｔ細胞の活性化及び増殖を増加させることが示されている。Ｋｈａｌｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２０１５，１２８，１－６８。さらに、ＰＤ－１またはＴＩＭ３のいずれかとのＴＩＧＩＴの共遮断は、マウスモデルにおいて固形腫瘍に対する相乗効果を示している。Ｉｄ．；Ｋｕｒｔｕｌｕｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｈｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，２０１５，Ｖｏｌ．１２５，Ｎｏ．１１，４０５３－４０６２も参照されたい。

【１２５３】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは

減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＩＧＩＴなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。ＴＩＧＩＴは、ＴＡＬＥＮノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、ＴＩＧＩＴは、ＴＡＬＥ－ＫＲＡＢ転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Ｂｏｅｔｔｃｈｅｒ ａｎｄ ＭｃＭａｎｕｓ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｖｉｅｗ，２０１５，５８，５７５－５８５に見出すことができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＩＧＩＴの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。

【１２５４】

１０．ＴＯＸ

胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）は、ＨＭＧボックスＤＮＡ結合ドメインを含有する転写因子である。ＴＯＸは、配列非依存であるが構造依存的な方法でＤＮＡに結合すると考えられるＨＭＧボックススーパーファミリーのメンバーである。

【１２５５】

ＴＯＸは、腫瘍特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞機能障害またはＴ細胞枯渇の重要な調節因子として同定され、例えば、Ｓｃｏｔｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２７０－２７４及びＫｈａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２１１－２１８（これらの両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞疲弊を転写的かつ後成的にプログラムすることが見出された。ＴＯＸはまた、Ａｌｆｅｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２０１９，５７１，２６５－２６９（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、慢性感染中のＴ細胞機能不全の進行及び疲弊したＴ細胞の維持に対する重要な因子であることが見出された。ＴＯＸは、腫瘍及び慢性ウイルス感染からの機能不全または疲弊したＴ細胞において高度に発現される。インビトロでのエフェクターＴ細胞におけるＴＯＸの異所発現は、Ｔ細胞疲弊に関連する転写プログラムを誘導したが、Ｔ細胞におけるＴＯＸの欠失は、Ｔ疲弊プログラムを廃止した。

【１２５６】

特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＯＸの両方の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧＥＮ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬの細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、ＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でよ

り詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ＴＯＸなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬ中のＴＯＸの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、ＴＡＬＥＮ法を使用して、ＴＩＬ中のＰＤ－１及びＴＯＸの発現をサイレンシングまたは減少させることができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２５７】

Ｆ．共刺激受容体または接着分子の過剰発現

追加の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張法中の遺伝子編集ＴＩＬは、細胞表面における少なくとも１つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、１つ以上の共刺激受容体、接着分子及び／またはサイトカインの発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。例えば、遺伝子編集は、共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現を増強させ得、これは、遺伝子修飾されていない共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現と比較して、それが過剰発現されることを意味する。本発明のＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによって増強された発現を示し得る共刺激性受容体、接着分子またはサイトカイン遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２細胞内ドメイン（ＩＣＤ）、及び／またはＮＯＴＣＨリガンドｍＤＬＬ１などのある特定のケモカイン受容体及びインターロイキンが含まれる。

【１２５８】

１．ＣＣＲ

養子Ｔ細胞免疫療法が有効であるためには、Ｔ細胞をケモカインによって腫瘍内に適切に輸送する必要がある。腫瘍細胞によって分泌されるケモカイン、末梢に存在するケモカイン、及びＴ細胞によって発現されるケモカイン受容体との間の一致は、Ｔ細胞の腫瘍床への輸送を成功させるために重要である。

【１２５９】

特定の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上などのＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増加させてもよい。ＣＣＲの過剰発現は、エフェクター機能及び養子移植後のＴＩＬの増殖を促進するのに役立ち得る。

【１２６０】

特定の実施形態によれば、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧｅｎ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集して、ＴＩＬ中のＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３及びＣＸ３ＣＲ１のうちの１つ以上の細胞表面において少なくとも１つの免疫調節組成物を発現し、発現を増強することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２６１】

以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ケモカイン受容体遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増強することができる。

【１２６２】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子は、本明細書に記載のガンマ－レトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ＣＸＣＲ２接着分子は、Ｆｏｒｇｅｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２０１７，８，９０８またはＰｅｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，５４５８（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようなガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、ＴＩＬ集団に挿入される。

【１２６３】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガーシステムからなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択でＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＸＣＲ２接着分子を発現させる、またはＣＸＣＲ２接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつか

の実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２６４】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガーシステムからなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択で、ＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択で、ＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＣＲ４及び／またはＣＣＲ５接着分子を発現させる、またはＣＸＣＲ２接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。

【１２６５】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張

するための方法は、
（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、
（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、
（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを第２のＴＩＬ集団の複数の細胞に移入させることと、
（ｆ）第２のＴＩＬ集団を約１日間静置することと、
（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、
（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された第３のＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、
（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、
（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、
エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガーシステムからなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択で、ＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択で、ＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子を発現させる、または接着分子が、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合された免疫調節剤（例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質）を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０ＬまたはアゴニストＣＤ４０結合ドメイン）からなる群から選択される。
【１２６６】
２．インターロイキン
追加の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１のうちの１つ以上などのある特定のインターロイキンの発現を増加させてもよい。ある特定のインターロイキンは、Ｔ細胞のエフェクター機能を増加させ、腫瘍制御を媒介することが実証されている。
【１２６７】
特定の実施形態によれば、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、

ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１のうちの１つ以上のＴＩＬにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス２Ａ、プロセスＧｅｎ３、または図３４及び３５に示される方法）に従って実行することができ、方法は、ＴＩＬの少なくとも一部を、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８及びＩＬ－２１のうちの１つ以上の発現を増強することによって遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、インターロイキン遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはジンクフィンガー法を使用して、ＴＩＬにおけるある特定のインターロイキンの発現を増強することができる。

【１２６８】

いくつかの実施形態によれば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法は、

（ａ）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｂ）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（ｃ）ＩＬ－２を含み、任意選択で、ＯＫＴ－３及び／または４－１ＢＢアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３～１１日間培養することによって第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第２のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｄ）ＯＫＴ－３を添加し、約１～３日間培養することによって、第２のＴＩＬ集団を刺激して、第２のＴＩＬ集団を取得することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行が、系を開くことなく起こる、第２のＴＩＬ集団を取得することと、

（ｅ）第２のＴＩＬ集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも１つの遺伝子エディターを移入させることと、

（ｆ）第２のＴＩＬ集団を、第２のＴＩＬ集団内の複数の細胞内に約１日間静置することと、

（ｇ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加のＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３抗体、任意選択でＯＸ４０抗体、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することによって第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡張が、約７～１１日間行われ、第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（ｆ）からステップ（ｇ）への移行が、系を開くことなく起こる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、

（ｈ）ステップ（ｇ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取して、採取されたＴＩＬ集団を提供することであって、ステップ（ｇ）からステップ（ｈ）への移行が、系を開くことなく起こり、採取されたＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、採取することと、

（ｉ）採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（ｈ）から（ｉ）への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

（ｊ）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたＴＩＬ集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（ＣＲＩＳＰＲ）系、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）系、またはジンクフィンガーシステムからなる群から選択される少なくとも１つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞において、ＰＤ－１及び任意選択で、ＬＡＧ－３の細胞表面で少なくとも１つの免疫調節組成物を発現させ、ＰＤ－１及び任意選択で、ＬＡＧ－３の発現を阻害し、さらに少なくとも１つの遺伝子エディター系が、第２のＴＩＬ集団の複数の細胞の細胞表面でＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるインターロイキンを発現させる、またはインターロイキンが、ガンマレト

ロウイルスまたはレンチウイルス法によって第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、及びＩＬ－２１からなる群から選択される。

【１２６９】

ＩＩＩ．Ｇｅｎ２　ＴＩＬ製造プロセス

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

【１２７０】

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

【１２７１】

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

【１２７２】

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

【１２７３】

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

【１２７４】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、ＴＩＬは、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意選択でＴＩＬ健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【１２７５】

患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変サンプリングが使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変サンプリングを含む（すなわち、患者の１つ以上の腫瘍部位及び／または場所、ならびに同じ場所または近接した１つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得

る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から得られる。固形腫瘍は、皮膚組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用なＴＩＬは、黒色腫から取得される。

【１２７６】

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

【１２７７】

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

【１２７８】

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

【１２７９】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ Ｕ／ｍＬである。

【１２８０】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、１ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、１７５ＤＭＣ Ｕ／バイアルの濃度であ

り得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ～約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ～約４００ＤＭＣ／ｍＬ、約１００ＤＭＣ／ｍＬ、約１１０ＤＭＣ／ｍＬ、約１２０ＤＭＣ／ｍＬ、約１３０ＤＭＣ／ｍＬ、約１４０ＤＭＣ／ｍＬ、約１５０ＤＭＣ／ｍＬ、約１６０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７０ＤＭＣ／ｍＬ、約１７５ＤＭＣ／ｍＬ、約１８０ＤＭＣ／ｍＬ、約１９０ＤＭＣ／ｍＬ、約２００ＤＭＣ／ｍＬ、約２５０ＤＭＣ／ｍＬ、約３００ＤＭＣ／ｍＬ、約３５０ＤＭＣ／ｍＬ、または約４００ＤＭＣ／ｍＬである。

【１２８１】

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

【１２８２】

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

【１２８３】

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

【１２８４】

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

【１２８５】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【１２８６】
いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌ＨＢＳＳである。
【１２８７】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼＩＶである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【１２８８】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ＤＮＡｓｅを含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡｓｅの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【１２８９】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。
【１２９０】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【１２９１】
いくつかの実施形態では、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮＡｓｅ、及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。
【１２９２】
一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。
【１２９３】
いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、患者から取得された腫瘍試料を消化または断片化することから取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養され得る。
【１２９４】
腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップＡ（図１に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、１０、２０、３０、４０個またはそれ以上の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、３０または４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、４０個の断片または小片が、第１の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４～約５０個の断片を含み、各断片は、約２７mm^3の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３００mm^3～約１５００mm^3の総体積を有する約３０～約６０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１３５０mm^3の総体積を有する約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約１グラム～約１．５グラムの総質量を伴う約５０個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約４個の断片を含む。
【１２９５】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～１０mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3～８mm^3である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１mm^3である。いくつかの実

施形態では、腫瘍断片は、約２ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約３ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約４ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約５ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約６ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約７ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約８ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約９ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。

【１２９６】

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

【１２９７】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ　１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【１２９８】

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

【１２９９】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意選択で凍結され、ステップＢに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明され、図１及び図８にも例示される。

【１３００】

１．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【１３０１】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。開示される方法が胸水を利用するいくつかの実施形態では、同じ方法が、ＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で行われてもよい。

【１３０２】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１３０３】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられ、４℃で希釈される。

【１３０４】

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

【１３０５】
いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、さらなる処理で使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも４μＭであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、５μＭ以上であってもよく、他の実施形態では、６、７、８、９、または１０μＭのうちのいずれかである。濾過後、膜によって保持されたＴＩＬを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたＴＩＬを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで使用することができる。
【１３０６】
いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸水、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のＲＢＣを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、ＢＤ　Ｐｈａｒｍ　Ｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）が含まれる。他の溶解システムには、Ｖｅｒｓａｌｙｓｅ（商標）システム、ＦＡＣＳｌｙｓｅ（商標）システム（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）、Ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｐ（商標）システム、またはＥｒｙｔｈｒｏｌｙｓｅ　ＩＩシステム（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるＴＩＬ及びＴＩＬの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第２の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばＳｔａｂｉｌｙｓｅ（商標）試薬（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。
【１３０７】
いくつかの実施形態では、上記の本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約－１４０℃の温度で凍結保存される。
【１３０８】
Ａ１．ステップＡ１：進行前凍結保存
いくつかの実施形態では、本方法は、患者が、免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）療法、化学療法、及び／または他の標準的なケア治療などの少なくとも１つの前療法を受けたときまたは受けた後に、将来のＴＩＬ製造のために凍結保存されたＴＩＬ調製物を作製するために、ステップＡから得られた採取された腫瘍試料を凍結保存することを提供する。
【１３０９】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者のＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）の第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。
【１３１０】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得

及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）の第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。
【１３１１】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化器に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）の第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。
【１３１２】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）ステップ（ａ）の第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。
【１３１３】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）腫瘍を、腫瘍断片に断片化することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）の第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。
【１３１４】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。
【１３１５】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を解離して、解離した腫瘍物質を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からのＴＩＬの第１の集団を含む解離腫瘍材料を凍結保存して、凍結保存された解離腫瘍材料を産生することと、を含む。
【１３１６】
Ｂ．ステップＢ：第１の拡張
いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、若いＴＩＬを得ることを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８

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

【１３１７】

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

【１３１８】

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

【１３１９】

好ましい実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載の初期バルクＴＩＬ拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前と称されるプロセスを含み得る、図１または図８のステップＢに記載のものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載の第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続い

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

【１３２０】

ＴＩＬ培養物が２４ウェルプレートで開始される実施形態では、例えば、Ｃｏｓｔａｒ２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｅｄ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）を使用して、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ、Ｃｈｉｒｏｎ Ｃｏｒｐ．，Ｅｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＣＡ）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中の1×10^6個の腫瘍消化細胞または１つの腫瘍断片を、各ウェルに播種することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約$1mm^3$～$10mm^3$である。

【１３２１】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ １６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び$10cm^2$ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、各フラスコに、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の$10\sim40\times10^6$個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を装填した。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日に交換した。

【１３２２】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を有する不活性化ヒトＡＢ血清を含む培地中２ｍＬのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、ＡＰＣ細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１０～１４日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約1×10^8個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬは、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき$20\sim30\times10^6$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき20×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき25×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき30×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、$4\sim8\times10^6$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、$5\sim7\times10^6$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、6×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例５に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約

６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１３２３】

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

【１３２４】

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

【１３２５】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗ＣＤ３アゴニスト抗体、例えば、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０

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

【１３２６】

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

【１３２７】

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

【１３２８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ　１６４０からなる。培養物が４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底部（例えば、Ｇ－ＲＥＸ１０、Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、ＩＬ－２を含む１０～４０ｍＬのＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の生きた腫瘍消化細胞または５～３０個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。Ｇ－ＲＥＸ１０及び２４ウェルプレートの両方を、５％CO_2中３７℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から５日後、培地の半分を取り除き、新たなＣＭ及びＩＬ－２と交換し、５日後、培地の半分を２～３日に交換した。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例１を参照されたい。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む。

【１３２９】

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

【１３３０】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリ

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

【１３３１】

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

【１３３２】

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

【１３３３】

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

【１３３４】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の配合物も

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

【１３３５】

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

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

【１３３６】

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

【１３３７】

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

【１３３８】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリ

ンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１３３９】

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

【１３４０】

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

【１３４１】

【表５】

表４：非微量元素部分成分の濃度

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

【１３４２】

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

【１３４３】

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

【１３４４】
いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第１及び／または第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーター－メルカプトエタノール（ＢＭＥまたはβＭＥ、２－メルカプトエタノールとしても知られる、ＣＡＳ６０－２４－２）を欠いている。
【１３４５】
いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）プロセスは、３～１４日間に短縮される。いくつかの実施形態では、実施例で考察され、かつ図４及び図５に示されるように、例えば、図１のステップＢに記載される拡張も含む、第１の拡張（例えば、ＲＥＰ前と称されることもあるものを含み得る、図１のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含む）は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日間に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、例えば、図１のステップＢに記載される拡張において考察されるように、１１日に短縮される。
【１３４６】
いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、または１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１２日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１３日～１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、４日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、５日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、６日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、７日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、８日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、９日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１０日～１１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１１日間続行することができる。
【１３４７】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図１による、ならびに本明細書に記載されるステップＢのプロセ

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

【１３４８】

いくつかの実施形態では、第１の拡張（ＲＥＰ前と称されるプロセスを含む、例えば、図１によるステップＢ）プロセスは、実施例及び図で論じられるように、３～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、７～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップＢの第１の拡張は、１０～１４日に短縮される。いくつかの実施形態では、第１の拡張は、１１日に短縮される。

【１３４９】

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

【１３５０】

１．サイトカイン及び他の添加物

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

代替的に、ＴＩＬの急速拡張及びまたは第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２またはＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれ、後者は、多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５スーパーアゴニストを含むＩＬ－１５Ｒアゴニストは、培地に含まれる。

【１３５１】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【１３５２】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡張から第２の拡張へと移行

場合によっては、例えば、図１に示されるステップＢから取得されたＴＩＬ集団を含む、第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。代替的に、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡張から取得されたＴＩＬ集団は、以下で考察されるように、第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張を含み得る）に供され、その後、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬ

が治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）または第２のＴＩＬ集団（いくつかの実施形態では、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡張前または第１の拡張後及び第２の拡張前に、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１３５３】

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

【１３５４】

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

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

【１３５５】

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

【１３５６】

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

【１３５７】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡張

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

【１３５８】

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

【１３５９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図１のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ

から市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張され得、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭのＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ　００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で、３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意選択で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として照射された自己リンパ球または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【１３６０】

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

【１３６１】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含まない。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【１３６２】

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

追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【１３６３】

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

【１３６４】

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

【１３６５】

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

【１３６６】

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

【１３６７】

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

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

【１３６８】

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

【１３６９】

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

【１３７０】

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

【１３７１】

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

から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または２－メルカプトエタノールをさらに含む。

【１３７２】

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

【１３７３】

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

【１３７４】

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

【１３７５】

いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の配合物も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせ

であり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び５５ｍＭの２－メルカプトエタノールが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎ

10 20 30 40 50

ｓｉｏｎ　ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。

【１３７６】

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

【１３７７】

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

【１３７８】

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

【１３７９】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの濃度は、約５～３００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－メチオニンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌ

であり、Ｌ－フェニルアラニンの濃度は、約５～４００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－プロリンの濃度は、約１～１０００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－ヒドロキシプロリンの濃度は、約１～４５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－セリンの濃度は、約１～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－スレオニンの濃度は、約１０～５００ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－トリプトファンの濃度は、約２～１１０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－チロシンの濃度は、約３～１７５ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－バリンの濃度は、約５～５００ｍｇ／Ｌであり、チアミンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、還元型グルタチオンの濃度は、約１～２０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩の濃度は、約１～２００ｍｇ／Ｌであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約１～５０ｍｇ／Ｌであり、インスリンの濃度は、約１～１００ｍｇ／Ｌであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約０．０００００１～０．０００１ｍｇ／Ｌであり、アルブミン（例えば、ＡｌｂｕＭＡＸ（登録商標）Ｉ）の濃度は、約５０００～５０，０００ｍｇ／Ｌである。

【１３８０】

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

【１３８１】

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

【１３８２】

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

【１３８３】

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

【１３８４】

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

【１３８５】

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

では、第２の拡張は、１１日に短縮される。

【１３８６】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または第２の拡張は、以前に記載されたＴ－１７５フラスコ及びガス透過性バッグ（Ｔｒａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００８，３１，７４２－５１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００３，２６，３３２－４２）またはガス透過性培養器具（Ｇ－ＲＥＸフラスコ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第２の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、Ｔ－１７５フラスコ内で行われ、１５０ｍＬの培地に懸濁された約１×１０^{6}個のＴＩＬが、各Ｔ－１７５フラスコに添加され得る。ＴＩＬは、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した、１：１のＣＭとＡＩＭ－Ｖ培地との混合物中で培養され得る。Ｔ－１７５フラスコを、５％　CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。培地の半分を、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して５日目に交換することができる。いくつかの実施形態では、７日目に、２つのＴ－１７５フラスコからの細胞が３Ｌバッグ内で組み合わせられ得、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのＡＩＭ　Ｖが、３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、０．５～２．０×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞数を維持した。

【１３８７】

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

【１３８８】

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

【１３８９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにＴＩＬが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第２０１６／００１０

０５８Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのＴＩＬの選択に使用され得る。

【１３９０】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【１３９１】

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

【１３９２】

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

【１３９３】
Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって生成される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。
【１３９４】
いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。
【１３９５】
いくつかの実施形態では、第２の拡張、例えば、図１によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。
【１３９６】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速または第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。
【１３９７】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速または第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養由来のＴＩＬの一部が第２の小規模培養で約４～７日間培養される。
【１３９８】
いくつかの実施形態では、第１の小規模ＴＩＬ培養物は、ＴＩＬの複数の約２～５亜集団に配分される。
【１３９９】
いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張ステップは、複数のステップに分けら

れて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速または第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来のＴＩＬの一部がより大規模な培養で約４～７日間培養される。

【１４００】

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

【１４０１】

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

【１４０２】

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

【１４０３】

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

【１４０４】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。

【１４０５】

いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。

【１４０６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【１４０７】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつか

の実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【１４０８】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む。

【１４０９】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１４１０】

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

【１４１１】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【１４１２】

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

【１４１３】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

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

【１４１４】

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

【１４１５】

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

【１４１６】

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

【１４１７】

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

【１４１８】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの、抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１４１９】

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

【１４２０】

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

【１４２１】
一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順で使用される。
【１４２２】
いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、第２の拡張において使用される。
【１４２３】
２．サイトカイン及び他の添加物
本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にＩＬ－２を含む培養培地を使用する。
【１４２４】
あるいは、ＴＩＬの急速拡張及びまたは第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５スーパーアゴニストを含むＩＬ－１５Ｒアゴニストは、培地に含まれる。
【１４２５】
いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ中の培養培地で使用されてもよい。
【１４２６】
Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する
第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、１つ、２つ、３つ、４つ、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図１に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。
【１４２７】
ＴＩＬは、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、いずれかのかかる既知の方法が本プロセスで用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化システムを使用して採取される。
【１４２８】
細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．を含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎ

ｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【１４２９】

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

【１４３０】

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

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

【１４３１】

Ｆ．ステップＦ：最終配合物及び注入容器への移行

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

【１４３２】

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

【１４３３】

ＩＶ．Ｇｅｎ３　ＴＩＬ製造プロセス

いかなる特定の理論にも限定されることなく、本発明の方法に記載される、Ｔ細胞の活性化をプライミングする、プライミングによる第１の拡張と、それに続くＴ細胞の活性化を促進する急速な第２の拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたＴ細胞の調製が可能になると考えられ、したがって、本発明の拡張されたＴ細胞が、他の方法によって拡張されたＴ細胞よりも高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すことが予想される。特に、本発明の方法によって教示される、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及び任意選択で抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露によってプライミングされ、その後

、追加の抗ＣＤ－３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２、及びＡＰＣへのその後の曝露によって促進されるＴ細胞の活性化が、培養下でＴ細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞集団を生成し、これらのＴ細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、がん細胞に対するより高い細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴ細胞を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴ細胞を、第２の容器内のより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養由来のＴ細胞の一部が第２の小規模培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられ、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来のＴ細胞の一部がより大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられ、（ａ）Ｔ細胞を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴ細胞を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来のＴ細胞の一部がより大規模な培養で約５日間培養される。

【１４３４】

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

【１４３５】

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

【１４３６】

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

【１４３７】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、複数のステップに分割される前に、約１～５日間行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、急速拡張の開始後約１日目、２日目、３日目、４日目、または５日目に起こる。

【１４３８】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後約８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、または１３日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第１の拡張の開始後約１０日目に起こる。別の例示的な実施形態では、急速拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１１日目に起こる。

【１４３９】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約４～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【１４４０】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる構成要素を含む。

【１４４１】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む。

【１４４２】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地に、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮培養培地を補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１４４３】

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

【１４４４】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【１４４５】

いくつかの実施形態では、急速拡張中のＴＩＬ培養物のスケールアップは、新鮮細胞培養培地をＴＩＬ培養物に添加すること（ＴＩＬを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に頻繁に添加するこ

とを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をＴＩＬ培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してＴＩＬに供給される。いくつかの実施形態では、Ｘｕｒｉ　Ｗ２５などの自動細胞拡張システムは、急速拡張及び供給のために使用される。

【１４４６】

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

【１４４７】

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

【１４４８】

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

【１４４９】

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

【１４５０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張によってもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、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、または９９％減少した後に行われる。

【１４５１】

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

％減少した後に行われる。

【１４５２】

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

【１４５３】

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

【１４５４】

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

【１４５５】

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

【１４５６】

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

【１４５７】

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

【１４５８】

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

【１４５９】

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

【１４６０】

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

【１４６１】

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

【１４６２】

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

【１４６３】

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

【１４６４】

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

【１４６５】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。

【１４６６】

いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。
【１４６７】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）である。
【１４６８】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患しているドナーから取得される。
【１４６９】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、がんに罹患している患者から切除された腫瘍から取得されたＴＩＬである。
【１４７０】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、血液系悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から取得されたＭＩＬである。
【１４７１】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から取得されたＰＢＬである。
【１４７２】
いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。
【１４７３】
本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、Ｔ細胞は、ＦＩＣＯＬＬ分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフェレーシスによって取得される。アフェレーシス生成物は、典型的には、リンパ球、例えば、Ｔ細胞、単球、顆粒球、Ｂ細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフェレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択で、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、またはすべてではないが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、Ｔ細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、ＰＥＲＣＯＬＬ勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。
【１４７４】
いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ドナー由来のリンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス生成物から分離されたＰＢＬである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がんに罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）

、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、正または負の選択法を使用することによって、すなわち、Ｔ細胞表現型について、マーカー（複数可）、例えば、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋を使用してＰＢＬを除去することによって、または非Ｔ細胞表現型細胞を除去してＰＢＬを残すことによって、リンパ球が濃縮された全血またはアフェレーシス生成物から単離される。他の実施形態では、ＰＢＬは、勾配遠心分離によって単離される。ドナー組織からＰＢＬを単離した時点で、ＰＢＬのプライミングによる第１の拡張は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかのプライミングによる第１の拡張ステップに従って、プライミングによる第１の拡張培養下で好適な数の単離されたＰＢＬ（いくつかの実施形態では、およそ1×10^{7}ＰＢＬ）を播種することによって開始され得る。

【１４７５】

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

【１４７６】

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

【１４７７】

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

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

えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日に短縮され、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＤに記載される拡張）は、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＤに記載される拡張）は、９日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、８日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＤに記載される拡張）は、１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＤに記載される拡張）は、７～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＤに記載される拡張）は、８～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日間であり、急速な第２の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＤに記載される拡張）は、９～１０日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）においてステップＢとして記載される拡張）は、７日に短縮され、急速な第２の

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

【１４７８】

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

【１４７９】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍試料を取得する

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

【１４８０】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのＴＩＬを有することが報告されているため、有用なＴＩＬは、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

【１４８１】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して１～約８mm^3の小片に断片化され、約２～３mm^3が特に有用である。ＴＩＬは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＲＰＭＩ）１６４０緩衝液、２ｍＭ

グルタメート、１０ｍｃｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０単位／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって生成され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ１分間機械的に解離させ、続いて５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって生成することができる。このプロセスの終了時に、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、ＦＩＣＯＬＬ分岐親水性多糖を使用した密度勾配分離は、これらの細胞を除去するために、行われ得る。米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、ＴＩＬを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【１４８２】

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

【１４８３】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮａｓｅ、及び中性プロテアーゼを含む酵素混合物中で１～２時間、３７℃、５％CO_2で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、３７℃、５％CO_2で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【１４８４】

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

【１４８５】

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

【１４８６】

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

【１４８７】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形

態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０倍作業ストックである。

【１４８８】

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

【１４８９】

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

【１４９０】

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

【１４９１】

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

【１４９２】

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

【１４９３】

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

、約９ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約１０ｍｍ^{3}である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１～４ｍｍ×１～４ｍｍ×１～４ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、１ｍｍ×１ｍｍ×１ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、２ｍｍ×２ｍｍ×２ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、３ｍｍ×３ｍｍ×３ｍｍである。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、４ｍｍ×４ｍｍ×４ｍｍである。

【１４９４】

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

【１４９５】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ　１６４０（２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ）であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ１分間機械的に解離され得る。その後、溶液が５％CO_2中３７℃で３０分間インキュベートされ、その後、およそ１分間再び機械的に破壊され得る。５％CO_2中３７℃で３０分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ１分間、３回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、３回目の機械的破壊後、５％CO_2中３７℃でさらに３０分間インキュベートするかにかかわらず、１回または２回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ｆｉｃｏｌｌを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【１４９６】

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

【１４９７】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を取得した後及び／または腫瘍試料から細胞懸濁液を取得した後）、任意選択で凍結され得、ステップＢに記載の拡張に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図８（特に、例えば図８Ｂ）に例示される。

【１４９８】

１．コア／小生検由来のＴＩＬ

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

【１４９９】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原

発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さい腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の１、２、３、または４つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり得る。

【１５００】

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

【１５０１】

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

【１５０２】

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

【１５０３】

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

【１５０４】

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

【１５０５】

いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって取得される。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔をかけられ、小さい用具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さい用具を使用していくらかの組織を採取する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検が用いられ得る。一般に、経胸腔針生検の場合も、患者は麻酔をかけられ、針が皮膚を通して疑わしい場所に直接挿入されて、小さい組織試料を採取する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入放射線医学（例えば、針をガイドするためのＸ線またはＣＴ走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって取得される。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波内視鏡検査によって得られる（例えば、照明を備えた内視鏡であり、口を通して食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に取得される。

【１５０６】
いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。
【１５０７】
いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。
【１５０８】
「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺のがんが含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。
【１５０９】
いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（ＦＮＡ）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、１つまたは２つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１０に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－１００に入れられる。いくつかの実施形態では、３、４、５、６、８、９、または１０個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にＧ－ＲＥＸ－５００に入れられる。
【１５１０】
ＦＮＡは、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。
【１５１１】
ＦＮＡは、例えば、ＮＳＣＬＣを含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、ＮＳＣＬＣを有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。
【１５１２】

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

【１５１３】

いくつかの事例では、本明細書に記載のＴＩＬは、コア生検試料から取得される。いくつかの事例では、コア生検試料は、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得られるか、または単離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ、または１６ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のコア生検試料は、少なくとも４００，０００個のＴＩＬ、例えば、４００，０００個のＴＩＬ、４５０，０００個のＴＩＬ、５００，０００個のＴＩＬ、５５０，０００個のＴＩＬ、６００，０００個のＴＩＬ、６５０，０００個のＴＩＬ、７００，０００個のＴＩＬ、７５０，０００個のＴＩＬ、８００，０００個のＴＩＬ、８５０，０００個のＴＩＬ、９００，０００個のＴＩＬ、９５０，０００個のＴＩＬ、またはそれ以上を含み得る。

【１５１４】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【１５１５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【１５１６】

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

【１５１７】

いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ集団を取得することは、多病変サンプリング法を含む。

【１５１８】

腫瘍解離酵素混合物には、１つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン

、ＸＩＶ型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【１５１９】

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

【１５２０】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー１型コラゲナーゼなど）を、１０ｍＬの滅菌ＨＢＳＳまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、２８９２ＰＺ　Ｕ／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、５ｍＬ～１５ｍＬの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬの範囲、例えば、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ～約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約１５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２１０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２２０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２３０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２４０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２６０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２７０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約２８９．２ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３００ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、約３５０ＰＺ　Ｕ／ｍＬ、または約４００ＰＺ　Ｕ／ｍＬである。

【１５２１】

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

【１５２２】

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

【１５２３】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があるため、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに添加される酵素の最終量を修正する。

【１５２４】

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

【１５２５】

２．胸水Ｔ細胞及びＴＩＬ

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本

明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴ細胞またはＴＩＬの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのＴＩＬの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第ＵＳ２０１４／０２９５４２６号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【１５２６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬと思われる、及び／またはＴＩＬを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、ＮＳＣＬＣもしくはＳＣＬＣなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または膵嚢胞液を含む、ＴＩＬを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、ＴＩＬを含有する。本開示が胸水を例示するいくつかの実施形態では、同じ方法が、胸腔内液またはＴＩＬを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で実行されてもよい。

【１５２７】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、ＥＤＴＡまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、標準的なＣｅｌｌＳａｖｅ（登録商標）チューブ（Ｖｅｒｉｄｅｘ）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存ＴＩＬの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブに入れられる。生存ＴＩＬの数は、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、２４時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、４℃で、患者からの除去後１時間、５時間、１０時間、１５時間、または最大２４時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【１５２８】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１０である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：９である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：８である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：５である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：２である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が１：１である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にＣｅｌｌＳａｖｅチューブ内に入れられ、生存ＴＩＬの減少を回避し、これは、４℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、２４～４８時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後１時間、５時間、１０時間、１５時間、２４時間、３６時間、最大４８時間以内に適切な収集チューブ内に入れられ、４℃で希釈される。

【１５２９】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施す

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

【１５３０】

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

【１５３１】

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

【１５３２】

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

【１５３３】

３．末梢血から末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を拡張する方法

ＰＢＬ方法１．本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、本明細書に記載のプロセスを使用して拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、全血からＰＢＭＣ試料を取得することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非ＣＤ１９＋画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用して、ＰＢＭＣから純粋なＴ細胞を単離することによってＴ細胞を濃縮することを含む。

【１５３４】

本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ法１は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ　Ｔ

細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して単離する。
【１５３５】
ＰＢＬ方法２．本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、全血からＰＢＭＣ試料を得ることを含むＰＢＬ法２を使用して拡張される。ＰＢＭＣ由来のＴ細胞は、ＰＢＭＣを３７℃で少なくとも３時間インキュベートし、その後、非接着細胞を単離することによって濃縮される。
【１５３６】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ方法２は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＭＢＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣ細胞を、ＣＭ－２培地中の６ウェルプレートに６００万細胞／ウェルで播種し、３７℃で３時間インキュベートする。３時間後、ＰＢＬである非接着細胞を取り出し、計数する。
【１５３７】
ＰＢＬ方法３．本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬは、末梢血からＰＢＭＣ試料を取得することを含むＰＢＬ方法３を使用して拡張される。Ｂ細胞は、ＣＤ１９＋選択を使用して単離され、Ｔ細胞は、ＰＢＭＣ試料の非ＣＤ１９＋画分の負の選択を使用して選択される。
【１５３８】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＬ方法３は、以下のように行われる：０日目に、末梢血から取得された凍結保存されたＰＢＭＣを解凍し、計数する。ＣＤ１９＋Ｂ細胞を、ＣＤ１９ Ｍｕｌｔｉｓｏｒｔキット、ヒト（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して選別する。非ＣＤ１９＋細胞画分のうち、Ｔ細胞を、ヒトＰａｎ Ｔ細胞単離キット及びＬＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を使用して精製する。
【１５３９】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、全血試料から単離される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。いくつかの実施形態では、試料は、拡張プロセス前に凍結保存される。他の実施形態では、新鮮な試料が、ＰＢＬを拡張するための出発材料として使用される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている方法を使用してＰＢＭＣから単離される。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ヒトＴ汎細胞単離キット及びＬＳカラムを使用して単離される。本発明のいくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、ＣＤ１９の負の選択を使用して、ＰＢＭＣから単離される。
【１５４０】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、非接着細胞を特定するのに有効な所望の温度である期間インキュベートされる。本発明のいくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、約３時間である。本発明のいくつかの実施形態では、温度は、約３７℃である。その後、非接着細胞は、上記のプロセスを使用して拡張される。
【１５４１】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで任意選択で前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも１カ月間、少なくとも２カ月間、少なくとも３カ月間、少なくとも４カ月間、少なくとも５カ月間、少なくとも６カ月間、または１年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、イブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。
【１５４２】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されており、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどのＩＴＫ阻害剤での治療に不応性である対象または患者由来のものである。

【１５４３】
いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けていない対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、キナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはＩＴＫ阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも１カ月間、少なくとも２カ月間、少なくとも３カ月間、少なくとも４カ月間、少なくとも５カ月間、少なくとも６カ月間、または少なくとも１年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、ＩＴＫ阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも３カ月、少なくとも６カ月、少なくとも９カ月、または少なくとも１年以内に治療されていない患者に由来する。
【１５４４】
本発明のいくつかの実施形態では、０日目に、細胞がＣＤ１９＋について選択され、それに応じて選別される。本発明のいくつかの実施形態では、選択は、抗体結合ビーズを使用して行われる。本発明のいくつかの実施形態では、純粋なＴ細胞が、０日目にＰＢＭＣから単離される。
【１５４５】
本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療されていない患者の場合、１０～１５ｍＬのバフィーコートは、約５×１０^{9}個のＰＢＭＣを生成し、これは、次いで、約５．５×１０^{7}のＰＢＬを生成する。
【１５４６】
本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のＩＴＫ阻害剤で前治療された患者の場合、拡張プロセスは、約２０×１０^{9}のＰＢＬを生成する。本発明のいくつかの実施形態では、４０．３×１０^{6}個のＰＢＭＣは、約４．７×１０^{5}個のＰＢＬを生成する。
【１５４７】
前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。
【１５４８】
いくつかの実施形態では、ＰＢＬは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。
【１５４９】
４．骨髄由来のＰＢＭＣから骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）を拡張する方法
ＭＩＬ方法３．本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からＰＢＭＣを取得することを含む。０日目に、ＰＢＭＣがＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋について選択され、選別され、非ＣＤ３＋／ＣＤ３３＋／ＣＤ２０＋／ＣＤ１４＋細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加される。
【１５５０】
本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬ法３は、以下のように行われる：０日目に、凍結保存されたＰＢＭＣ試料を解凍し、ＰＢＭＣを計数する。細胞を、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ２０、及びＣＤ１４抗体で染色し、選別されたＳ３ｅ細胞（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはＭＩＬ画分）（ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）及びＡＭＬ芽球画分（非ＣＤ３＋ＣＤ３３＋ＣＤ２０＋ＣＤ１４＋）の２つの画分に選別する。
【１５５１】
本発明のいくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、アフェレーシス、吸引、針生検、または当該技術分野で知られて

いる他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、新鮮である。他の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結保存される。

【１５５２】

本発明のいくつかの実施形態では、ＭＩＬは、１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、１０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、２０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、３０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、４０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、５０ｍＬの骨髄穿刺液が患者から取得される。

【１５５３】

本発明のいくつかの実施形態では、約１０～５０ｍＬの骨髄穿刺液から生成されたＰＢＭＣの数は、約5×10^{7}～約10×10^{7}個のＰＢＭＣである。他の実施形態では、生成されたＰＭＢＣの数は、約7×10^{7}個のＰＢＭＣである。

【１５５４】

本発明のいくつかの実施形態では、約5×10^{7}～約10×10^{7}個のＰＢＭＣが、約0.5×10^{6}～約1.5×10^{6}個のＭＩＬを生成する。本発明のいくつかの実施形態では、約1×10^{6}個のＭＩＬが、生成される。

【１５５５】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液に由来する12×10^{6}個のＰＢＭＣは、およそ1.4×10^{5}個のＭＩＬを生成する。

【１５５６】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、ＰＢＭＣは、全血試料から、骨髄から、アフェレーシスによって、バフィーコートから、またはＰＢＭＣを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【１５５７】

いくつかの実施形態では、ＭＩＬは、米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０３４７３５０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【１５５８】

Ａ１．ステップＡ１：進行前凍結保存

いくつかの実施形態では、本方法は、患者が、免疫チェックポイント阻害剤（ＩＣＩ）療法、化学療法、及び／または標準的なケア治療などの少なくとも１つの前療法を受けたときまたは受けた後に、将来のＴＩＬ製造のために凍結保存されたＴＩＬ調製物を作製するために、ステップＡから得られた採取された腫瘍試料を凍結保存することを提供する。

【１５５９】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者のＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。

【１５６０】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、

（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。

【１５６１】

いくつかの実施形態では、凍結保存は、

（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化器に処理

することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。
【１５６２】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む試料を凍結保存して、凍結保存された試料を産生することと、を含む。
【１５６３】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者からＮＳＣＬＣ腫瘍を切除することであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはＮＳＣＬＣ腫瘍から腫瘍細胞とＴＩＬ細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第１のＴＩＬ集団を含む、切除することと、
（ｂ）腫瘍を、腫瘍断片に断片化することと、
（ｃ）ステップ（ｂ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍断片を凍結保存して、凍結保存された腫瘍断片を産生することと、を含む。
【１５６４】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を酵素培地中で消化して、腫瘍消化物を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からの第１のＴＩＬ集団を含む腫瘍消化物を凍結保存して、凍結保存された腫瘍消化物を産生することと、を含む。
【１５６５】
いくつかの実施形態では、凍結保存は、
（ａ）少なくとも１つの前治療の前に、対象または患者から切除された腫瘍組織から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、
（ｂ）腫瘍組織を解離して、解離した腫瘍物質を産生することと、
（ｃ）ステップ（ａ）からのＴＩＬの第１の集団を含む解離腫瘍材料を凍結保存して、凍結保存された解離腫瘍材料を産生することと、を含む。
【１５６６】
Ｂ．ステップＢ：プライミングによる第１の拡張
いくつかの実施形態では、本方法は、より古いＴＩＬ（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたＴＩＬ）よりも追加の治療的利益を提供し得る、より若いＴＩＬを提供する。若いＴＩＬの特徴は、文献、例えば、Ｄｏｎｉａ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，７５，１５７－１６７、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１０，１６，６１２２－６１３１、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，２５８－２６７、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１３，１９，ＯＦ１－ＯＦ９、Ｂｅｓｓｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，３２，４１５－４２３、Ｒｏｂｂｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４，１７３，７１２５－７１３０、Ｓｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００７，３０，１２３－１２９、Ｚｈｏｕ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００５，２８，５３－６２、及びＴｒａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００８，３１，７４２－７５１に記載されており、これらの各々は

参照により本明細書に組み込まれる。

【１５６７】

例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＡに記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好む条件下で、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、０日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、容器につき最大６０個の断片及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、１～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、５～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約６～７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７～８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約７日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第１の拡張は、約８日間起こり、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞をもたらす。

【１５６８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの拡張は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張ステップ（例えば、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるプロセスを含み得、０日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなど）、続いて以下のステップＤ及び本明細書に記載される急速な第２の拡張（ステップＤ、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意選択の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第２のステップＤ（再刺激ＲＥＰステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる。このプロセスから取得されたＴＩＬは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意選択で、特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約$１mm^{3}$～$１０mm^{3}$である。

【１５６９】

いくつかの実施形態では、第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭＨｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ　１６４０からなる。

【１５７０】
いくつかの実施形態では、２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、６０個以下の腫瘍断片が１つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、容器につき５００ｍＬ以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１５７１】
腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長を好み、かつ０日目の培養開始からＴＩＬプライミング及び加速された成長を可能にする条件下で、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む培地中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３とインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に１～８日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×10^8個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に１～７日間培養され、その結果、バルクＴＩＬ集団、一般に約１×10^8個のバルクＴＩＬ細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中の成長培地は、ＩＬ－２またはそのバリアント、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０～３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき２５×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、１ｍｇバイアルにつき３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、４～８×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、５～７×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、６×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２ストック溶液は、実施例Ｃに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約１０，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、または約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では

、プライミングによる第１の拡張培養培地は、約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。ある実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１５７２】

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

【１５７３】

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

の拡張細胞培養培地は、約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。
【１５７４】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。例えば、表１を参照されたい。
【１５７５】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストであり、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、ＥＵ－１０１、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリアント、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。
【１５７６】
いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３抗体を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストに加えて、プライミングによる第１の拡張細胞培養培地は、ＩＬ－２を約６０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で、及びＯＫＴ－３抗体を約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度でさらに含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストが、４－１ＢＢアゴニストを含む。
【１５７７】
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培養培地は、培養培地の略語である「ＣＭ」と称される。いくつかの実施形態では、それは、ＣＭ１（培養培地１）と称される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充した、ＧｌｕｔａＭＡＸを含むＲＰＭＩ１６４０からなる。いくつかの実施形態では、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張培地または初期細胞培養培地または第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。
【１５７８】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基

礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【１５７９】

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

【１５８０】

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

【１５８１】

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

【１５８２】

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

、無血清または合成培地の総体積の約１０％である。
【１５８３】
いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の配合物も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されており、培地中の２－メルカプトエタノールの最終濃度は、５５μＭである。
【１５８４】
いくつかの実施形態では、合成培地は、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）の任意の配合物も、本発明において有用である。ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭは、１ＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍと、２６ｍＬのＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、５５ｍＭの２－メルカプトエタノールとともに、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）が補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約１０００ＩＵ／ｍＬ～約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、５５ｍＭの２－メルカプトエタノール、及び２ｍＭのＬ－グルタミンが補充されており、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔ

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

【１５８５】

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

【１５８６】

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

【１５８７】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際ＰＣＴ公開第ＷＯ／１９９８／０３０６７９号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。そ

の刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーター－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１５８８】

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

【１５８９】

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

【１５９０】

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

【１５９１】

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

【１５９２】

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

【１５９３】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及

び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図１（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７～８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、８日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、１～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、２～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、３～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、４～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば、図８Ｂ及び／または図８Ｃ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることがあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、５～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、６～７日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８

Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＢに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、ＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、７日間である。

【１５９４】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬ拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日間続行することができる。

【１５９５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１のＴＩＬの拡張は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、１日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、２日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１のＴＩＬ拡張は、３日～７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第１の

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

【１５９６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＢのプロセス中を含む、プライミングによる第１の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、プライミングによる第１の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＢのプロセス中に含まれ得る。

【１５９７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１０またはＧ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１０である。

【１５９８】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングの第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の

開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～８日目の任意の時点でプライミングの第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ４～７日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～８日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ５～７日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～８日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングの第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ６～７日目の任意の時点でプライミングの第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７または８日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー

細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ７日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む）は、ＴＩＬ拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ８日目の任意の時点でプライミングによる第１の拡張中に追加される。

【１５９９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ｂ）からのステップＢに記載されるもの、ならびにＲＥＰ前またはプライミングＲＥＰと称されるものなどの拡張を含む））は、ＴＩＬ拡張の開始時及びプライミングによる第１の拡張中にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要する。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、2.5×10^{8}個のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器につき2.5×10^{8}個のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１０当たり2.5×10^{8}個のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、ＧＲＥＸ－１００当たり2.5×10^{8}個のフィーダー細胞が、プライミングによる第１の拡張中に使用される。

【１６００】

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

【１６０１】

いくつかの実施形態では、１４日目の総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１６０２】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１６０３】

いくつかの実施形態では、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第１の拡張の０日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。い

くつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１６０４】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの、抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、１：１００～１：２００である。

【１６０５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8個のフィーダー細胞：約１００×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8個のフィーダー細胞：約５０×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、約２．５×10^8個のフィーダー細胞：約２５×10^6個のＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張は、約２．５×10^8個のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５、または半分を必要とする。

【１６０６】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、容器につき２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき５００ｍＬの培養培地及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき５００ｍＬの培養培地及び１５μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、ＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ－３、及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき５００ｍＬの培養培地及び２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞当たり１５μｇのＯＫＴ－３を含む。

【１６０７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張手順は、第２の拡張中にＴＩＬを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。

【１６０８】

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

【１６０９】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替物として、またはＰＢＭＣと組み合わせて、プライミングによる第１の拡張において使用される。

【１６１０】

２．サイトカイン及び他の添加物

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

【１６１１】

代替的に、ＴＩＬのプライミングによる第１の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。例えば、表２を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５スーパーアゴニストを含むＩＬ－１５Ｒアゴニストは、培地に含まれる。

【１６１２】

いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＢはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＢ中の培養培地で使用されてもよい。

【１６１３】

Ｃ．ステップＣ：プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行

場合によっては、例えば図８（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるようにステップＢから取得されるＴＩＬ母集団を含む、プライミングによる第１の拡張から取得されたバルクＴＩＬ母集団（ＲＥＰ前と称されることもある拡張を含み得る）は、急速な第２の拡張（これは、急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、プライミングによる第１の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団または急速な第２の拡張由来の拡張ＴＩＬ集団は、拡張ステップ前またはプライミングによる

第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【１６１４】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるステップＢから）取得されたＴＩＬは、保管されず、急速な第２の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から取得されたＴＩＬは、プライミングによる第１の拡張後及び急速な第２の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから約８日で起こる。

【１６１５】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、または８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから１日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによ

る第１の拡張ステップが開始されたときから１日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから２日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから３日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから４日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから５日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから６日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日～８日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから７日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第１の拡張ステップが開始されたときから８日で起こる。

【１６１６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、初期第１の拡張後、及び急速な第２の拡張前に保管されず、ＴＩＬは、急速な第２の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるようにステップＢからステップＤへの移行中の保管がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張由来のＴＩＬである第２のＴＩＬ集団は、移行期間なしで急速な第２の拡張に直接進む。

【１６１７】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクタ

ーは、例えば、ＧＲＥＸ－１０またはＧＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、急速な第２の拡張よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張は、ＧＲＥＸ－１００内で行われ、急速な第２の拡張は、ＧＲＥＸ－５００内で行われる。

【１６１８】

Ｄ．ステップＤ：急速な第２の拡張

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ細胞集団は、採取及びプライミングによる第１の拡張後、ステップＡ及びステップＢ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように、ステップＣと称される移行後に数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では急速な第２の拡張または急速拡張と称され、これは、当該技術分野で概して急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはＲＥＰ、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＤに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。急速な第２の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗ＣＤ３抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張開始の１日、２日、３日、または４日後（すなわち、Ｇｅｎ３プロセス全体の８、９、１０、または１１日目）に、ＴＩＬは、より大容量の容器に移される。

【１６１９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの急速な第２の拡張（ＲＥＰと称されることもある拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のＴＩＬフラスコまたは容器を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、または１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約９日間続行することができる。い

くつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日～約１０日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約２日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約３日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約４日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約５日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約６日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約７日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約８日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約９日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第２のＴＩＬ拡張は、急速な第２の拡張の開始後、約１０日間続行することができる。

【１６２０】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＤに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での急速な第２の拡張において拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びフィーダー細胞の存在下での急速な第２の拡張において拡張され、フィーダー細胞は、プライミングによる第１の拡張において存在するフィーダー細胞の濃度の２倍、２．４倍、２．５倍、３倍、３．５倍、または４倍である最終濃度まで追加される。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的Ｔ細胞受容体刺激は、例えば、抗ＣＤ３抗体、例えば約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪもしくはＭｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販）またはＵＨＣＴ－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販）を含み得る。ＴＩＬは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第２の拡張中に１つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでＴＩＬのさらなる刺激を誘導するように拡張され得、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭのＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）またはｇｐｌ ００：２０９－２１７（２１０Ｍ）から、任意選択で、３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２またはＩＬ－１５などのＴ細胞成長因子の存在下で任意選択で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼがん抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２、及びＶＥＧＦＲ２、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。代替的に、ＴＩＬは、例えば、例として照射された自己リンパ球または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第２の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２を用いて起こる。

【１６２１】
いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＩＬ－２をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約１０００ＩＵ／ｍＬ、約１５００ＩＵ／ｍＬ、約２０００ＩＵ／ｍＬ、約２５００ＩＵ／ｍＬ、約３０００ＩＵ／ｍＬ、約３５００ＩＵ／ｍＬ、約４０００ＩＵ／ｍＬ、約４５００ＩＵ／ｍＬ、約５０００ＩＵ／ｍＬ、約５５００ＩＵ／ｍＬ、約６０００ＩＵ／ｍＬ、約６５００ＩＵ／ｍＬ、約７０００ＩＵ／ｍＬ、約７５００ＩＵ／ｍＬ、または約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ、または８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【１６２２】
いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約２．５ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約７．５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約１５ｎｇ／ｍＬ、約２０ｎｇ／ｍＬ、約２５ｎｇ／ｍＬ、約３０ｎｇ／ｍＬ、約３５ｎｇ／ｍＬ、約４０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約６０ｎｇ／ｍＬ、約７０ｎｇ／ｍＬ、約８０ｎｇ／ｍＬ、約９０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ、及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬ～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、ＯＫＴ－３抗体は、ムロモナブである。

【１６２３】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器につき７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、容器につき５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培地中に、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき５００ｍＬの培養培地、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１６２４】
いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器につき５×10^8～７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、ＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器につき５００ｍＬ

の培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３、及び５×１０^{8}～７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張における培地は、容器につき５００ｍＬの培養培地、ならびに６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３、及び５×１０^{8}～７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【１６２５】

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

【１６２６】

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

【１６２７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）による、ならびに本明細書に記載されるステップＤのプロセス中を含む、第２の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせは、第２の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋによる、及び本明細書に記載されるステップＤのプロセス中に含まれ得る。

【１６２８】

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

【１６２９】

いくつかの実施形態では、第２の拡張培養培地は、約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、約１６０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、

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

【１６３０】

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

【１６３１】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬの、ＰＢＭＣ及び／または抗原提示細胞に対する比は、約１：１０、約１：１５、約１：２０、約１：２５、約１：３０、約１：３５、約１：４０、約１：４５、約１：５０、約１：７５、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００、約１：３２５、約１：３５０、約１：３７５、約１：４００、または約１：５００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：５０～１：３００である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第２の拡張におけるＴＩＬのＰＢＭＣに対する比は、１：１００～１：２００である。

【１６３２】

いくつかの実施形態では、ＲＥＰ及び／または急速な第２の拡張は、バルクＴＩＬを１００倍または２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞と混合してフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、１５０ｍＬ培地中のプライミングによる第１の拡張、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１×）、１．２倍、１．３倍、１．４倍、１．５倍、１．６倍、１．７倍、１．８倍、１．９倍、２倍、２．１倍、２．２倍、２．３倍、２．４倍、２．５倍、２．６倍、２．７倍、２．８倍、２．９倍、３．０倍、３．１倍、３．２倍、３．３倍、３．４倍、３．５倍、３．６倍、３．７倍、３．８倍、３．９倍または４．０倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の３分の２の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、３分の２培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われ

る。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、Ｇ－ＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１６３３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で論じられるように、７～９日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、７日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、８日間である。いくつかの実施形態では、第２の拡張は、９日間である。

【１６３４】

いくつかの実施形態では、第２の拡張（ＲＥＰと称される拡張、ならびに図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＤで参照される拡張を含み得る）は、１００ｃｍのガス透過性シリコン底部（Ｇ－ＲＥＸ－１００、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＮ，ＵＳＡから市販）を有する５００ｍＬ容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。５×１０^{6}または１０×１０^{6}ＴＩＬは、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充された４００ｍＬの５０／５０培地中でＰＢＭＣとともに培養され得る。Ｇ－ＲＥＸ－１００フラスコを、５％CO_2中３７℃でインキュベートすることができる。５日目に、２５０ｍＬの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心分離され得る。ＴＩＬペレットが、５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮な培地で再懸濁され、元のＧＲＥＸ－１００フラスコに戻し追加され得る。ＴＩＬがＧＲＥＸ－１００フラスコで連続して拡張される場合、１０日目または１１日目に、ＴＩＬは、ＧＲＥＸ－５００などのより大きいフラスコに移され得る。培養１４日目に、細胞が採取され得る。培養１５日目に、細胞が採取され得る。培養１６日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の３分の２は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、ＧＲＥＸフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【１６３５】

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

【１６３６】

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

【１６３７】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｅｒｕｍ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎ

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

【１６３８】

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

【１６３９】

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

【１６４０】

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

【１６４１】

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

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

では、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭには、約３％のＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ Ｓｅｒｕｍ Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（ＳＲ）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び約２ｍＭのグルタミンが補充されており、約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をさらに含む。

【１６４２】

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

【１６４３】

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

【１６４４】

いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第ＷＯ１９９８／０３０６７９号及び米国特許出願公開第ＵＳ２００２／００７６７４７Ａ１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、１つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、１つ以上の微量元素、及び１つ以上の抗生物質からなる群から選択される１つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、Ｌ－グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベータ－メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、１つ以上のアミノ酸、１つ以上のビタミン、１つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、１つ以上の抗酸化剤、１つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、１つ以上のコラーゲン前駆体、及び１つ以上の微量元素からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－プロリン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン、チアミン、還元型グルタチオン、Ｌ－アスコルビン酸－２－リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Ｂｒ、Ｔ、Mn^{2+}、Ｐ、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}、及びZr^{4+}を含有する化合物からなる群から選択される１つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、最小必須培地（ＭＥＭ）、イーグル基礎培地（ＢＭＥ）、ＲＰＭＩ１６４０、Ｆ－１０、Ｆ－１２、最小必須培地（αＭＥＭ）、グラスゴー最小必須培地（Ｇ－ＭＥＭ）、ＲＰＭＩ成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【１６４５】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約５～２００ｍｇ／Ｌの範囲であり、Ｌ－ヒスチジンの濃度は、約５～２５０ｍｇ／Ｌであり、Ｌ－イソロイシンの

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

【１６４６】

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

【１６４７】

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

【１６４８】

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

【１６４９】

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

【１６５０】

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

【１６５１】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、急速な第２の拡張（ＲＥＰ拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば

、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ試料は、Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２自動セルカウンター（Ｎｅｘｃｅｌｏｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のＣｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ｋ２　Ｉｍａｇｅ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒプロトコルに従って決定される。

【１６５２】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって生成される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第２の拡張において取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【１６５３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、ならびに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張培養培地（例えば、ＣＭ２または第２の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇ／フラスコのＯＫＴ－３、ならびに５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【１６５４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【１６５５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養でのＴＩＬを、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００－ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来のＴＩＬを、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。

【１６５６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された第１の小規模培養由来のＴＩＬの一部が第２の小規模培養で約４～７日間培養される。

【１６５７】

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

【１６５８】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）ＴＩＬを、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～７日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来のＴＩＬを、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来のＴＩＬの一部がより大規模な培養で約４～７日間培養される。

【１６５９】

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

【１６６０】

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

【１６６１】

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

【１６６２】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、急速または第２の拡張の完了後、１つ以上のＴ

ＩＬの亜集団を一緒にプールして、治療有効量のＴＩＬを生成する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、ＴＩＬの各亜集団は、治療有効量のＴＩＬを含む。

【１６６３】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、複数のステップに分割される前に、約３～７日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、急速または第２の拡張の開始後約３日目、４日目、５日目、６日目、または７日目に起こる。

【１６６４】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張の分裂は、第１の拡張（すなわち、ＲＥＰ前拡張）の開始後の約７日目、８日目、９日目、１０日目、１１日目、１２日目、１３日目、１４日目、１５日目、または１６日目、１７日目、または１８日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第２の拡張の分裂は、第１の拡張の開始後約１６日目に起こる。

【１６６５】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約７～１１日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張は、分裂後約５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日間、さらに行われる。

【１６６６】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【１６６７】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びさらに任意選択でＡＰＣを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む。

【１６６８】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、任意選択でＯＫＴ－３及びさらに任意選択でＡＰＣを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第２の拡張に使用される細胞培養培地は、第１の拡張中の細胞培養培地を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【１６６９】

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

【１６７０】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される急速な第２の拡張手順（例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＤに記載されるような拡張、ならびにＲＥＰと称されるものを含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡張中及び／または急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者からの標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【１６７１】

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

【１６７２】

いくつかの実施形態では、７日目または１４日目の総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。

【１６７３】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１６７４】

いくつかの実施形態では、７日目及び１４日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された総生細胞数が、ＲＥＰの０日目及び／または第２の拡張の０日目（すなわち、第２の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、ＰＢＭＣは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【１６７５】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、ＰＢＭＣである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第２の拡張におけるＴＩＬの、抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約１：１０、約１：２５、約１：５０、約１：１００、約１：１２５、約１：１５０、約１：１７５、約１：２００、約１：２２５、約１：２５０、約１：２７５、約１：３００

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

【１６７６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約１００×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約１００×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約５０×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約５０×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約２５×１０^{6}個のＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第２の拡張手順は、約７．５×１０^{8}個のフィーダー細胞：約２５×１０^{6}個のＴＩＬを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、急速な第２の拡張の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第１の拡張が約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第２の拡張は、約７．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第２の拡張は、プライミングによる第１の拡張の２倍（２．０倍）、２．５倍、３．０倍、３．５倍、または４．０倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【１６７７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第２の拡張手順は、急速な第２の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞がＰＢＭＣの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣは、プライミングによる第１の拡張に追加されたＰＢＭＣの２倍の濃度で、急速な第２の拡張に追加される。

【１６７８】

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

【１６７９】

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

【１６８０】

２．サイトカイン及び他の添加物

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

【１６８１】

代替的に、ＴＩＬの急速な第２の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第ＵＳ２０１７／０１０７４９０Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１のうちの２つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、ＩＬ－２及びＩＬ－１５、ＩＬ－２及びＩＬ－２１、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載さ

れているようにＴ細胞の生成に特に有利に働く。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５スーパーアゴニストを含むＩＬ－１５Ｒアゴニストは、培地に含まれる。

【１６８２】

いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＫＴ－３抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、４－１ＢＢアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップＤ（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、ＯＸ－４０アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（ＰＰＡＲ）－ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターＩ－アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／０３０７７９６　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップＤ（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋから）中の培養培地で使用されてもよい。

【１６８３】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬを採取する

急速な第２の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるように、１、２、３、４、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるように、２つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、２つの拡張ステップ、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるように、１回のプライミングによる第１の拡張及び１回の急速な第２の拡張の後に採取される。

【１６８４】

ＴＩＬは、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。ＴＩＬを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、任意のかかる既知の方法が本プロセスとともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、自動化システムを使用して採取される。

【１６８５】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉ、Ｔｏｍｔｅｃ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、及びＩｎｏｔｅｃｈ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．を含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、ＬＯＶＯシステム（Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ　Ｋａｂｉによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。

「ＬＯＶＯ細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

【１６８６】

いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がＴＩＬ拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００またはＧ－ＲＥＸ－５００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－１００である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、Ｇ－ＲＥＸ－５００である。

【１６８７】

いくつかの実施形態では、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）によるステップＥは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような閉鎖系が用いられる。

【１６８８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、１４～１６日目のＴＩＬが本明細書に記載の方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１４日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１５日目に採取される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載の方法を使用して１６日目に採取される。

【１６８９】

Ｆ．ステップＦ：最終配合物及び注入容器への移行

図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のＴＩＬが上記の拡張方法を使用して取得されると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【１６９０】

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

【１６９１】

Ｖ．さらなるＧｅｎ２、Ｇｅｎ３、及び他のＴＩＬ製造プロセスの実施形態

Ａ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比
　いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）は、抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【１６９２】
　いくつかの実施形態では、ＰＢＭＣフィーダー層の数は、以下のように計算される：
Ａ．Ｔ細胞の体積（１０μｍ直径）：Ｖ＝（４／３）πｒ^{3}＝５２３．６μｍ^{3}
Ｂ．４０μｍ（４細胞）の高さを有するＧ－ＲＥＸ－１００（Ｍ）のカラム：Ｖ＝（４／３）πｒ^{3}＝４×１０^{12}μｍ^{3}
Ｃ．カラムＢを充填するために必要な細胞数：４×１０^{12}μｍ^{3}／５２３．６μｍ^{3}＝７．６×１０^{8}μｍ^{3}＊０．６４＝４．８６×１０^{8}
Ｄ．四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数：４．８６×１０^{8}／２４＝２０．２５×１０^{6}
Ｅ．Ｇ－ＲＥＸ－５００に外挿されるフィーダー及びＴＩＬの数：ＴＩＬ：１００×１０^{6}及びフィーダー：２．５×１０^{9}
この計算では、１００ｃｍ^{2}の底部を有するシリンジ中でのＴＩＬの活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、Ｊｉｎ，　ｅｔ．ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，３５，２８３－２９２に記載されているように、ＮＣＩ実験データを密接に反映するＴ細胞の閾値活性化について、約５×１０^{8}の実験結果を導き出す。（Ｃ）では、乗数（０．６４）は、Ｊａｅｇｅｒ　ａｎｄ　Ｎａｇｅｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９２，２５５，１５２３－３によって計算された等価球のランダム充填密度である。（Ｄ）において、除数２４は、Ｍｕｓｉｎ，Ｒｕｓｓ．Ｍａｔｈ．Ｓｕｒｖ．，２００３，５８，７９４－７９５に記載される、四次元空間内の同様のオブジェクトと接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。
【１６９３】
　いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、本方法は、急速な第２の拡張の細胞培養培地と比較しておよそ５０％少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第１の拡張を行うことを含む。
【１６９４】
　他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数よりも多い。
【１６９５】
　他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。
【１６９６】
　他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１６９７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択される。

【１６９８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。

【１６９９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。

【１７００】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。

【１７０１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。

【１７０２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。

【１７０３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数のプライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。

【１７０４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。

【１７０５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。

【１７０６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。

【１７０７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。

【１７０８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【１７０９】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約

１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１７１０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【１７１１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【１７１２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【１７１３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。
【１７１４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１７１５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１７１６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【１７１７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【１７１８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１７１９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１７２０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【１７２１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１７２２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。

【１７２３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。

【１７２４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。

【１７２５】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。

【１７２６】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。

【１７２７】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【１７２８】

他の実施形態では、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数の、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【１７２９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8、または3.5×10^8個のＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4

×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}個のＡＰＣである。

【１７３０】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約１．５×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択される。

【１７３１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択される。

【１７３２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣであり、急速な第２の拡張中に外因的に供給されるＡＰＣの数は、正確にまたは約５×１０^{8}個のＡＰＣである。

【１７３３】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に添加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、本方法の７日目）に添加されるＰＢＭＣの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、本方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞を第１のＴＩＬ集団に添加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に添加することとを含み、０日目に添加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第１の拡張の７日目（例えば、本方法の７日目）に添加される抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。

【１７３４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数よりも多い。

【１７３５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７３６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７３７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７３８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【１７３９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}

、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}または４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【１７４０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４３】

他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４４】

他の実施形態では、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【１７４５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}、２×１０^{6}、２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、または４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}、３×１０^{6}、３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}、

３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}、４×１０^{6}、４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}、５×１０^{6}、５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}、６×１０^{6}、６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}、７×１０^{6}、７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}、または７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【１７４６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【１７４９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約２×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、急速な第２の拡張において外因的に供給されるＡＰＣは、正確にまたは約４×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【１７５０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択される。

【１７５１】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。

【１７５２】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＰＢＭＣの数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲か

ら選択される。
【１７５３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択される。
【１７５４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択される。
【１７５５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約６：１の範囲から選択される。
【１７５６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１７５７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【１７５８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択される。
【１７５９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１７６０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１７６１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【１７６２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確

にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１７６３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【１７６４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１７６５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【１７６６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【１７６７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【１７６８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択される。
【１７６９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択される。
【１７７０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択される。
【１７７１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択される。
【１７７２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にま

たは約３：１の範囲から選択される。
【１７７３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択される。
【１７７４】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択される。
【１７７５】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択される。
【１７７６】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択される。
【１７７７】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択される。
【１７７８】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択される。
【１７７９】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．３：１の範囲から選択される。
【１７８０】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数のプライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択される。
【１７８１】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択される。
【１７８２】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約２：１である。

【１７８３】
他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数の、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数に対する比は、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１である。

【１７８４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}、2×10^{8}、2.1×10^{8}、2.2×10^{8}、2.3×10^{8}、2.4×10^{8}、2.5×10^{8}、2.6×10^{8}、2.7×10^{8}、2.8×10^{8}、2.9×10^{8}、3×10^{8}、3.1×10^{8}、3.2×10^{8}、3.3×10^{8}、3.4×10^{8}、または3.5×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約3.5×10^{8}、3.6×10^{8}、3.7×10^{8}、3.8×10^{8}、3.9×10^{8}、4×10^{8}、4.1×10^{8}、4.2×10^{8}、4.3×10^{8}、4.4×10^{8}、4.5×10^{8}、4.6×10^{8}、4.7×10^{8}、4.8×10^{8}、4.9×10^{8}、5×10^{8}、5.1×10^{8}、5.2×10^{8}、5.3×10^{8}、5.4×10^{8}、5.5×10^{8}、5.6×10^{8}、5.7×10^{8}、5.8×10^{8}、5.9×10^{8}、6×10^{8}、6.1×10^{8}、6.2×10^{8}、6.3×10^{8}、6.4×10^{8}、6.5×10^{8}、6.6×10^{8}、6.7×10^{8}、6.8×10^{8}、6.9×10^{8}、7×10^{8}、7.1×10^{8}、7.2×10^{8}、7.3×10^{8}、7.4×10^{8}、7.5×10^{8}、7.6×10^{8}、7.7×10^{8}、7.8×10^{8}、7.9×10^{8}、8×10^{8}、8.1×10^{8}、8.2×10^{8}、8.3×10^{8}、8.4×10^{8}、8.5×10^{8}、8.6×10^{8}、8.7×10^{8}、8.8×10^{8}、8.9×10^{8}、9×10^{8}、9.1×10^{8}、9.2×10^{8}、9.3×10^{8}、9.4×10^{8}、9.5×10^{8}、9.6×10^{8}、9.7×10^{8}、9.8×10^{8}、9.9×10^{8}、または1×10^{9}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【１７８５】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約3.5×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約3.5×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約1×10^{9}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【１７８６】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約1.5×10^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約3×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約4×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約7.5×10^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【１７８７】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰ

Ｃ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約４．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～正確にまたは約５．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【１７８８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、正確にまたは約５×１０^{8}個のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【１７８９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、急速な第２の拡張の７日目に追加されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張の０日目に抗原提示細胞層を第１のＴＩＬ集団に追加することと、７日目に抗原提示細胞を第２のＴＩＬ集団に追加することとを含み、０日目に追加される抗原提示細胞層の数は、７日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【１７９０】

他の実施形態では、急速な第２の拡張の７日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数は、プライミングによる第１の拡張の０日目に外因的に供給されるＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数よりも多い。

【１７９１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６

、３．７、３．８、３．９、４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約２細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１７９９】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、正確にまたは約１、２、または３細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こる。

【１８００】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される。

【１８０１】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。

【１８０２】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭ

Ｃを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。

【１８０３】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。

【１８０４】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。

【１８０５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。

【１８０６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。

【１８０７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される。

【１８０８】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．２

～正確にまたは約１：８の範囲から選択される。
【１８０９】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される。
【１８１０】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される。
【１８１１】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される。
【１８１２】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される。
【１８１３】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される。
【１８１４】
他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される。
【１８１５】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される。

【１８１６】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数の、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に対する比は、正確にまたは約１：２．

【１８１７】

他の実施形態では、プライミングによる第１の拡張の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層の数に等しい第１の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、急速な第２の拡張の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層の数に等しい第２の平均厚さを有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で起こり、第１のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数の第２のＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）層の数に対する比は、約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択される。

【１８１８】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【１８１９】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約６．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【１８２０】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張におけるＡＰＣの数は、約２．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約３．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択され、急速な第２の拡張におけるＡＰＣの数は、約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される。

【１８２１】

Ａ．任意選択の細胞培地成分
１．抗ＣＤ３抗体
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（ＲＥＰと称されるものを含む、例えば、図１及び８（特に、例えば図８Ｂ）を参照）は、抗ＣＤ３抗体を含む。ＩＬ－２と組み合わせた抗ＣＤ３抗体は、ＴＩＬ集団におけるＴ細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Ｔｓｏｕｋａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８５，１３５，１７１９を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【１８２２】
当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物からの抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。表１を参照されたい。
【１８２３】
当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物からの抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトＣＤ３抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ３抗体ムロモナブであるＯＫＴ３が使用される（Ｏｒｔｈｏ－ＭｃＮｅｉｌ，Ｒａｒｉｔａｎ，ＮＪまたはＭｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡから市販されている）。
【１８２４】
２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト
いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び／または急速な第２の拡張の細胞培養培地は、ＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニストである。４－１ＢＢアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒトまたは哺乳動物４－１ＢＢに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって生成された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに４－１ＢＢに結合する抗体の操作された形態、例えば、ｓｃＦｖ分子も含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するための４－１ＢＢアゴニストには、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、一本鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｌｅｅ，ｅｔ　ａｌ．

，ＰＬＯＳ　Ｏｎｅ　２０１３，８，ｅ６９６７７。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト、抗４－１ＢＢヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Ｅｕｔｉｌｅｘ　Ｃｏ．Ｌｔｄ．）、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。

【１８２５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストまたは４－１ＢＢ結合分子は、融合タンパク質である場合もある。いくつかの実施形態では、三量体または六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【１８２６】

アゴニスト４－１ＢＢ抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制するアゴニスト４－１ＢＢモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【１８２７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト４－１ＢＢ（配列番号４０）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号４０）に結合する結合分子である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢ（配列番号４１）に結合する結合分子である。４－１ＢＢアゴニストまたは結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を、表５に要約する。

【１８２８】

【表６】

表５．４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号４０ ヒト４－１ＢＢ、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９（ホモサピエンス）	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FIALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号４１ マウス４－１ＢＢ腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー９（ハツカネズミ）	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【１８２９】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３０ｐＭ以下のK_Dで結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１８３０】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×１０^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７．５×１０^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８×１０^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８．５×１０^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９×１０^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９．５×１０^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１×１０^6　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１８３１】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．１×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．８×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２．９×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する、またはヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のk_{dissoc}で結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１８３２】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウ

ス４－１ＢＢに約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウス４－１ＢＢに約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する４－１ＢＢアゴニストを含む。

【１８３３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６もしくはＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ガンマ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を、表６に示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２にグリコシル化部位、２２－９６位（V_H－V_L）、１４３－１９９位（C_H１－C_L）、２５６－３１６位（C_H２）、及び３６２－４２０位（C_H３）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２′－８７′位（V_H－V_L）及び１３６′－１９５′位（C_H１－C_L）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、ＩｇＧ２Ａアイソフォーム２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２、及び２２５－２２５位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１９－１３０（２）、２２２－２２２、及び２２５－２２５位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋、ならびにＩｇＧ２Ａアイソフォーム１３０－２１３′（２）位、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム２１８－２１３′位、及び１３０－２１３′位、ならびにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム２１８－２１３′（２）位に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第８，８２１，８６７号、同第８，３３７，８５０号、及び同第９，４６８，６７８号、ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／０３２４３３Ａ１号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Ｆｉｓｈｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇ． ＆ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１２，６１，１７２１－３３に記載される。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６、及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【１８３４】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号４２によって示される重鎖及び配列番号４３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、

配列番号４２及び配列番号４３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１８３５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号４４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号４５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号４４及び配列番号４５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１８３６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号４６、配列番号４７、及び配列番号４８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号４９、配列番号５０、及び配列番号５１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１８３７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウトミルマブである。

【１８３８】

【表７】

表６．ウトミルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号４２ ウトミルマブの 重鎖	EVQLVQSGAR 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 SVMHEALHNE YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
配列番号４３ ウトミルマブの 軽鎖	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
配列番号４４ ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号４５ ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
配列番号４６ ウトミルマブの 重鎖ＣＤＲ１	STYWIS	6
配列番号４７ ウトミルマブの 重鎖ＣＤＲ２	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号４８ ウトミルマブの 重鎖ＣＤＲ３	RGYGIFDY	8
配列番号４９ ウトミルマブの 軽鎖ＣＤＲ１	SGDNIGDQYA H	11
配列番号５０ ウトミルマブの 軽鎖ＣＤＲ２	QDKNRPS	7
配列番号５１ ウトミルマブの 軽鎖ＣＤＲ３	ATYTGFGSLA V	11

【１８３９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＭＳ－６６３５１３及び２０Ｈ４．９．ｈ４ａとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ，Ｉｎｃ．及びＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ４－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を、表７に示す。ウレルマブは、２９８位（及び２９８’’位）にＮ－グリコシル化部位、２２－９５位（V_H-V_L）、１４８－２０４位（C_H1-C_L）、２６２－３２２位（C_H2）、及び３６８－４２６位（C_H3）（ならびに２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’、及び３６８’’－４２６’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（V_H-V_L）及び１３６’－１９６’位（C_H1-C_L）（ならびに２３’’’－８８’’’及び１３６’’’－１９６’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２２７－２２７”及び２３０－２３０”位に鎖間重鎖－重鎖ジスルフィド架橋、ならびに１３５－２１６’及び１３５’’－２１６’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリアント及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び同第８，９６２，８０４号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Ｓｅｇａｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６に記載されており、ｈｔｔｐ：／ｄｘ．ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１６－１２７２で入手可能である。様々な血液学的及び

固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２、及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【１８４０】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号５２によって示される重鎖及び配列番号５３によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。ある実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５２及び配列番号５３に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１８４１】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号５４に示される配列を含み、４－１ＢＢアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号５５に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、各々が、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１８４２】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ、配列番号５６、配列番号５７、及び配列番号５８に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号５９、配列番号６０、及び配列番号６１に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１８４３】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された４－１ＢＢアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、

１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ウレルマブである。

【１８４４】

【表８】

表７．ウレルマブに関連する４－１ＢＢアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号５２ ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 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 GNVFSCSVME EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号５３ ウレルマブの 軽鎖	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
配列番号５４ ウレルマブの可 変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
配列番号５５ ウレルマブの可 変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号５６ ウレルマブの重 鎖ＣＤＲ１	GYYWS	5
配列番号５７ ウレルマブの重 鎖ＣＤＲ２	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号５８ ウレルマブの重 鎖ＣＤＲ３	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号５９ ウレルマブの軽 鎖ＣＤＲ１	RASQSVSSYL A	11
配列番号６０ ウレルマブの軽 鎖ＣＤＲ２	DASNRAT	7
配列番号６１ ウレルマブの軽 鎖ＣＤＲ３	QQRSDWPPAL T	11

【１８４５】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３０９８０９）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）、１４５５０１（Ｌｅｉｎｃｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｂ５９１）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託された細胞株によって生成され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体、５Ｆ４（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ　３１　１５０３）、Ｃ６５－４８５（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ　５５９４４６）、米国特許出願公開第ＵＳ２００５／００９５２４４号に開示される抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示される抗

体（例えば、２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１））、米国特許第６，８８７，６７３号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第７，２１４，４９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、米国特許第６，９０５，６８５号に開示される抗体（例えば、４Ｅ９もしくはＢＭＳ－５５４２７１）、米国特許第６，３６２，３２５号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８もしくはＢＭＳ－４６９４９２、３Ｈ３もしくはＢＭＳ－４６９４９７、または３Ｅｌ）、米国特許第６，９７４，８６３号に開示される抗体（例えば、５３Ａ２）、米国特許第６，２１０，６６９号に開示される抗体（例えば、１Ｄ８、３Ｂ８、もしくは３Ｅｌ）、米国特許第５，９２８，８９３号に開示される抗体、米国特許第６，３０３，１２１号に開示される抗体、米国特許第６，５６９，９９７号に開示される抗体、国際特許出願公開第ＷＯ２０１２／１７７８８号、同第ＷＯ２０１５／１１９９２３号、及び同第ＷＯ２０１０／０４２４３３号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【１８４６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ２００８／０２５５１６Ａ１号、同第ＷＯ２００９／００７１２０Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／００３７６６Ａ１号、同第ＷＯ２０１０／０１００５１Ａ１号、及び同第ＷＯ２０１０／００７８９６６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００２７２１８Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１２６７０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１１／０１１１４９４Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０１１０７３４Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１５／０１２６７１０Ａ１号、ならびに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載される４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１８４７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるような４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである（図１８を参照）。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ（４－１ＢＢリガンド、ＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー９（ＴＮＦＳＦ９））または４－１ＢＢに結合する抗体に由来する３つの直線的に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H３及びC_H２ドメインを含む）によって第２の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの２つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、６つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基ならびに柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列、ならびに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーによって結合されたV_H鎖及びV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。ｄｅ Ｍａｒｃｏ，Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｅｌｌ Ｆａｃｔｏｒｉｅｓ，２０１１，１０，４４、Ａｈｍａｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．＆Ｄｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２，９８０２５０、Ｍｏｎｎｉｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，２０１３，２，１９３－２０８、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のｓｃＦｖドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１８４８】
図１８に示される構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表８に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。
【１８４９】
【表９】

表８．Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ａ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含む、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号６２ Ｆｃドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号６３ リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号６４ リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号６５ リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号６６ リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号６７ リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号６８ リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号６９ リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号７０ リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号７１ リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号７２ リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【１８５０】
図１８に示される構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。
【１８５１】

【表１０】

表９．Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質設計（構造Ｉ－Ｂ）を有する、４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質を含むＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号７３ Ｆｃドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号７４ リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号７５ リンカー	SSSSSSGSGS GS	12
配列番号７６ リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【１８５２】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表１０に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１８５３】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号７８による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【１８５４】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号４３及び配列番号４４に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号５４及び配列番号５５に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１０に示されるV_H配列及びV_L配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、V_Hドメイン及びV_Lドメインは、リンカーによって結合されている。

【１８５５】

【表１１】

表１０．融合タンパク質における４－１ＢＢ結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　４－１ＢＢアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号７７ ４－１ＢＢＬ	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 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
配列番号７８ ４－１ＢＢＬ可溶性	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
配列番号７９ ４Ｂ４－１－１バージョン１の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号８０ ４Ｂ４－１－１バージョン１の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号８１ ４Ｂ４－１－１バージョン２の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号８２ ４Ｂ４－１－１バージョン２の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号８３ Ｈ３９Ｅ３－２の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号８４ Ｈ３９Ｅ３－２の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【１８５６】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性４－１ＢＢ結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性４－１ＢＢ結合ドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで特定の距離を提供するが、４－１ＢＢ結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【１８５７】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含む４－１ＢＢアゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、各ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、４－１ＢＢ結合ドメインである。

【１８５８】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、前述のＶ$_{L}$ドメインのうちのいずれかに連結された前述のＶ$_{H}$ドメインのうちのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニストｓｃＦｖ抗体である。

【１８５９】

いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）から市販されているＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２である。いくつかの実施形態では、４－１ＢＢアゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９である。

【１８６０】

３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト

いくつかの実施形態では、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒトまたは哺乳動物ＯＸ４０に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語はまた、抗体（完全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーによって生成された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにＯＸ４０に結合する操作された形態の抗体、例えば、ｓｃＦｖ分子を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのＯＸ４０アゴニストには、抗ＯＸ４０抗体、ヒト抗ＯＸ４０抗体、マウス抗ＯＸ４０抗体、哺乳動物抗ＯＸ４０抗体、モノクローナル抗ＯＸ４０抗体、ポリクローナル抗ＯＸ４０抗体、キメラ抗ＯＸ４０抗体、抗ＯＸ４０アドネクチン、抗ＯＸ４０ドメイン抗体、一本鎖抗ＯＸ４０断片、重鎖抗ＯＸ４０断片、軽鎖抗ＯＸ４０断片、抗ＯＸ４０融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト、抗ＯＸ４０ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

【１８６１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストまたはＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質である場合もある。ＯＸ４０Ｌに融合されたＦｃドメインを含むＯＸ４０融合タンパク質は、例えば、Ｓａｄｕｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００９，１８２，１４８１－８９に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つまたは６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体ＯＸ４０アゴニストは、典型的に２つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。３つのＴＮＦＲＳＦ結合ドメイン及びＩｇＧ１－Ｆｃを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの２つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Ｇｉｅｆｆｅｒｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ２０１３，１２，２７３５－４７に記載されている。

【１８６２】

アゴニストＯＸ４０抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Ｃｕｒｔｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１３，７３，７１８９－９８。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ｃｅｌｌｕｌａｒ　ｔｏｘｉｃｉｔｙ）（ＡＤＣＣ）、例えば、ＮＫ細胞細胞傷害性（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制するアゴニストＯＸ４０モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【１８６３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒトＯＸ４０（配列番号８５）に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８５）。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０に結合する結合分子である（配列番号８６）。ＯＸ４０アゴニストまたは結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を、表１１に要約する。

【１８６４】

【表１２】

表１１．ＯＸ４０抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号８５ ヒトＯＸ４０ （ホモサピエンス）	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 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
配列番号８６ マウスＯＸ４０ （ハツカネズミ）	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

【１８６５】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１００ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５０ｐＭ以下のK_Dで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４０ｐＭ以下のK_Dで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３０ｐＭ以下のK_Dで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１８６６】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９．５×10^5　１／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}

で結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１×１０^{6}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１８６７】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．１×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．８×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２．９×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合するＯＸ４０アゴニストを含む。

【１８６８】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ヒトもしくはマウスＯＸ４０に約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$で結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【１８６９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２またはＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ，Ｉｎｃ．の子会社であるＭｅｄＩｍｍｕｎｅから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ホモサピエンスＴＮＦＲＳＦ４（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー４、ＯＸ４０、ＣＤ１３４）］、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を、表１２に示す。タボリキシズマブは、３０１及び３０１’’位にＮ－グリコシル化部位（フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを有する）、２２－９５位（Ｖ$_{Ｈ}$－Ｖ$_{Ｌ}$）、１４８－２０４位（Ｃ$_{Ｈ}$１－Ｃ$_{Ｌ}$）、２６５－３２５位（Ｃ$_{Ｈ}$２）、及び３７１－４２９位（Ｃ$_{Ｈ}$３）（及び２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６５’’－３２５’’、及び３７１’’－４２９’’位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３’－８８’位（Ｖ$_{Ｈ}$－Ｖ$_{Ｌ}$）及び１３４’－１９４’位（Ｃ$_{Ｈ}$１－Ｃ$_{Ｌ}$）（及び２３’’’－８８’’’及び１３４’’’－１９４’’’位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、２３０－２３０”及び２３３－２３３”位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに２２４－２１４’及び２２４’’－２１４’’’に鎖間重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のｃｌｉｎｉｃａｌｔｒｉａｌｓ．ｇｏｖ識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【１８７０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号８７によって示される重鎖及び配列番号８８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアン

ト、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号８７及び配列番号８８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１８７１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号８９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号９０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【１８７２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９１、配列番号９２、及び配列番号９３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号９４、配列番号９５、及び配列番号９６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１８７３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同

じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、タボリキシズマブである。

【１８７４】

【表１３】

表１２．タボリキシズマブに関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号８７ タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY 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
配列番号８８ タボリキシズマブの軽鎖	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
配列番号８９ タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
配列番号９０ タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号９１ タボリキシズマブの重鎖ＣＤＲ１	GSFSSGYWN	9
配列番号９２ タボリキシズマブの重鎖ＣＤＲ２	YIGYISYNGI TYH	13
配列番号９３ タボリキシズマブの重鎖ＣＤＲ３	RYKYDYDGGH AMDY	14
配列番号９４ タボリキシズマブの軽鎖ＣＤＲ１	QDISNYLN	8
配列番号９５ タボリキシズマブの軽鎖ＣＤＲ２	LLIYYTSKLH S	11
配列番号９６ タボリキシズマブの軽鎖ＣＤＲ３	QQGSALPW	8

【１８７５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１１Ｄ４である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を、表１３に示す。

【１８７６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号９７によって示される重鎖及び配列番号９８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それ

ぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号９７及び配列番号９８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１８７７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号９９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１００に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１８７８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０１、配列番号１０２、及び配列番号１０３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１０４、配列番号１０５、及び配列番号１０６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１８７９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１１Ｄ４である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるもの

であり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１１Ｄ４である。

【１８８０】

【表１４】

表１３．１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号９７ １１Ｄ４の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 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 SCSVMHEALE NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号９８ １１Ｄ４の軽鎖	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
配列番号９９ １１Ｄ４の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号１００ １１Ｄ４の軽鎖可 変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
配列番号１０１ １１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１	SYSMN	5
配列番号１０２ １１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号１０３ １１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３	ESGWYLFDY	9
配列番号１０４ １１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１	RASQGISSWL A	11
配列番号１０５ １１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２	AASSLQS	7
配列番号１０６ １１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３	QQYNSYPPT	9

【１８８１】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｐｆｉｚｅｒ，Ｉｎｃ．から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号、同第８，２３６，９３０号、及び同第９，０２８，８２４号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を、表１４に示す。

【１８８２】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号１０７によって示される重鎖及び配列番号１０８によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９６％同一

である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０７及び配列番号１０８に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【１８８３】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１０９に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１０に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【１８８４】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１１、配列番号１１２、及び配列番号１１３に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１１４、配列番号１１５、及び配列番号１１６に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１８８５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１８Ｄ８である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、１８Ｄ８である。

【１８８６】

【表１５】

表１４．１８Ｄ８に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１０７ １８Ｄ８の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 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
配列番号１０８ １８Ｄ８の軽鎖	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
配列番号１０９ １８Ｄ８の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号１１０ １８Ｄ８の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号１１１ １８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１	DYAMH	5
配列番号１１２ １８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号１１３ １８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号１１４ １８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１	RASQSVSSYL A	11
配列番号１１５ １８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２	DASNRAT	7
配列番号１１６ １８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３	QQRSNWPT	8

【１８８７】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃから入手可能なヒト化抗体である、Ｈｕ１１９－１２２である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を、表１５に示す。

【１８８８】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１１７に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１１８に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１１７及び配列番号１１８に示される配列と少なくとも９５％同一

であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含む。

【１８８９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１１９、配列番号１２０、及び配列番号１２１に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１２２、配列番号１２３、及び配列番号１２４に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【１８９０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１１９－１２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１１９－１２２である。

【１８９１】

【表１６】

表１５．Ｈｕ１１９－１２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１１７ Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号１１８ Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号１１９ Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１	SHDMS	5
配列番号１２０ Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号１２１ Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号１２２ Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ１	RASKSVSTSG YSYME	15
配列番号１２３ Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２	LASNLES	7
配列番号１２４ Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３	QHSRELPLT	9

【１８９２】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃから入手可能なヒト化抗体である、Ｈｕ１０６－２２２である。Ｈｕ１０６－２２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号、ならびに国際特許公開第ＷＯ２０１２／０２７３２８号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を、表１６に示す。
【１８９３】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１２５に示される配列を含み、ＯＸ４０アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１２６に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。
【１８９４】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号１２７、配列番号１２８、及び配列番号１２９に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１３０、配列番号１３１、及び配列番号１３２に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。
【１８９５】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含むＯＸ４０抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１０６－２２２である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、Ｈｕ１０６－２２２である。

【１８９６】
【表１７】

表１６．Ｈｕ１０６－２２２に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１２５ Ｈｕ１０６－２２２ の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号１２６ Ｈｕ１０６－２２２ の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号１２７ Ｈｕ１０６－２２ ２の重鎖ＣＤＲ１	DYSMH	5
配列番号１２８ Ｈｕ１０６－２２２ の重鎖ＣＤＲ２	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号１２９ Ｈｕ１０６－２２２ の重鎖ＣＤＲ３	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号１３０ Ｈｕ１０６－２２２ の軽鎖ＣＤＲ１	KASQDVSTAV A	11
配列番号１３１ Ｈｕ１０６－２２２ の軽鎖ＣＤＲ２	SASYLYT	7
配列番号１３２ Ｈｕ１０６－２２２ の軽鎖ＣＤＲ３	QQHYSTPRT	9

【１８９７】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、ＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９は、マウスモノクローナル抗体である。Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００６，２９，５７５－５８５に記載されているように、Ｂｉｏｖｅｓｔ　Ｉｎｃ．（Ｍａｌｖｅｒｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に寄託された９Ｂ１２ハイブリドーマによって産生された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。
【１８９８】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６　ＢＤ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ製品番号３４０４２０）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）である。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、抗体ＡＣＴ３５（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、カタログ番号２００７３）の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＩｎＶｉｖｏＭＡｂ、ＢｉｏＸｃｅｌｌ　Ｉｎｃ（Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ）から市販されているマウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）である。
【１８９９】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、国際特許出願公開第ＷＯ９５／１２

６７３号、同第ＷＯ９５／２１９２５号、同第ＷＯ２００６／１２１８１０号、同第ＷＯ２０１２／０２７３２８号、同第ＷＯ２０１３／０２８２３１号、同第ＷＯ２０１３／０３８１９１号、及び同第ＷＯ２０１４／１４８８９５号、欧州特許出願第ＥＰ０６７２１４１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／１３６０３０号、同第ＵＳ２０１４／３７７２８４号、同第ＵＳ２０１５／１９０５０６号、及び同第ＵＳ２０１５／１３２２８８号（クローン２０Ｅ５及び１２Ｈ３を含む）、ならびに米国特許第７，５０４，１０１号、同第７，５５０，１４０号、同第７，６２２，４４４号、同第７，６９６，１７５号、同第７，９６０，５１５号、同第７，９６１，５１５号、同第８，１３３，９８３号、同第９，００６，３９９号、及び同第９，１６３，０８５号に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択され、その各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【１９００】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）もしくは構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、もしくはバイオシミラーである。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂの特性は、上記及び米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号、及び同第８，４５０，４６０号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図１８に示される構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表９に見出される。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号６２のアミノ酸１７～２３０）、完全なヒンジドメイン（配列番号６２のアミノ酸１～１６）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号６２のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号６３～配列番号７２に示される実施形態から選択され得る。同様に、図１８に示される構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表１０に見出される。Ｆｃ抗体断片が構造Ｉ－ＢにあるようなＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は、好ましくは、配列番号７３に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号７４～配列番号７６に示される実施形態から選択される。

【１９０１】

いくつかの複合体実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、１１Ｄ４の可変重鎖及び可変軽鎖、１８Ｄ８の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１１９－１２２の可変重鎖及び可変軽鎖、Ｈｕ１０６－２２２の可変重鎖及び可変軽鎖、表１７に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリアント、及びバイオシミラーからなる群から選択される１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１９０２】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、可溶性ＯＸ４０Ｌ配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１３５による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【１９０３】

いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号８９及び配列番号９０に示される配列と少なくと

も９５％同一であるＶ$_H$及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、Ｖ$_H$及びＶ$_L$ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号９９及び配列番号１００に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、Ｖ$_H$及びＶ$_L$ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１０９及び配列番号１１０に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、Ｖ$_H$及びＶ$_L$ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２７及び配列番号１２８に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、Ｖ$_H$及びＶ$_L$ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号１２５及び配列番号１２６に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、Ｖ$_H$及びＶ$_L$ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造Ｉ－ＡまたはＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表１７に示されるＶ$_H$配列及びＶ$_L$配列と少なくとも９５％同一であるＶ$_H$領域及びＶ$_L$領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、Ｖ$_H$ドメイン及びＶ$_L$ドメインは、リンカーによって結合されている。

【１９０４】

【表１８－１】

表１７．融合タンパク質（例えば、構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂ）におけるＯＸ４０結合ドメインとしてまたはｓｃＦｖ　ＯＸ４０アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１３３ ＯＸ４０Ｌ	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
配列番号１３４ ＯＸ４０Ｌ可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
配列番号１３５ ＯＸ４０Ｌ可溶性ドメイン（代替）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
配列番号１３６ ００８の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号１３７ ００８の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号１３８ ０１１の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
配列番号１３９ ０１１の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号１４０ ０２１の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号１４１ ０２１の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
配列番号１４２ ０２３の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号１４３ ０２３の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
配列番号１４４ 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号１４５ 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号１４６ 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
配列番号１４７ 軽鎖可変領域	DIVMTQSPKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号１４８ ヒト化抗体の重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDVVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122

【表１８－２】

配列番号１４９ ヒト化抗体の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号１５０ ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号１５１ ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号１５２ ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号１５３ ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号１５４ ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号１５５ ヒト化抗体の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号１５６ 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号１５７ 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【１９０５】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインである。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＯＸ４０結合ドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＯＸ４０結合ドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／またはＣ末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、ＦａｂまたはＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、ＯＸ４０結合ドメインの一部分ではない）を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長を有する。

【１９０６】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、（ｉ）第１の可溶性腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）第２の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメイン、（ｉｖ）第２のペプチドリンカー、及び（ｖ）第３の可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインを含むＯＸ４０アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは独立して、３～８アミノ酸長であり、ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインは、ＯＸ４０結合ドメインである。

【１９０７】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３は、ＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第６，３１２，７００号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。
【１９０８】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含むＯＸ４０アゴニストｓｃＦｖ抗体である。
【１９０９】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Ｃｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ，ＵＳＡから市販されているＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５である。
【１９１０】
いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡから市販されているＯＸ４０アゴニスト抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５である。
【１９１１】
４．ＩＬ－１５Ｒアゴニスト（及びスーパーアゴニスト）
免疫応答を調節することができるインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）受容体アゴニストが、本明細書に記載され、これは、ＴＩＬの製造プロセスにおいて有用であり得る。当業者によって理解されるように、本開示での使用が見出されるいくつかの好適なＩＬ－１５Ｒアゴニストが存在する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ拡張培養物は、ＮＩＺ９８５（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒαの組換えヘテロ二量体；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＮＫＴＲ－２５５（ポリマーコンジュゲートＩＬ－１５；Ｎｅｋｔａｒ）、Ｎ－８０３（ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）、ＸｍＡｂ３０６（効力低減ＩＬ１５／ＩＬ１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質；Ｘｅｎｃｏｒ）、ＢＪ－００１（腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＢＪ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む。
【１９１２】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（ＲＥＰ前及びＲＥＰと称されるものを含む、例えば図１及び８を参照）は、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストまたはスーパーアゴニストを含む。理論に拘束されることなく、ＩＬ－１５Ｒアゴニストまたはスーパーアゴニストは、細胞培養物中でＩＬ－１５よりもＩＬ－１５受容体をより強力に刺激し得、用量依存性免疫応答をもたらす。例えば、Ｆｕｊｉｉ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．（２０１８）を参照されたい。Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ：ＣＩＩ，６７（４），６７５－６８９、及びＷａｔｓｏｎ ＤＣ，ｅｔ ａｌ．（２０１８） ＰＬＯＳ Ｐａｔｈｏｇｅｎｓ １４（２）を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【１９１３】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、または約２００ｎｇ／ｍＬの濃度で、第１の培養培地中で補充される。
【１９１４】
いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、０．１ｎｇ／ｍＬ、約０．５ｎｇ／ｍＬ、約１ｎｇ／ｍＬ、約５ｎｇ／ｍＬ、約１０ｎｇ／ｍＬ、約５０ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約１５０ｎｇ／ｍＬ、または約

２００ｎｇ／ｍＬの濃度で、第２の培養培地中で補充される。
【１９１５】
Ｂ．任意選択の細胞生存率分析
任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第１の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第１の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクＴＩＬの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びＭＴＴアッセイが含まれるが、これらに限定されない。
【１９１６】
１．細胞数、生存率、フローサイトメトリー
いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ（商標）フローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して、例えば、ＢＤ　Ｂｉｏ－ｓｃｉｅｎｃｅｓ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのｃチップ血球計数器（ＶＷＲ，Ｂａｔａｖｉａ，ＩＬ）を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８２６９４号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特許出願公開第２０１８／０２８０４３６号または国際特許出願公開第ＷＯ／２０１８／０８１４７３号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。
【１９１７】
いくつかの事例では、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。あるいは、以下で論じられるように、バルクＴＩＬ集団がＲＥＰに供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが療法に使用される場合、バルクまたはＲＥＰ　ＴＩＬ集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。
【１９１８】
２．細胞培養
いくつかの実施形態では、上で考察され、図１及び８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に例示されたものを含む、ＴＩＬを拡張するための方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地、または約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第２の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第１の拡張及び第２の拡張（急速な第２の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、わずか１種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、ＡＩＭ－Ｖ細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭの硫酸ストレプトマイシン、及び１０μＭの硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、ＴＩＬの数を拡張するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの数を拡張することは、３日または４日に１回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内で

細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【１９１９】

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

【１９２０】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として約１～８日間、例えば約７日間、またはプライミングによる第１の拡張として約８日間にわたってＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～９日間、例えば約７日間、約８日間、または約９日間にわたって拡張することと、を含む。

【１９２１】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約１～７日間、例えば、約７日間にわたって培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移し、ＩＬ－２、２Ｘ抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１４日間、または約７～９日間、例えば、約７日間、約８日間、または約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【１９２２】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第１の拡張として、ＩＬ－２、１×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第１のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約１～７日間、例えば、約７日間培養することと、ＴＩＬを第２のガス透過性容器に移すことと、ＩＬ－２、２×抗原提示フィーダー細胞、及びＯＫＴ－３を含む細胞培地を含有する第２のガス透過性容器内でＴＩＬの数を約７～１１日間、例えば、約７日間、約８日間、約９日間、約１０日間、または約１１日間にわたって拡張することと、を含む。

【１９２３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７Ａ１号に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、及びデバイスを使用して、ＰＢＭＣを使用してＴＩＬを拡張するために使用されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、ガス透過性バッグ内で拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ２５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などのガス透過性バッグ内のＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｘｕｒｉ Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ Ｗ５（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）としても知られるＷＡＶＥ Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍなどのガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。いくつかの実施形態では、細胞拡張システムは、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ、及び約１０Ｌからなる群から選択される体積を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【１９２４】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｇ－ＲＥＸフラスコ（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ　Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇから市販されている）内で拡張され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}～１０×１０^{6}及び３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}まで拡張するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地がＧ－ＲＥＸフラスコ内の約１０ｃｍの高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、１つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボーラスとして追加され得る。かかる容器、デバイス、及び方法は、当該技術分野で知られており、ＴＩＬを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１４／２１００３６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１１５６１７Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１３／１８８４２７Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／０１３６２２８Ａ１号、米国特許第ＵＳ８，８０９，０５０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１１／０７２０８８Ａ２号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１６／０２０８２１６Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第ＷＯ２０１２／１２９２０１Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１３／０１０２０７５Ａ１号、米国特許第ＵＳ８，９５６，８６０Ｂ２号、国際公開第ＷＯ２０１３／１７３８３５Ａ１号、米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１７５９６６Ａ１号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスはまた、Ｊｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５：２８３－２９２に記載されている。

【１９２５】
Ｃ．ＴＩＬにおける遺伝子の任意選択のノックダウンまたはノックアウト
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の変化を提供する。

【１９２６】
ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【１９２７】
いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進または１つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入、例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）または低分子（もしくは短）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）のＴＩＬ集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【１９２８】
いくつかの実施形態では、本発明の拡張ＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（特に、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように、例えば、ステップＡから取得されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８（例えば図８Ａ及

び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように、例えば、ステップＢで拡張されたＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、ステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団である、例えば、第１の拡張と第２の拡張との間の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）におけるものを含む、第１の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＣから取得され、ステップＤでのその拡張前のＴＩＬ集団を含む、第２の拡張前のバルクＴＩＬ集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤで拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）を含む、第２の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図８に示されるように、例えば、ステップＤでの拡張から取得されたＴＩＬ集団を含む、第２の拡張後に起こる。

【１９２９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ　ａｎｄ　ｖａｎ　ｄｅｒ　Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ　ａｎｄ　Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム配合物を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１９３０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原を経験したセントラルメモリーＴ細胞の初期前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なＴＩＬ産物の生成に望ましいものである。ＴＳＣＭは

、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のＴ細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成を有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＳＣＭパーセンテージの少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団中のＴＳＣＭの少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、または１０倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有するＴＩＬ集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、または少なくとも９５％のＴＳＣＭを有する治療的ＴＩＬ集団をもたらす。

【１９３１】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したＴ細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したＴ細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【１９３２】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを保存するために、Ｔ細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のＴＣＲレパートリーを維持する。

【１９３３】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１またはＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を含むが、これらに限定されない、遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（Ｒ

ＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）、及び／またはｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＶＨＬを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群（ＨＭＧ）ボックス（ＴＯＸ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、アンキリンリピートドメイン１１（ＡＮＫＲＤ１１）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ＢＣＬ６コリプレッサー（ＢＣＯＲ）を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【１９３４】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、Ｃ

ＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、及び／またはＣＣＬ１７を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【１９３５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２、及び／またはＴＧＦβの発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１９３６】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのＴＩＬの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、及び／またはＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１９３７】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１９３８】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【１９３９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰタンパク質キナーゼＡ（ＰＫＡ）の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１９４０】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される２つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される１つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせのうちの１つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タン

パク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの発現の低下及び／または減少をもたらす。

【１９４１】

いくつかの実施形態では、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【１９４２】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

【１９４３】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１９４４】

いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態

では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％増加する。

【１９４５】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子でのＴＩＬの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。かかる方法は、転写因子を含むタンパク質をＴ細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を示し、米国特許出願公開第ＵＳ２０１９／００９３０７３Ａ１号、同第ＵＳ２０１８／０２０１８８９Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１９／００１７０７２Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかる方法は、ＴＩＬ集団を、一過性タンパク質発現を誘導することができる転写因子（ＴＦ）及び／または他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、当該一過性タンパク質発現を誘導することができるＴＦ及び／または他の分子は、腫瘍抗原の増加した発現及び／またはＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加をもたらし、それ故に、ＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較して再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬ開始集団またはＴＩＬ前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞の増加した亜集団をもたらす。

【１９４６】

いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）には、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ、及び／またはＭＹＢが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、市販のＫＮＯＣＫＯＵＴ　Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ／ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）などの誘導多能性幹細胞培養物（ｉＰＳＣ）とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、さらなるＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、ＴＳＣＭのパーセンテージの約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％のＴＳＣＭの増加をもたらす。

【１９４７】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、ＴＩＬの集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、１つ以上のタンパク質の生成のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、及び／または第３のＴＩＬ集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当

該技術分野で知られており、例えば、Ｌｅｖｉｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ‘ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．２００６，１０３，１７３７２－７７、Ｚｕｆｆｅｒｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１９９７，１５，８７１－７５、Ｄｕｌｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　１９９８，７２，８４６３－７１、及び米国特許第６，６２７，４４２号に記載されており、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｃｅｐｋｏ　ａｎｄ　Ｐｅａｒ，Ｃｕｒ．Ｐｒｏｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９９６，９．９．１－９．９．１６に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、ＤＮＡ発現ベクターとしてまたは発現可能なＲＮＡもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップ及びポリＡ尾部を含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。ＳＢ１０、ＳＢ１１、及びＳＢ１００ｘなどのサケ科型Ｔｅｌ様トランスポザーゼ（ＳＢまたはＳｌｅｅｐｉｎｇ　Ｂｅａｕｔｙトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Ｈａｃｋｅｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ　２０１０，１８，６７４－８３及び米国特許第６，４８９，４５８号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１９４８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ中のタンパク質発現の一過性変化は、短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。

【１９４９】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、発現の低下である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬにおけるタンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）によって誘導され、これはテトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用してその３’末端でコレステロールに複合された、２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む。短干渉ＲＮＡまたはサイレンシングＲＮＡとして知られることもある、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、一般に１９～２５塩基対長の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。ｓｄＲＮＡは、共有結合及び疎水的に修飾されたＲＮＡｉ化合物であり、細胞に侵入するために送達ビヒクルを必要としない。ｓｄＲＮＡは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。ｓｄＲＮＡ分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。加えて、ｓｄＲＮＡ分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性複合体に結合することができる。ｓｄＲＮＡ及びかかるｓｄＲＮＡを作製するための関連方法は、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１６／０３０４８７３Ａ１号、同第ＵＳ２０１９／０２１１３３７Ａ１号、同第ＵＳ２００９／０１３１３６０Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１９／００４８３４１Ａ１号、ならびに米国特許第１０，６３３，６５４号及び同第１０，９１３，９４８Ｂ２号（これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる）にも広く記載されている。ｓｄＲＮＡ構造、化学、標的化位置、配列選択制などを最適化するために、ｓｄＲＮＡ力価予測用のアルゴリズムが、開発及び利用されている。これらの

分析に基づいて、機能的なｓｄＲＮＡ配列は、一般に、１μＭの濃度で７０％を超える発現の減少を有すると定義されており、確率は４０％を超える。

【１９５０】

二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般に、ＲＮＡの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。ｓｉＲＮＡとは対照的に、ｄｓＲＮＡという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【１９５１】

いくつかの実施形態では、方法は、ＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬを含む、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現の一過性の変化を含み、例えば、テトラエチレングリコール（ＴＥＧ）リンカーを使用して２０ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び３’末端でコレステロールにコンジュゲートされた１３～１５塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む、高いパーセンテージの２’－ＯＨ置換（典型的にはフッ素または－ＯＣＨ$_3$）を有する化学的に合成された非対称ｓｉＲＮＡ二本鎖である、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）の使用を含む。ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡを使用する方法は、Ｋｈｖｏｒｏｖａ ａｎｄ Ｗａｔｔｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１７，３５，２３８－２４８、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．２０１３，２９，８５５－８６４、及びＬｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡの送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊（スクイーズまたはＳＱＺ法など）を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ、または他の方法を使用せず、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬ集団を培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに１～３日間曝露することを含む、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団へのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡに曝露される１～３日の期間を使用して達成され、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡへの曝露は、新鮮なｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを培地に追加することによって、２回、３回、４回、または５回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１１／００３９９１４Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１３１１４１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１３／０１３１１４２Ａ１号、ならびに米国特許第９，０８０，１７１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１９５２】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、製造中にＴＩＬ集団に挿入される。いくつかの実施形態では、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ１／２ ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４ ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ ＢＲ３、ＣＩＳＨ、及び／またはＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、

フローサイトメトリー及び／またはｑＰＣＲによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約５％、約１０％、約１０％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％、約９０％、または約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約８５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９０％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９５％減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約９９％減少する。

【１９５３】

ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、ｓｄＲＮＡをＴＩＬに首尾よく送達することができる。非対称ｓｉＲＮＡ構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、Ｌｉｇｔｅｎｂｅｒｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１８，２６，１４８２－９３及び米国特許出願公開第２０１６／０３０４８７３Ａ１号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照）は、ｓｄＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単純に添加することによって、追加の配合物及び方法なしに、ｓｄＲＮＡが培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性は、単に培地中のｓｄＲＮＡの活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルのＲＮＡｉを介した低減の支援を可能にする。理論に拘束されることはないが、ｓｄＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞で数カ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

【１９５４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの９５％を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＲＮＡｉ効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日間、６日間、７日間、または８日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、ＴＩＬのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ処理後１０日以上で減少する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の７０％を超える減少が維持されるＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の減少により、ＴＩＬがより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡによるＰＤ－１の発現の減少は、ＴＩＬ拡張の増加をもたらす。

【１９５５】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の７５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の８５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９０％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９５％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使

用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現の９９％の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

【１９５６】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチド剤は、療法剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための１つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、２’Ｆ修飾ヌクレオチド、２’－Ｏ－メチル修飾、及び／または２’デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンＤ、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、２’－Ｏ－メチル、２’デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、Ｄ－リボース、２’－Ｏ－アルキル（２’－Ｏ－メチル及び２’－０－エチルを含む）、すなわち、２’－アルコキシ、２’－アミノ、２’－Ｓ－アルキル、２’－ハロ（２’－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２’－アリルオキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２’－プロパルギル、２’－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、Ａｕｇｕｓｔｙｎｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．１９９２，１８，４７１１（この開示は参照により本明

細書に組み込まれる）に記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

【１９５７】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、２つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第１の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部分を一本鎖のままにする）第２の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部分は、一本鎖のままであり得る。

【１９５８】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約７０％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約８０％にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９０％～９５％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約９６％～９８％にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５のミスマッチを含む。

【１９５９】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第５，８４９，９０２号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように３’または５’結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（$CH_2-CH_2-CH_3$）、グリコール（$-O-CH_2-CH_2-O-$）ホスフェート（PO_3^{2-}）、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの５’及び３’末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【１９６０】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、代替の結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合されている。

【１９６１】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの細胞取り込みの少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００パーセントの増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｃ残基またはＵ残基の少なくとも一方が、疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵの少なくとも１０％

、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、Ｃ及びＵのすべてが疎水性修飾を含む。

【１９６２】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、プロトン化可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（ＲＩＳＣ負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（１０～１５塩基長の効率的なＲＩＳＣ侵入に必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域を１３ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、６ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ化合物は、安定性を提供し、かつＲＩＳＣ侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。ガイド鎖は、例えば、ＲＩＳＣ侵入に干渉することなく安定性を確証する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２′Ｆが修飾され、かつ５′末端がリン酸化されたＣ及びＵヌクレオチドの大部分を含む。

【１９６３】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％が修飾されている。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【１９６４】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８～１５ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、１３ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１００％の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に１つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または１ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、４～１２ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満または１２ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、６または７ヌクレオチド長である。

【１９６５】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡ分子は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間以上、または２４時間超（任意の中間値を含

む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄ－ＲＮＡは、１２時間以上の培地中での半減期を有する。

【１９６６】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、ＲＮＡ分子の効力に影響を与え得る一方で、２′－フルオロ（２′Ｆ）修飾の２′－０－メチル（２′ＯＭｅ）修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の２′Ｆ含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、ＲＮＡ分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、２′Ｆ修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

【１９６７】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ１８～１９ヌクレオチド長であり、およそ２～１４個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４個、または１４個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する１つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、３′末端にあるか、５′末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の３′末端１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る２′Ｆ及び／または２′ＯＭｅ修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５′側のヌクレオチド）は、２′ＯＭｅ修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′Ｆ修飾されていてもよい。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されている場合もある。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（または異なる長さのガイド鎖における対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２′ＯＭｅ修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も３′側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のＣ及びＵの大部分は２′Ｆ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されている。他の実施形態では、１位及び１１～１８位のＣまたはＵは２′ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５′末端はリン酸化されており、２～１０位のＣまたはＵは２′Ｆ修飾されている。

【１９６８】

自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の配合物または技法を必要とすることなくＲＮＡｉ剤（ｓｉＲＮＡ、ｓｄＲＮＡ、または他のＲＮＡｉ剤のいずれか）で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインビボ活性、及び使用の単純さは、従来のｓｉＲＮＡベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。ｓｄＲＮＡ法は、化学合成された化合物をエクスビボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織への直接送達を可能にする。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載のｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ　ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１９６９】

ｓｉＲＮＡ及びｓｄＲＮＡは、疎水的に修飾されたｓｉＲＮＡ －アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成されてもよく、例えば、Ｂｙｒｎｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｃｕｌａｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔ．，２０１３，２９，８５５－８６４（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されている。

【１９７０】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載のＴＩＬに送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためにＴＩＬ集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【１９７１】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達システムは、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達ＲＮＡｉ剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、ＴＩＬの集団にｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【１９７２】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される）、ＴＩＬによって取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄＲＮＡは、第１の拡張中（例えば、ステップＢ）、第１の拡張後（例えば、ステップＣ中）、第２の拡張前または拡張中（例えば、ステップＤの前またはステップＤ中）、ステップＤ後及びステップＥにおける採取前、ステップＦにおける採取中または採取後、ステップＦにおける最終配合及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップＦにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のＴＩＬに添加され得る。さらに、ｓｄＲＮＡは、ステップＦにおける任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子が、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、及び１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、０．１μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、または１０μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地からなる群から選択される量でＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ、及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の１つ以上のｓｄＲＮＡ標的遺伝子は、ＲＥＰ前段階またはＲＥＰ段階中に１日に２回、１日に１回、２日毎、３日毎、４日毎、５日毎、６日毎、または７日毎にＴＩＬ培養物に添加され得る。

【１９７３】

ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地にｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡張プロセス中に本明細書に記載のＴＩＬと接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、ＴＩＬ集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡを細胞培養

培地に溶解することと、細胞培養培地をＴＩＬ集団と接触させることとを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１９７４】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、米国特許第４，８９７，３５５号、同第５，４５９，１２７号、同第５，６３１，２３７号、同第５，９５５，３６５号、同第５，９７６，５６７号、同第１０，０８７，４６４号、及び同第１０，１５５，９４５号、ならびにＢｅｒｇａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９３，２１，３５６７（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるような方法を使用して、例えば、カチオン性、アニオン性、または中性脂肪またはリポソームを使用して増強させ得る。

【１９７５】

いくつかの実施形態では、１つを超えるｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡが、標的遺伝子の発現を減少させるために使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡのうちの１つ以上が一緒に使用される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１ ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、ＬＡＧ３ ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、ＣＩＳＨを標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書におけるＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３、及び／またはＣＩＳＨのうちの１つ以上を標的とするｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、Ａｄｖｉｒｎａ ＬＬＣ（Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ，ＵＳＡ）または複数の他のベンダーから市販されている。

【１９７６】

いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、別のｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、ｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ならびにＬＡＧ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３のうちの１つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡま

たはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３を標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨを標的とする。いくつかの実施形態では、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｉＲＮＡまたはｓｄＲＮＡは、ＣＢＬＢを標的とする。

【１９７７】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を提供する。本発明の実施形態は、１つ以上のタンパク質の発現の促進及び１つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡまたはＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。ＴＩＬ集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。かかる方法は、以下に記載の方法、ならびに本明細書の他の場所に記載のウイルス及びトランスポゾン方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを遺伝子修飾してＣＣＲを発現させる方法はまた、かかる遺伝子の安定したノックアウトまたはかかる遺伝子の一過性ノックダウンのいずれかを介して遺伝子の発現を抑制する修飾を含んでもよい。

【１９７８】

いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団におけるＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、１つ以上のタンパク質の生成または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Ｔｓｏｎｇ，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．１９９１，６０，２９７－３０６及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第５，０１９，０３４号、同第５，１２８，２５７号、同第５，１３７，８１７号、同第５，１７３，１５８号、同第５，２３２，８５６号、同第５，２７３，５２５号、同第５，３０４，１２０号、同第５，３１８，５１４号、同第６，０１０，６１３号、及び同第６，０７８，４９０号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える

、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、ＴＩＬをパルス電場で処理して、ＴＩＬの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、１００Ｖ／ｃｍ以上の電界強度を有する、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列をＴＩＬに適用するステップを含み、少なくとも３つのＤＣ電気パルス列は、以下の特徴のうちの１つ、２つ、または３つを有する：（１）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス振幅が互いに異なる、（２）少なくとも３つのパルスのうちの少なくとも２つのパルス幅が互いに異なる、及び（３）少なくとも３つのパルスのうちの２つの第１のセットの第１のパルス間隔が、少なくとも３つのパルスのうちの２つの第２のセットの第２のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、ＴＩＬの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法（リン酸カルシウムＤＮＡ沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス）は、当該技術分野で知られており、Ｇｒａｈａｍ ａｎｄ ｖａｎ ｄｅｒ Ｅｂ，Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １９７３，５２，４５６－４６７、Ｗｉｇｌｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１９７９，７６，１３７３－１３７６、及びＣｈｅｎ ａｎｄ Ｏｋａｙａｒｅａ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１９８７，７，２７４５－２７５２、ならびに米国特許第５，５９３，８７５号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質Ｎ－［１－（２，３－ジオレイルオキシ）プロピル］－ｎ，ｎ，ｎ－トリメチルアンモニウムクロリド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム配合物を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Ｒｏｓｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １９９１，１０，５２０－５２５及びＦｅｌｇｎｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８７，８４，７４１３－７４１７、ならびに米国特許第５，２７９，８３３号、同第５，９０８，６３５号、同第６，０５６，９３８号、同第６，１１０，４９０号、同第６，５３４，４８４号、及び同第７，６８７，０７０号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第５，７６６，９０２号、同第６，０２５，３３７号、同第６，４１０，５１７号、同第６，４７５，９９４号、及び同第７，１８９，７０５号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。ＴＩＬは、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【１９７９】
ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のＤＮＡ配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）または相同指向修復（ＨＤＲ）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子生成物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【１９８０】
部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて大きく２つのカテゴリーに分類され得、ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮは、タンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を達成するが、Ｃａｓ９などのＣＲＩＳＰＲシステムは、標的ＤＮＡと直接塩基対を形成する短いＲＮＡガイド分子によって、かつタンパク質－ＤＮＡ相互作用によって特定のＤＮＡ配列を標的とする。例えば、Ｃｏｘ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２０１５，Ｖｏｌ．２１，Ｎｏ．２を参照されたい。

【１９８１】
本発明のＴＩＬ拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及びＺＦＮ法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。ある実施形態によれば、ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、またはＺＦＮ法のうちの１つ以上によって、ＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたＴＩＬは、インビトロでそれらを修飾されていないＴＩＬと比較することによって、例えば、修飾されていないＴＩＬと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、改善された治療効果について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法、及び／またはＺＦＮ法を使用してＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【１９８２】
本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲシステム、ＴＡＬＥＮシステム、及びＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のＭａｘＣｙｔｅ　ＳＴＸシステムである。本発明との使用に好適であり得る、ＢＴＸ－Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓから入手可能なＡｇｉｌｅＰｕｌｓｅシステムもしくはＥＣＭ８３０、Ｃｅｌｌａｘｅｓｓ　Ｅｌｅｋｔｒａ（Ｃｅｌｌｅｃｔｒｉｃｏｎ）、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ（Ｌｏｎｚａ／Ａｍａｘａ）、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ　ＭＸｃｅｌｌ（ＢＩＯＲＡＤ）、ｉＰｏｒａｔｏｒ－９６（Ｐｒｉｍａｘ）、またはｓｉＰＯＲＴｅｒ９６（Ａｍｂｉｏｎ）などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーション

システムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、ＴＩＬ拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【１９８３】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９またはＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１）によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を引き起こし、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のＣＲＩＳＰＲ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１９８４】

ＣＲＩＳＰＲは、「ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｒｌｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔｓ（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るＣＲＩＳＰＲシステムには、３つの型：Ｉ型、ＩＩ型、及びＩＩＩ型がある。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９によって例示される）は、最もよく特徴付けられているシステムのうちの１つである。

【１９８５】

ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来のＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来侵入物のＤＮＡを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という２つの異なる特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布しており、外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーは、ＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いＣＲＩＳＰＲ ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）に処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列、及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列が必要である。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムが再標的されて、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にいずれのＤＮＡ配列も切断することができる。天然システムにおけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子操作で使用するために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）に簡略化され得る。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なｃｒＲＮＡ成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Ｃａｓタンパク質の異なるバリアント（例えば、ＣｐｆｌなどのＣａｓ９のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【１９８６】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、Ｔ

ＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１９８７】

ＣＲＩＳＰＲ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１９８８】

ＣＲＩＳＰＲ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，６９７，３５９号、同第８，９９３，２３３号、同第８，７９５，９６５号、同第８，７７１，９４５号、同第８，８８９，３５６号、同第８，８６５，４０６号、同第８，９９９，６４１号、同第８，９４５，８３９号、同第８，９３２，８１４号、同第８，８７１，４４５号、同第８，９０６，６１６号、及び同第８，８９５，３０８号に記載されており、各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなどのＣＲＩＳＰＲ法を行うための供給源は、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔなどの企業から市販されている。

【１９８９】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＴＩＬ集団の遺伝子修飾は、米国特許第ＵＳ９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１９９０】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Ｇｅｎ２）に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を引き起こし、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分において増強させる。

【１９９１】

ＴＡＬＥは、転写活性化因子様エフェクタータンパク質を表し、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）を含む。遺伝子編集のためにＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌Ｘａｎｔｈｏｍｏｎａｓ属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含む。ＴＡＬＥ特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥ反復配列は、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメイン内の特定のＲＶＤは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、ＩＩＳ型ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なＴＡＬＥヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域によって分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を生成する。

【１９９２】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、ＴＡＬＥ反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザー定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計されたＴＡＬＥアレイも、Ｃｅｌｌｅｃｔｉｓ Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ（Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ）、Ｔｒａｎｓｐｏｓａｇｅｎ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ（Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ，ＵＳＡ）、及びＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ，ＵＳＡ）から市販されている。本発明での使用に好適なＴＡＬＥ法及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許公開第ＵＳ２０１１／０２０１１１８Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１１７８６９Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０３１５８８４Ａ１号、同第ＵＳ２０１５／０２０３８７１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１６／０１２０９０６Ａ１号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【１９９３】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【１９９４】

ＴＡＬＥ法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【１９９５】

ＴＡＬＥ法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第８，５８６，５２６号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【１９９６】

ＴＩＬを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って、または米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／０２９９６４４Ａ１号及び同第ＵＳ２０２０／０１２１７１９Ａ１号、ならびに米国特許第１０，９２５，９００号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を引き起こし、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、ＴＩＬ拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的ＴＩＬ集団の少なくとも一部において増強させる。

【１９９７】

個々のジンクフィンガーは、保存されたββα立体配置でおよそ３０個のアミノ酸を含む。αらせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでＤＮＡの主溝の３ｂｐと接触する。ジンクフィンガーは、２つのタンパク質ドメインを有する。第１のドメインは、ＤＮＡ結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第２のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断を担っている。

【１９９８】
個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々９～１８塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計１８塩基対を認識する３フィンガーＺＦＮの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための１つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々３塩基対のＤＮＡ配列を認識することができる３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識することができる３フィンガーアレイを生成することを含む。あるいは、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。操作されたジンクフィンガーは、Ｓａｎｇａｍｏ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）及びＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）から市販されている。

【１９９９】
ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２、ＧＵＣＹ１Ｂ３、ＴＯＸ、ＳＯＣＳ１、ＡＮＫＲＤ１１、及びＢＣＯＲが含まれる。

【２０００】
ジンクフィンガー法によりＴＩＬを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１が含まれる。

【２００１】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第６，５３４，２６１号、同第６，６０７，８８２号、同第６，７４６，８３８号、同第６，７９４，１３６号、同第６，８２４，９７８号、同第６，８６６，９９７号、同第６，９３３，１１３号、同第６，９７９，５３９号、同第７，０１３，２１９号、同第７，０３０，２１５号、同第７，２２０，７１９号、同第７，２４１，５７３号、同第７，２４１，５７４号、同第７，５８５，８４９号、同第７，５９５，３７６号、同第６，９０３，１８５号、及び同第６，４７９，６２６号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【２００２】
ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Ｂｅａｎｅ，ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒａｐｙ，２０１５，２３　１３８０－１３９０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２００３】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１

９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むが、これらに限定されない追加の機能を含むように任意選択で遺伝子操作される。ある特定の実施形態では、この方法は、高親和性ＴＣＲ、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２、もしくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原で標的とされるＴＣＲ、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、ＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子操作することを含む。適切には、ＴＩＬ集団は、本明細書に記載のＴＩＬの第１の集団、第２の集団、及び／または第３の集団であり得る。

【２００４】

Ｄ．ＴＩＬ製造のための閉鎖系

本発明は、ＴＩＬ培養プロセス中に閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止及び／または低減を可能にし、より少数のフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、２つの容器を使用する。

【２００５】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ｃｂｅｒ／ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓ．ｈｔｍ及びｈｔｔｐｓ：／／ｗｗｗ．ｆｄａ．ｇｏｖ／ＢｉｏｌｏｇｉｃｓＢｌｏｏｄＶａｃｃｉｎｅｓ／ＧｕｉｄａｎｃｅＣｏｍｐｌｉａｎｃｅＲｅｇｕｌａｔｏｒｙＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ／Ｇｕｉｄａｎｃｅｓ／Ｂｌｏｏｄ／ｕｃｍ０７６７７９．ｈｔｍで見つけることができる。

【２００６】

滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終産物の配合物の容器内で配合される。

【２００７】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、ＴＩＬを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、１つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、第１の容器は閉鎖されたＧ容器であり、ＴＩＬ集団が遠心分離され、第１の閉鎖されたＧ容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、２つの容器が使用される場合、注入バッグは、ＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【２００８】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約１００％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１０％～約９０％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約１５％～約８５％である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約５％、約１０％、約１５％、約２０％、約２５％、約３０％、約３５％、約４０％、約４５％、約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９５％、約９７％、約９８％、約９９％、または約１００％である。

【２００９】

閉鎖系は、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、ＴＩＬの成長を可能にする。

【２０１０】

さらに、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、ＴＩＬ

増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖された細胞培養システムを提供する。

【２０１１】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態でＴＩＬの成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。さらに、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【２０１２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの増殖に最適な培養成分を置換または添加することができ、ＩＬ－２及び／またはＯＫＴ３などの因子、ならびに組み合わせを添加することができる。

【２０１３】

Ｅ．ＴＩＬの任意選択の凍結保存

バルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）または拡張されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）のいずれかを、任意選択で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的ＴＩＬ集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第２の拡張後に採取されたＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図１及び／または図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）の例示的なステップＦにおいてＴＩＬに起こる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する。これは、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。

【２０１４】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意選択で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【２０１５】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＣＳ１０凍結保存培地（ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０、ＢｉｏＬｉｆｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では

、ＴＩＬ集団は、約１：１（体積：体積）比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のＩＬ－２をさらに含む。

【２０１６】

上で考察されたように、また図１及び／または８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるようなステップＡ～Ｅで例示されるように、凍結保存は、ＴＩＬ拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第１の拡張後のＴＩＬの拡張集団（例えば、ステップＢに従って提供される）、または図１もしくは８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）のステップＤによる１回以上の第２の拡張後のＴＩＬの拡張集団を凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、ＴＩＬ集団を凍結溶液、例えば、８５％補体不活性化ＡＢ血清及び１５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、－８０℃で２４時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Ｓａｄｅｇｈｉ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｏｎｃｏｌｏｇｉｃａ ２０１３，５２，９７８－９８６を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、５％ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、細胞培養培地＋５％ＤＭＳＯ中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、実施例６に提供される方法に従って凍結保存される。

【２０１７】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ５分の４が解凍されるまで３７℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意選択で１回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたＴＩＬは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【２０１８】

場合によっては、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢのＴＩＬ集団は、以下に論じられるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、バルクＴＩＬ集団を、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＣ及びステップＤに供し、その後、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＤの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾されたＴＩＬが治療法に使用される場合、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢまたはステップＤを、好適な治療のために遺伝子修飾に供することができる。

【２０１９】

Ｆ．拡張ＴＩＬの表現型特徴

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／また

は図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＢにおける第１の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＣにおける遷移中に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＣによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＤにおける第２の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの表現型特徴は、図１または８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）からのステップＤによる２回以上の拡張後に分析される。

【２０２０】

いくつかの実施形態では、マーカーは、ＣＤ８及びＣＤ２８からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ｂ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、ＣＤ２８の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の本発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、高いＣＤ２８発現は、より若く、より持続的なＴＩＬ表現型を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【２０２１】

いくつかの実施形態では、ＣＤ８及び／またはＣＤ２８に基づく第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団、または採取されたＴＩＬ集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡張するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【２０２２】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス（例えば、例えば図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び

／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるＧｅｎ３プロセス）と比較して、例えば図８（特に、例えば図８Ａ）に提供される２Ａプロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生されたＴＩＬ上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７及びＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。

【２０２３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬメモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ナイーブ（ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、セントラルメモリー（ＣＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、エフェクターメモリー（ＥＭ、ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ－）ＴＩＬを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ４＋及び／またはＣＤ８＋ＴＩＬは、ＲＡ＋エフェクターメモリー／エフェクター（ＴＥＭＲＡ／ＴＥＦＦ、ＣＤ４５ＲＡ＋ＣＤ６２Ｌ＋）ＴＩＬを含む。

【２０２４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢ、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう１つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グランザイムＢを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、グラニュライシンを発現する。

【２０２５】

いくつかの実施形態では、再刺激されたＴＩＬは、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供されるように、急速な第２の拡張ステップ後、ステップＤの後のＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの健康は、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ）に提供されるような２Ａプロセスのステップと比較して、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に提供される、例えば、Ｇｅｎ３プロセスのステップＤにおけるＩＦＮ－γ産生の増加は、ステップＤのＴＩＬの細胞傷害能の増加を示している。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、エクスビボでのＴＩＬ中で測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例え

ば図８Ｂの方法を含む、本発明の方法によって生成されたＴＩＬを含む、ＴＩＬにおいてエクスビボで測定される。

【２０２６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５倍多くのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【２０２７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ～約１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、

図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いく

つかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／

または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬのＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または
図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【２０２８】

いくつかの実施形態では、少なくとも１００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも２５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも３５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも４５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも５５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも６５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、細胞、少なくとも７５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも８５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、少なくとも９５０ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞、または少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び

／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／また

は図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生
されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４５，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞のＩＦＮ－γ分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及

び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【２０２９】

Ｔリンパ球及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって生成される。これらの遺伝子セグメント：Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（接合）、及びＣ（一定）は、免疫グロブリン及びＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるＴＩＬを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるものもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに採取されたＴＩＬ及び／または図８（特に、例えば図８Ａ）に例示されるようにＧｅｎ２と称される方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第１の拡張で取得されたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはＴ細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、Ｔ細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるＴ細胞受容体のうちの１つにある。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、ＴＣＲａｂ（すなわち、ＴＣＲα／β）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドＣＤＲの数に基づくＧｅｎ２と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

【２０３０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの活性化及び疲弊は、１つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＣＤ３、ＰＤ－１、２Ｂ４／ＣＤ２４４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＢＴＬＡ、ＫＬＲＧ、ＴＩＭ－３、ＣＤ１９４／ＣＣＲ４、ＣＤ４、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ１８３、ＣＤ６９、ＣＤ９５、ＣＤ１２７、ＣＤ１０３、及び／またはＬＡＧ－３）からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ、及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、ＢＴＬＡ、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＬＡＧ－３、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９＋、ＣＤ１０３＋／ＣＤ６９－、ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴ及び／またはＴＩＭ－３からなる群から選択される１つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、Ｔ細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び／または分析され得る。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞マーカーには、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ３、ＦｏｘＰ３、Ｔｉｍ－３、ＰＤ－１、ＣＤ１０３、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＢＴＬＡ－４、ＩＣＯＳ、Ｋｉ６７、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ４５、ＣＤ４、及び／またはＣＤ５９からなる群から

選択される１つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。
【２０３１】
いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ～３０００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１４０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１６０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１８０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２４０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２６０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２８０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、３００００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬまたはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または

図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／また

は図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴ

ＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ～３００００ｐｇ／１０^{6}以上のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１６０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、２８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬ、３０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬまたはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／また

は図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１１０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１３０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１５０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１７０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１９０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び

／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８０００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００００ｐｇ／１０^{6}超のＴＩＬグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産
生されるＴＩＬである。

【２０３２】

いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超～３０００００ｐｇ／ｍＬ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ

及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超、２０００ｐｇ／ｍＬ超、３０００ｐｇ／ｍＬ超、４０００ｐｇ／ｍＬ超、５０００ｐｇ／ｍＬ超、６０００ｐｇ／ｍＬ超、７０００ｐｇ／ｍＬ超、８０００ｐｇ／ｍＬ超、９０００ｐｇ／ｍＬ超、１００００ｐｇ／ｍＬ超、２００００ｐｇ／ｍＬ超、３００００ｐｇ／ｍＬ超、４００００ｐｇ／ｍＬ超、５００００ｐｇ／ｍＬ超、６００００ｐｇ／ｍＬ超、７００００ｐｇ／ｍＬ超、８００００ｐｇ／ｍＬ超、９００００ｐｇ／ｍＬ超、１０００００ｐｇ／ｍＬ超またはそれ以上のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または

図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、５００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、７００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、９００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１０００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢを示すＴＩＬは、ＴＩＬグランザイムＢ分泌は、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図

８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、１８０００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２２００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２４００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２６００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、２８００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、３００００ｐｇ／ｍＬ超のグランザイムＢ分泌を示すＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋを含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【２０３３】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張方法は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋに提供されるようなＴＩＬを含む、インビトロで増加したグランザイムＢ分泌を示す拡張されたＴＩＬ集団を産生する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍～５０倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３倍増

加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも６倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも７倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも８倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも９倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも１０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも２０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも３０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも４０倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張されたＴＩＬ集団のグランザイムＢ分泌は、拡張されていないＴＩＬ集団と比較して、少なくとも５０倍増加する。

【２０３４】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上低いレベルのＴＮＦ－α　（すなわち、ＴＮＦ　－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも１倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも２倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも３倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも４倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌と比較して、少なくとも５倍低いレベルのＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【２０３５】
いくつかの実施形態では、少なくとも２００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α（すなわち、ＴＮＦ－アルファ）分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも１０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも２０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも３０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも４０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも５０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも６０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも７０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも８０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または

図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。いくつかの実施形態では、少なくとも９０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞～約１０，０００ｐｇ／ｍＬ／５ｅ５細胞以上のＴＮＦ－α分泌が可能なＴＩＬは、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬである。

【２０３６】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びグランザイムＢのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ、グランザイムＢ及びＴＮＦ－αのレベルを測定して、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されるＴＩＬの表現型特徴を決定する。

【２０３７】

いくつかの実施形態では、表現型特性決定は、凍結保存後に調べられる。

【２０３８】

Ｇ．追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を取得することと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張を約１～７日間または約１～８日間行って第２のＴＩＬ集団を取得し、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第２の拡張を行って第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張を約１～１１日間または約１～１０日間行って第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容

器内での第１の小規模培養で約３～４日間の期間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養からのかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間、または約４～８日間の期間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間、または約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間、または約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養される。

【２０３９】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ることと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～８日間行われて第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～８日間行われて第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～８日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間の期間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規

模培養からのかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～６日間の期間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～６日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～５日間培養される。

【２０４０】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ａ）対象から得られた腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第１のＴＩＬ集団を得ることと、（ｂ）ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行うことであって、プライミングによる第１の拡張が約１～７日間行われて第２のＴＩＬ集団が得られ、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、プライミングによる第１の拡張を行うことと、（ｃ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１～１１日間行われて第３のＴＩＬ集団が得られ、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第２の容器内で、小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間の期間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養からのかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間の期間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養由来の第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２

、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（１）第２のＴＩＬ集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（２）第１の小規模培養からの第２のＴＩＬ集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－ｇ５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、小規模培養からのかかる第２の容器に移された第２のＴＩＬ集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２０４１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団を、外因性抗原提示細胞（ＡＰＣ）をさらに含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）における培養培地中のＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）における培養培地中のＡＰＣの数よりも多い、方法を提供する。

【２０４２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地に追加の外因性ＡＰＣが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～

正確にまたは約６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０４９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５０】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５１】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．７：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～

正確にまたは約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０５９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６０】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６１】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１～正確にまたは約２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約１０：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１～正確にまたは約２．９：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６７】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．８：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６８】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．７：１の範

囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０６９】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．６：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７０】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．５：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７１】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．４：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７２】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．３：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７３】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．２：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７４】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、約２：１～約２．１：１の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７５】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数の、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数に対する比が、正確にまたは約１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．１：１、２．２：１、２．３：１、２．４：１、２．５：１、２．６：１、２．７：１、２．８：１、２．９：１、３：１、３．１：１、３．２：１、３．３：１、３．４：１、３．５：１、３．６：１、３．７：１、３．８：１、３．９：１、４：１、４．１：１、４．２：１、４．３：１、４．４：１、４．５：１、４．６：１、４．７：１、４．８：１、４．９：１、または５：１になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７７】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張で追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約1×10^{8}、1.1×10^{8}、1.2×10^{8}、1.3×10^{8}、1.4×10^{8}、1.5×10^{8}、1.6×10^{8}、1.7×10^{8}、1.8×10^{8}、1.9×10^{8}

、２×１０^{8}、２．１×１０^{8}、２．２×１０^{8}、２．３×１０^{8}、２．４×１０^{8}、２．５×１０^{8}、２．６×１０^{8}、２．７×１０^{8}、２．８×１０^{8}、２．９×１０^{8}、３×１０^{8}、３．１×１０^{8}、３．２×１０^{8}、３．３×１０^{8}、３．４×１０^{8}、または３．５×１０^{8}個のＡＰＣであり、急速な第２の拡張で追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}、４×１０^{8}、４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}、５×１０^{8}、５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}、６×１０^{8}、６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}、７×１０^{8}、７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}、８×１０^{8}、８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}、９×１０^{8}、９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}、または１×１０^{9}個のＡＰＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７８】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約３．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約３．５×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約１×１０^{9}個のＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０７９】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約１．５×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約３×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約７．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０８０】

他の実施形態では、本発明は、一次の第１の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約２×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択され、急速な第２の拡張において追加されるＡＰＣの数が、正確にまたは約４．５×１０^{8}個のＡＰＣ～正確にまたは約５．５×１０^{8}個のＡＰＣの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０８１】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約２．５×１０^{8}個のＡＰＣが一次の第１の拡張に追加され、かつ正確にまたは約５×１０^{8}個のＡＰＣが急速な第２の拡張に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０８２】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０８３】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々の中で、第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）において取得され、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）において取得され、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）において取得され、ステップ（ｃ）における複数の容器からの治療的ＴＩＬ集団が合わされ

、ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を生成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８４】
他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均等に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８５】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも２個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８６】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８７】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８８】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～１０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０８９】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２～５個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９０】
他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９１】
他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第１の拡張がステップ（ｂ）において第１のＴＩＬ集団で行われる各容器の場合、ステップ（ｃ）における急速な第２の拡張が、同じ容器内でかかる第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９２】
他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９３】
他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９４】
他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第１のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２０９５】
他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、当該方法を提供する。
【２０９６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状

化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０９７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０９８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２０９９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１００】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０４】

他の実施形態では、本発明は、第２の容器が第１の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０５】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、当該方法を提供する。

【２１０６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１０９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第２のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、プライミングによる第１の拡張が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で行われ、ステップ（ｃ）において、急速な第２の拡張が、第１の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１４】

他の実施形態では、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１細胞層～正確にまたは約３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化される、当該方法を提供する。

【２１１５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１

．５細胞層～正確にまたは約２．５細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約２細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約１、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、または３細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３細胞層～正確にまたは約１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１１９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４細胞層～正確にまたは約８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１２０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約３、４、５、６、７、８、９、または１０細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１２１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、正確にまたは約４、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、または８細胞層の平均厚さで第１のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１２２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：１０の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１２３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：９の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１２４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、当該方法を提供する。
【２１２５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、当該方法を提供する。
【２１２６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、当該方法を提供する。
【２１２７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、当該方法を提供する。
【２１２８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、当該方法を提供する。
【２１２９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、当該方法を提供する。
【２１３０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養

培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１～正確にまたは約１：２の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．２～正確にまたは約１：８の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．３～正確にまたは約１：７の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．４～正確にまたは約１：６の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．５～正確にまたは約１：５の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．６～正確にまたは約１：４の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステ

ップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．７～正確にまたは約１：３．５の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．８～正確にまたは約１：３の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）で補充することにより一次の第１の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（ｃ）において追加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において追加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されるＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．９～正確にまたは約１：２．５の範囲から選択される、当該方法を提供する。

【２１３９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われ、ステップ（ｃ）において添加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：２の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、一次の第１の拡張が、第１のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することによって行われ、ステップ（ｃ）において添加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｂ）において添加されるＡＰＣの数よりも多く、ステップ（ｂ）において層状化されたＡＰＣの層の平均数の、ステップ（ｃ）において層状化されたＡＰＣの層の平均数に対する比が、正確にまたは約１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．１、１：２．２、１：２．３、１：２．４、１：２．５、１：２．６、１：２．７、１：２．８、１：２．９、１：３、１：３．１、１：３．２、１：３．３、１：３．４、１：３．５、１：３．６、１：３．７、１：３．８、１：３．９、１：４、１：４．１、１：４．２、１：４．３、１：４．４、１：４．５、１：４．６、１：４．７、１：４．８、１：４．９、１：５、１：５．１、１：５．２、１：５．３、１：５．４、１：５．５、１：５．６、１：５．７、１：５．８、１：５．９、１：６、１：６．１、１：６．２、１：６．３、１：６．４、１：６．５、１：６．６、１：６．７、１：６．８、１：６．９、１：７、１：７．１、１：７．２、１：７．３、１：７．４、１：７．５、１：７．６、１：７．７、１：７．８、１：７．９、１：８、１：８．１、１：８．２、１：８．３、１：８．４、１：８．５、１：８．６、１：８．７、１：８．８、１：８．９、１：９、１：９．１、１：９．２、１：９．３、１：９．４、１：９．５、１：９．６、１：９．７、１：９．８、１：９．９、または１：１０から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４１】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約１．５：１～正確にまたは約１００：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４２】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団におけるＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約５０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４３】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２５：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４４】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約２０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４５】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数の、第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬの数に対する比が、正確にまたは約１０：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４６】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも正確にまたは約５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４７】

他の実施形態では、本発明は、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団よりも数が少なくとも正確にまたは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始の正確にまたは約２日後または正確にまたは約３日後に、細胞培養培地に追加のＩＬ－２が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１４９】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）において採取されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）の後に、（ｅ）ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を、任意選択でＨｙｐｏＴｈｅｒｍｏｓｏｌを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５１】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）において採取されたＴＩＬ集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５２】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、採取されたＴＩＬ集団の、凍結保

存培地に対する１：１の比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５３】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５４】

他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が$２．５\times１０^{8}$であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において細胞培養に追加されるＡＰＣの総数が５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５７】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５８】

他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１５９】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）における採取が膜ベースの細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）における採取がＬＯＶＯ細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約１０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約１５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約２０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約２５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約３５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１６９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約４０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約４５～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約５０～正確にまたは約６０個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が容器につき正確にまたは約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、または６０個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７３】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２７mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７４】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２０mm^3～正確にまたは約５０mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７５】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１mm^3～正確にまたは約３０mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７６】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２２mm^3～正確にまたは約２９．５mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７７】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２３mm^3～正確にまたは約２９mm^3の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１７８】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２４ｍｍ^3～正確にまたは約２８．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１７９】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２５ｍｍ^3～正確にまたは約２８ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８０】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２６．５ｍｍ^3～正確にまたは約２７．５ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８１】
他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、または５０ｍｍ^{3}の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８２】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約３０～正確にまたは約６０個の断片を含み、正確にまたは約１３００ｍｍ^3～正確にまたは約１５００ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８３】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１３５０ｍｍ^{3}の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８４】
他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約５０個の断片を含み、正確にまたは約１グラム～正確にまたは約１．５グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８５】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がＧ容器またはＸｕｒｉ細胞バッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８６】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８７】
他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８８】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１８９】
他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２１９０】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間が正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、または１１日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９２】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約５日、６日、または７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）における第１の期間及びステップ（ｃ）における第２の期間が各々、正確にまたは約７日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日～正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２１９９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２００】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２０１】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日～正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２０２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日～正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１７日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２０９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１４日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２１０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１５日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２１１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１６日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２１２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が合計で正確にまたは約１８日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２１３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｄ）で採取された治療的ＴＩＬ集団が、ＴＩＬの治療上有効な投与量に十分なＴＩＬを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２１４】
他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なＴＩＬの数が、正確にまた

は約２．３×１０^{10}～正確にまたは約１３．７×１０^{10}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２１５】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２１６】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日間より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍、またはそれより多くのインターフェロンガンマ生成を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２１７】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ生成を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２１８】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍以上のインターフェロンガンマ生成を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２１９】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞が、ステップ（ｂ）の第２の細胞集団から取得されたエフェクターＴ細胞及び／またはセントラルメモリーＴ細胞と比較して増加したＣＤ８及びＣＤ２８発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２２０】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が閉鎖された容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２２１】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧ容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２２２】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１０であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２２３】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－１００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２２４】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がＧＲＥＸ－５００であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２２５】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。

【２２２６】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）またはＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較

して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２２７】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２２８】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２２９】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、治療的ＴＩＬ集団が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せず、かつＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２３０】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１６日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２３１】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１７日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２３２】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団であって、１８日間より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、治療的ＴＩＬ集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ生成、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【２２３３】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ生成を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２２３４】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２２３５】

他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２２３６】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能で

あるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２３７】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２３８】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ生成が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２３９】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずにＴＩＬの第１の拡

張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２４０】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２４１】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２４２】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２４３】

他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣを添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２４４】

他の実施形態では、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡張が行われるプ

ロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ生成が可能である治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また、例えば、図８（特に、例えば、図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ及び／または図８Ｅ及び／または図８Ｆ及び／または図８Ｇ及び／または図８Ｈ及び／または図８Ｉ及び／または図８Ｊ及び／または図８Ｋ）に示されるように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも３倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【２２４５】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【２２４６】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２４７】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２４８】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２４９】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５０】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、約１１日間にわたって急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２２５１】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、約８日間にわたってプライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２２５２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象からの腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象からの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象からの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象からの腫瘍組織の１～約２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２５９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２６０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２６１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２６２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２６３】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２６４】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２６５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２６６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２６７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２６８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２６９】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２７０】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２７１】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、対象由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２７２】
他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約１１日間培養することによって急速な第２の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２

２日で完了する。

【２２７３】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、第１のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む培養培地中で約８日間培養することによってプライミングによる第１の拡張ステップを行い、第２のＴＩＬ集団を取得することを含み、かつ（ｉｖ）方法が、第２のＴＩＬ集団の培養物を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む培養培地中で約５日間培養し、培養物を最大５つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、ＩＬ－２を含む培養培地中で約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大５つの継代培養物が各々、第２のＴＩＬ集団の培養が急速な第２の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第２のＴＩＬ集団の培養物は、最大５つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２２７４】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）方法が、対象由来の腫瘍組織の１～約１０個のコア生検から第１のＴＩＬ集団を取得することを含み、（ｉｉ）方法が、プライミングによる第１の拡張ステップを行う前に、Ｇ－ＲＥＸ－１００Ｍフラスコ内の０．５ＬのＣＭ１培養培地中６０００ＩＵ　ＩＬ－２／ｍＬを含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を約３日間培養するステップを行うことを含み、（ｉｉｉ）方法が、６０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び約10^8個のフィーダー細胞を含む０．５ＬのＣＭ１培養培地を添加し、約８日間培養することによって、プライミングによる第１の拡張を行うことを含み、かつ（ｉｖ）方法が、（ａ）第２のＴＩＬ集団を、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬ　ＯＫＴ－３、及び５×10^9個のフィーダー細胞を有する５ＬのＣＭ２培養培地を含むＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに移し、約５日間培養し、（ｂ）10^9個のＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を有する５ＬのＡＩＭ－Ｖ培地を含む最大５つのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコの各々に移すことによって培養物を最大５つの継代培養物に分割し、継代培養物を約６日間培養することによって、急速な第２の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約２２日で完了する。

【２２７５】

他の実施形態では、本発明は、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養することによってドナーから取得された第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の増殖を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｂ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の増殖を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｃ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第２の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりも大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内でのより大規模な培養で約４～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ

細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約４～７日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養される。

【２２７６】

他の実施形態では、本発明は、急速な第２の拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移し、小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第２の容器内での大規模培養で約５～７日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２７７】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での第１の小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）第１の小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器とサイズが等しい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第２の容器内で、第１の小規模培養由来のかかる第２の容器に移された第１のＴ細胞集団の一部が、第２の小規模培養で約５～７日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２７８】

他の実施形態では、急速拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約２～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内

で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～７日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２７９】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５～６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２８０】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約５日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２８１】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２８２】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張ステップが、複数のステップに分けられて、（ａ）第１のＴ細胞集団を、第１の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ容器内での小規模培養で約３～４日間培養することによって急速な第２の拡張を行うことと、その後、（ｂ）小規模培養由来の第１のＴ細胞集団を、第１の容器よりもサイズが大きい２、３、または４個の第２の容器、例えば、Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳ容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第２の容器内で、かかる第２の容器に移された小規模培養由来の第１のＴ細胞集団の一部が、より大規模な培養で約７日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２８３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）のプライミングによる第１の拡張が最大７日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２２８４】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提

供する。
【２２８５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２８６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２８７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１１日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２８８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２８９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が７日または８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大１０日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大９日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）におけるプライミングによる第１の拡張が８日の期間中に行われ、かつステップ（ｂ）の急速な第２の拡張が最大８日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含む第１の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９５】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方

法を提供する。
【２２９６】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９７】
他の実施形態では、本発明は、第１の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団がＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２２９９】
他の実施形態では、本発明は、第２の培養培地が４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３００】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３０３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のガス透過性表面を含む容器内の第１の培養培地中で培養され（ここで、第１の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内の第２の培養培地中で培養される（ここで、第２の培養培地が、４－１ＢＢアゴニスト、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に層状化され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０４】
他の実施形態では、本発明は、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数の、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数に対する比が、約２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０５】
他の実施形態では、本発明は、第１のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約２．５×１０^{8}であり、第２のＡＰＣ集団中のＡＰＣの数が約５×１０^{8}であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２層のＡＰＣの平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４～８層のＡＰＣから選択される平均厚さで第１のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数の、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に層状化されたＡＰＣの平均層数に対する比が、２：１であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３０９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１１】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１２】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるよ

うに修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１３】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１４】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１５】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１６】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１７】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約４．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約７．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１８】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約１．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約３．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約６．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３１９】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約３．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}～正確にまたは約５．５×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択される密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２０】
他の実施形態では、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が正確にまたは約２．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が正確にまたは約４．０×１０^{6}個のＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で第１のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３２１】
他の実施形態では、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２２】
他の実施形態では、本発明は、ＰＢＭＣが照射され、第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２３】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２４】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２５】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞が末梢血リンパ球（ＰＢＬ）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２６】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２７】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団がドナーのアフェレーシス生成物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２８】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、Ｔ細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス生成物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３２９】
他の実施形態では、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋及びＣＤ４５＋であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。
【２３３０】
他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行う前に、Ｔ細胞がＮＫ細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、Ｔ細胞は、第１のＴ細胞集団からのＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の除去によって、第１のＴ細胞集団中のＮＫ細胞から分離される。他の実施形態では、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞は、ＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第１のＴ細胞集団を細胞選別に供することによって、第１のＴ細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＮＫ細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、高いＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞パーセンテージを特徴とする第１のＴ細胞集団におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞を特徴とする腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＮＫ細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のＣＤ３－ＣＤ５６＋細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるＴ細胞の

拡張のために利用される。

【２３３１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約１×１０^{7}Ｔ細胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第１のＴ細胞集団由来の正確にまたは約１×１０^{7}Ｔ細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第１の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３３】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（ｃ）において採取された第２のＴ細胞集団が治療的ＴＩＬ集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３３９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１～２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０

個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１～２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３４９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１個以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１個以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１～２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３５９】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養培地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が第１のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の第２の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを補充することによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張において添加されるＡＰＣの数が、ステップ（ｉｉ）において添加されるＡＰＣの数の少なくとも２倍であり、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団であり、急速な第２の拡張が第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得され治療的ＴＩＬ集団を採取することと、（ｖ）ステップ（ｉｖ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、を含む、当該方法を提供する。

【２３６０】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療的ＴＩＬ集団に拡張するための方法であって、（ｉ）ＩＬ－２を含む第１の細胞培養倍地中で腫瘍試料を約３日間培養することによって対象における腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第１のＴＩＬ集団を取得及び／または受容することと、（

ｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の細胞培養倍地中で第１のＴＩＬ集団を培養することによってプライミングによる第１の拡張を行い、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、プライミングによる第１の拡張が約７日または８日間の第１の期間行われて、第２のＴＩＬ集団が取得され、第２のＴＩＬ集団は第１のＴＩＬ集団よりも数が多い、第２のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第３の細胞培養培地と接触させることによって急速な第２の拡張を行い、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の拡張が約１１日間の第２の期間行われて、第３のＴＩＬ集団が取得され、第３のＴＩＬ集団が治療的ＴＩＬ集団である、第３のＴＩＬ集団を産生することと、（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）から取得された治療的ＴＩＬ集団を採取することと、を含む、当該方法を提供する。

【２３６１】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第３の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３６２】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が２つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物にＩＬ－２を含む第４の培養培地が補充され、約６日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３６３】

他の実施形態では、本発明は、第２の期間の５日目の後に、培養物が最大５つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３６４】

他の実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約２２日間で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【２３６５】

他の実施形態では、本発明は、（ｉ）第１のＴ細胞集団を培養することによってドナーにおける腫瘍の１つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第１のＴ細胞集団のプライミングによる第１の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ｉｉ）ステップ（ａ）においてプライミングされた第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第１のＴ細胞集団を培養することによって第１のＴ細胞集団の急速な第２の拡張を行って成長をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を促進して第２のＴ細胞集団を取得することと、（ｉｖ）第２のＴ細胞集団を採取することと、を含む、Ｔ細胞を拡張する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から取得される。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、２、３、４、５、６、７、８、９及び１０個のコア生検からなる群から選択される。

【２３６６】

いくつかの実施形態では、本発明は、Ｔ細胞またはＴＩＬが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、ＲＰＭＩ　１６４０、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮａｓｅ、及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、Ａｃｃｕｔａｓｅ（商標）、Ａｃｃｕｍａｘ（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロ

テアーゼタイプＸＩＶ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の１つ以上の解離（消化）酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む）、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、及びデオキシリボヌクレアーゼＩ（ＤＮａｓｅ）を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【２３６７】

ＶＩ．免疫調節剤関連腫瘍浸潤リンパ球

本明細書で提供されるのは、ＴＩＬ細胞表面と会合する１つ以上の免疫調節剤を含む修飾された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。いくつかの実施形態では、対象の修飾されたＴＩＬは、患者レシピエントにおけるインビボ生存、増殖及び／または抗腫瘍効果の向上を示す。

【２３６８】

免疫調節剤は、任意の好適な方法を使用して、本明細書に開示されるＴＩＬ（例えば、本明細書で提供される治療薬ＴＩＬ）に付着させることができる。いくつかの実施形態では、１種以上の免疫調節剤は、ＴＩＬ細胞表面に付着される免疫調節融合タンパク質の一部である。いくつかの実施形態では、１種以上の免疫調節剤は、ＴＩＬ細胞表面と会合するナノ粒子の一部として含まれる。免疫調節剤は、患者レシピエントにおけるＴＩＬ生存増殖、及び／または抗腫瘍効果を促進する任意の免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカイン（例えば、インターロイキン）である。例示的な実施形態では、ＴＩＬは、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、及び／またはＩＬ－２１を含む。

【２３６９】

任意の好適なＴＩＬ集団は、本明細書に記載の製造プロセスを使用して産生されるＴＩＬを含む、対象の組成物を産生するように修飾され得る。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに由来する（例えば、図２～６を参照）。例示的な実施形態では、修飾されたＴＩＬは、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに由来する（例えば、図７を参照）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に開示される方法に由来するＰＤ－１陽性ＴＩＬである。

【２３７０】

対象の修飾されたＴＩＬの態様は、本明細書でさらに詳述される。

【２３７１】

Ａ．免疫調節融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、ＴＩＬの表面への免疫調節剤のテザリングを容易にする部分に連結された免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を含む免疫調節融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、細胞膜アンカー部分（膜貫通ドメイン）を含む。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、ＴＩＬ表面抗原に結合するＴＩＬ表面抗原結合部分を含む。これらの融合タンパク質の態様は、以下でさらに詳細に考察される。

【２３７２】

１．膜アンカー免疫調節融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む。膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、細胞膜アンカー部分に連結された免疫調節剤（例えば、サイトカイン）のうちの１つ以上を含む。そのような実施形態では、膜アンカー免疫調節剤は、細胞膜アンカー部分を介してＴＩＬ表面膜にテザリングされ、したがって、免疫調節剤がその効果を標的化された方法で発揮することを可能にする。

【２３７３】

免疫調節剤は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答

を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質が、ＴＩＬ表面上で発現される。例示的な実施形態では、ＴＩＬは、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む。

【２３７４】

免疫調節剤は、免疫調節剤の、ＴＩＬ細胞表へのテザリングを可能にする細胞膜アンカー部分に連結される。好適な細胞膜アンカー部分には、例えば、内因性ＴＩＬ細胞表面タンパク質の膜貫通ドメイン及びそれらの断片が含まれる。対象の融合タンパク質で使用することができる例示的な膜貫通ドメインには、例えば、Ｂ７－１、Ｂ７－２、及びＣＤ８ａ膜貫通ドメイン及びそれらの断片が含まれる。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、内因性ＴＩＬ細胞表面タンパク質の膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインまたはその断片をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、Ｂ７－１、Ｂ７－２もしくはＣＤ８ａ膜貫通細胞内ドメインまたはその断片である。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＩＹＩＷＡＰＬＡＧＴＣＧＶＬＬＬＳＬＶＩＴ（配列番号２３８）のアミノ酸配列を有するＣＤ８ａ膜貫通ドメインである。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、ＬＬＰＳＷＡＩＴＬＩＳＶＮＧＩＦＶＩＣＣＬＴＹＣＦＡＰＲＣＲＥＲＲＲＮＥＲＬＲＲＥＳＶＲＰＶ（配列番号２３９）のアミノ酸配列を有するＢ７－１膜貫通細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、細胞膜アンカー部分は、非ペプチド細胞膜アンカー部分である。例示的な実施形態では、非ペプチド細胞膜アンカー部分は、グリコホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーである。ＧＰＩアンカーは、ホスホエタノールアミンリンカー、糖鎖コア、及びリン脂質尾部を含む構造を有する。いくつかの実施形態では、糖鎖コアは、１つ以上の側鎖で修飾される。いくつかの実施形態では、糖鎖コアは、以下の側鎖：ホスホエタノールアミン基、マンノース、ガラクトース、シアル酸、または他の糖のうちの１つ以上で修飾される。

【２３７５】

膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、膜アンカー免疫調節融合タンパク質（例えば、細胞膜アンカー部分に対する免疫調節剤）の成分の連結を可能にするリンカーを含む。好適なリンカーとしては、少なくとも約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０アミノ酸残基の長さであるリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４５～５０、５０～６０アミノ酸の長さである。好適なリンカーとしては、限定されないが、切断可能なリンカー、非切断可能なリンカー、ペプチドリンカー、可撓性リンカー、剛性リンカー、ヘリカルリンカー、または非ヘリカルリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、Ｇｌｙ及びＳｅｒを任意選択で含むペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、例えば、（ＧＳ）ｎ（配列番号２４０）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号２４１）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４２）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４３）、（ＧＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４４）、及び（ＧＧＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号２４５）を含む、グリシン－セリンポリマーを利用し、ｎは、少なくとも１つの整数（及び一般に、３～１０）である。本組成物及び方法で使用することができる追加のリンカーは、米国特許公開第ＵＳ２００６／００７４００８号、同第ＵＳ２００５０２３８６４９号、及びＵＳ２００６／００２４３１７号に記載されており、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、特にリンカーに関連する関連部分に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＳＬＱ（配列番号２４６）である。

【２３７６】

いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーである。例示的な実施形態では、切断可能なリンカーは、免疫調節剤の、腫瘍微小環境への放出を可能にする。切断可能なリンカーはまた、２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質が同じＴＩＬで共発現される実施形態においても有用である（例えば、図５１ならびに以下の表５８及び５９を参照）。

【２３７７】

【表１９】

表５８．膜アンカーＩＬ－１５及びＩＬ－２１融合タンパク質ＤＮＡ配列

構築物	DNA 配列
teIL-15	atggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggtcaacgtgatcagcgacctgaagaagatcgag gacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccgatgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttct gctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgccagcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcct gtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgt ccacatcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcggag gttccggcggaggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcacgtactgtttc gctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg (配列番号 296)
teIL-21	atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagaccggcacatgatccggatgagacagc tgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagttcctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaattgcgag tggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcgccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaag ctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccggaagaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcc tccaaaagagttcctggaacggttcaagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattct agcggaggcggaggaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggt ggaagcggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacactgatctccg tgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaacgagcggctgagaagagaatct gtgcggcctgtt (配列番号 297)
teIL-15/IL21	atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagaccggcacatgatccggatgagacagc tgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagttcctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaattgcgag tggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcgccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaag ctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccggaagaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcc tccaaaagagttcctggaacggttcaagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattct agcggaggcggaggaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggt ggaagcggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacactgatctccg tgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaacgagcggctgagaagagaatct gtgcggcctgttagagccaagagatctggaagcggcgccaccaactttagcctgctgaaacaggctggcgacgtggaagagaaccctgga cctatggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggtcaacgtgatcagcgacctgaagaagatcg aggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccgatgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgcttt ctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgccagcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcc tgtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcg tccacatcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcgga ggttccggcggaggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcacgtactgttt cgctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg (配列番号 298)

【２３７８】

【表２０－１】

表５９．膜アンカーＩＬ－１２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１　ＤＮＡ配列（ＮＦＡＴプロモーターを含む）

構築物	DNA 配列
NFAT-Te-IL12 DNA配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgttt catacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcata cagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattgg tcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatca ctactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCG CTACCCGCGTGCACTCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAATT GGATTGGTACCCCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGCCG GAGGAGGACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTGCTGGGCTCT GGTAAGACCTTAACCATCCAGGTCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACGT GTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGCCTGCTGCTCCTGCACAAGAAGGA AGACGGCATCTGGTCTACGGATATCCTTAAAGACCAGAAGGAGCCCAAGAACAA AACCTTCCTGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGGCGCTTTACCTGTTGGTGG CTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTTCTCCGTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTC TGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACCCTGTCGGCTGAGCGCGTCCGT GGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGC CCAGCGGCCGAAGAGTCCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGC TCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATACGCGACATCATCAAGCCTGAC CCCCCTAAAAACCTGCAGCTGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTAT CCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCCTGACCTTC TGCGTGCAGGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACC GACAAAACCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAACGCGAGCATCTCCGTACGGG CACAGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTTCCGTGTTCT GGAGGAGGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACCCGGGT ATGTTTCCTTGTCTGCACCACTCTCAGAACTTGCTCCGTGCCGTCTCGAATATGCT GCAGAAGGCCCGCCAGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAGTGAGGAGATCGAT CATGAGGACATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTCTGCCGCTGG AGTTGACAAAGAACGAGAGCTGCCTCAATAGCCGCGAGACTTCCTTCATCACCAA CGGCTCCTGCC

【表２０－２】

	TCGCGAGCCGTAAGACCTCCTTTATGATGGCGCTGTGCCTGTCAAGTATCTACGA AGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGAACGCAAAACTCCTGATG GATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGGACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGC TGATGCAGGCCCTGAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGA GGAACCCGACTTTTACAAGACAAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTACACGCGTTC CGCATTCGGGCCGTGACCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTCGTCCG GCGGGGGGGGCTCCGGTGGGGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGCG GCTCCGGCGGAGGTTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTCTGATTTCC GTCAACGGAATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCCAGATGTAG AGAGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAGAGCGTGAGGCCTGTGTGA (配列番号 299)
NFAT-Tei-IL15DNA配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgttt catacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcata cagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattgg tcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatca ctactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGACTGGACTTGGATACTCTTTCTGGTCGCTGCC GCCACACGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATC GAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACACTGTACACCGAGTCCGAT GTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAG TGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAATCTGA TCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCT GCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAAAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCT TCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCTCATCAGGTGGCGGTGGAAGCGG AGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGCGGAGGTTCCGGCGGAGGATC TCTTCAGCTCCTGCCATCTTGGGCTATCACCCTGATTAGTGTGAATGGGATCTTTG TCATCTGTTGTCTCACGTACTGTTTCGCTCCCCGGTGCAGAGAGAGAAGGCGCAA CGAAAGACTGCGGAGAGAAAGCGTCAGACCCGTGTGA (配列番号 300)

【表２０－３】

NFAT-TeIL21DNA配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctcttttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCATAGCCAGGGCCAAGACCGGCACATGATCCGGATGAGACAGCTGATCGACATCGTGGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCTGAGTTCCTGCCTGCTCCTGAGGACGTGGAAACAAATTGCGAGTGGTCCGCCTTCAGCTGCTTCCAGAAGGCCCAGCTGAAAAGCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATCAACGTGTCCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCTAGCACCAATGCCGGAAGAAGGCAGAAGCACAGACTGACCTGTCCTAGCTGCGACAGCTACGAGAAGAAGCCTCCAAAAGAGTTCCTGGAACGGTTCAAGAGCCTGCTGCAGAAGATGATCCACCAGCACCTGAGCAGCAGAACCCACGGCTCTGAAGATTCTAGCGGAGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGTGGATCAGGCGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGCGGAGGTGGAAGCGGTGGTGGTGGCTCTGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCTCTTCAATTGCTGCCTAGCTGGGCCATCACACTGATCTCCGTGAACGGCATCTTCGTGATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTCGCCCCTAGATGCAGAGAGCGGAGAAGAAACGAGCGGCTGAGAAGAGAATCTGTGCGGCCTGTTTAA (配列番号 301)

【表２０－４】

NFAT-TeIL15-IL21DNA配列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgt ttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttc atacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtca attggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctct ttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTGG CCGCTGCCACAAGAGTGCATAGCCAGGGCCAAGACCGGCACATGATCCGGATG AGACAGCTGATCGACATCGTGGACCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGT GCCTGAGTTCCTGCCTGCTCCTGAGGACGTGGAAACAAATTGCGAGTGGTCCGC CTTCAGCTGCTTCCAGAAGGCCCAGCTGAAAAGCGCCAACACCGGCAACAACG AGCGGATCATCAACGTGTCCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCTAGCACC AATGCCGGAAGAAGGCAGAAGCACAGACTGACCTGTCCTAGCTGCGACAGCTA CGAGAAGAAGCCTCCAAAAGAGTTCCTGGAACGGTTCAAGAGCCTGCTGCAGA AGATGATCCACCAGCACCTGAGCAGCAGAACCCACGGCTCTGAAGATTCTAGC GGAGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGTGGATCAGGCGGTGG CGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGCGGAGGTGGAAGCGGTGGTGGTGGCTCTG GCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCTCTTCAATTGCTGCCTAGCTGGGCC ATCACACTGATCTCCGTGAACGGCATCTTCGTGATCTGCTGCCTGACCTACTGCT TCGCCCCTAGATGCAGAGAGCGGAGAAGAAACGAGCGGCTGAGAAGAGAATCT GTGCGGCCTGTTAGAGCCAAGAGATCTGGAAGCGGCGCCACCAACTTTAGCCT GCTGAAACAGGCTGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGACCTATGGACTGGACTT GGATACTCTTTCTGGTCGCTGCCGCCACACGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACG TGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGAC GCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATG AAGTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAG CATCCACGATACCGTGGAAAATCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCCAG CAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAA AAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATC AACACCTCATCAGGTGGCGGTGGAAGCGGAGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGG CTCAGGCGGCGGAGGTTCCGGCGGAGGATCTCTTCAGCTCCTGCCATCTTGGGC TATCACCCTGATTAGTGTGAATGGGATCTTTGTCATCTGTTGTCTCACGTACTGT TTCGCTCCCCGGTGCAGAGAGAGAAGGCGCAACGAAAGACTGCGGAGAGAAA GCGTCAGACCCGTGTAA (配列番号 302)

【２３７９】

例示的な実施形態では、リンカーは、自己切断２Ａペプチドである。例えば、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．７（１）：２１９３（２０１７）（２Ａペプチドに関連する関連部分において参照により組み込まれる）を参照されたい。２Ａペプチドは、真核細胞における翻訳中のポリペプチドの切断を媒介するウイルスオリゴペプチドである。いくつかの実施形態では、２Ａペプチドは、アミノ酸配列ＧＤＶＥＸｉＮＰＧＰ（配列番号２４７）を有するＣ末端を含み、Ｘｉは、任意の天然に存在するアミノ酸残基である。ある特定の実施形態では、２Ａペプチドは、ブタテシオウイルス－１　２Ａペプチド（ＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号２４８）である。いくつかの実施形態では、２Ａペプチドは、ウマ鼻肺炎Ａウイルス２Ａペプチド（ＧＳＧＱＣＴＮＹＡＬ

ＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ、配列番号２４９）である。ある特定の実施形態では、２Ａペプチドは、口蹄疫ウイルス２Ａペプチド：（ＧＳＧＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、配列番号２５０）である。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、フリン切断可能な配列を含む。例示的なフリン切断可能配列は、例えば、Ｄｕｃｋｅｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ＆Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ １７（１）：１０７－１１２（２００４）、及び米国特許第８，８７１，９０６号に記載されており、これらの各々は参照により、特にフリン切断可能配列に関連する関連部分において本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、２Ａペプチド及びフリン切断可能な配列を含む。例示的ない実施形態では、フリン切断可能な２Ａペプチドは、アミノ酸配列ＲＡＫＲＳＧＳＧＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧＰ（配列番号２５１）を含む。

【２３８０】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、それによって免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）によって膜アンカー免疫調節融合タンパク質に付着される。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカーを介して官能基に可逆的に連結される。好適な分解可能なリンカーには、腫瘍微小環境または炎症組織中に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ２（ＭＭＰ２）またはマトリックスメタロプロテアーゼ９（ＭＭＰ９））などの腫瘍微小環境中のプロテアーゼなどの生物学的培地中に存在する１つ以上の酵素に感受性であるプロテアーゼ感受性リンカーが含まれるが、これに限定されない。

【２３８１】

他の実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質の成分は、酵素感受性リンカーによって連結される。例示的な切断可能なリンカーとしては、以下の酵素：メタロプロテアーゼＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、プラスミン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥのうちの１つによって認識されるものが挙げられる。例えば、米国特許第８，５４１，２０３号及び同第８，５８０，２４４号（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、切断可能なリンカーに関連する関連部分において組み込まれる）を参照されたい。

【２３８２】

ある特定の実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、融合タンパク質の、ＴＩＬ細胞膜への転座を容易にするシグナルペプチドを含む。融合タンパク質の、ＴＩＬ細胞膜への局在化を容易にする任意の好適なシグナルペプチドを使用することができる。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、免疫調節剤の生体活性を干渉しない。例示的なシグナルペプチド配列としては、ヒト顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）受容体シグナル配列、ヒトプロラクチンシグナル配列、及びヒトＩｇＥシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、ヒトＩｇＥシグナル配列を含む。例示的な実施形態では、ヒトＩｇＥシグナル配列は、アミノ酸配列ＭＤＷＴＷＩＬＦＬＶＡＡＡＴＲＶＨＳ（配列番号２５２）を有する。いくつかの実施形態では、ヒトＩｇＥシグナル配列は、アミノ酸配列ＮＩＫＧＳＰＷＫＧＳＬＬＬＬＬＶＳＮＬＬＬＣＱＳＶＡＰ（配列番号２５３）を含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチド配列は、アミノ酸配列ＭＹＲＭＱＬＬＳＣＩＡＬＳＬＡＬＶＴＮＳ（配列番号２５４）を有するＩＬ－２シグナル配列である。

【２３８３】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ

、式：

【２３８４】

Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃによるものであり、

【２３８５】

式中、Ｓは、シグナルペプチドであり、ＩＡは、免疫調節剤であり、Ｌは、リンカーであり、Ｃは、細胞膜アンカー部分である。

【２３８６】

いくつかの実施形態では、シグナルペプチドＳは、配列番号２５２～２５４のうちのいずれか１つである。いくつかの実施形態では、細胞膜アンカー部分は、配列番号２７７である。例示的な実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、本明細書に記載のＣＤ４０Ｌもしくは抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、Ｃは、Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。上記式による例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質を、図５１及び５２に示す。

【２３８７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、Ｎ末端からＣ末端へ、式：Ｓ－ＩＡ－Ｌ－Ｃに従う２つ以上の異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、異なる膜アンカー免疫調節融合タンパク質の各々が、異なる免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、２つ以上の異なる免疫調節剤は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。

【２３８８】

２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含むいくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：

【２３８９】

Ｓ１－ＩＡ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｌ２－Ｓ２－ＩＡ２－Ｌ３－Ｃ２に従って配置され、

【２３９０】

式中、Ｓ１及びＳ２は、各々シグナルペプチドであり、ＩＡ１及びＩＡ２は、各々免疫調節剤であり、Ｌ１－Ｌ３は、各々リンカーであり、Ｃ１及びＣ２は、各々細胞膜アンカー部分である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、同じ免疫調節剤である。ある特定の実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、異なる免疫調節剤である。本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含む、好適な免疫調節剤。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））、またはそれらの生体活性バリアントから選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの１つ以上は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの２つ以上は、異なるリンカーである。例示的な実施形態では、Ｌ２は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ２は、フリン切断可能なＰ２Ａリンカーである（例えば、配列番号２５１）。いくつかの実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、独立して、膜貫通ドメイン及び／または膜貫通－細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、同じである。例示的な実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、各々Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。例示的な実施形態では、Ｃ１とＣ２は異なる。上記式による２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む例示的な構築物を、図５１、ならびに表５８及び５９に示す。

【２３９１】

それらの表面と会合する細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む修飾されたＴＩＬは、融合タンパク質をコードする核酸を含むようにＴＩＬ集団を遺伝子修飾することに

よって作製することができる。任意の好適な遺伝子修飾方法を使用して、例えば、本明細書に記載のＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ、及びジンクフィンガー法を含む、そのような修飾されたＴＩＬを産生することができる。

【２３９２】

任意の好適なＴＩＬ集団を遺伝子修飾して、対象の修飾されたＴＩＬ組成物を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬ集団（例えば、図２～６を参照）は、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬ集団（例えば、図７を参照）は、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法の第２のステップ及び／またはＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されるＴＩＬは、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して事前に選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬは、対象の修飾されたＴＩＬを産生するように遺伝子修飾される。

【２３９３】

任意の好適なＴＩＬ集団を一過的に遺伝子修飾して、対象の一過的に修飾されたＴＩＬ組成物を作製することができる。いくつかの実施形態では、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬ集団（例えば、図２～６を参照）を、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現する。例示的な実施形態では、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬ集団（例えば、図７を参照）を、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現する。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／またはＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されるＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。例示的な実施形態では、本明細書で提供されるプロセス２Ａ方法における第２の拡張ステップ及び／またはＧＥＮ３方法における急速拡張ステップから産生されるＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法を使用して事前に選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬを、細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸でトランスフェクトして、対象の一過的に修飾されたＴＩＬにおいて細胞膜アンカー免疫調節融合タンパク質を一過的に発現させる。

【２３９４】

また、本明細書で提供されるのは、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸、そのような核酸を含む発現ベクター、及び核酸または発現ベクターを含む宿主細胞である。任意の好適なプロモーターを、膜アンカー免疫調節融合タンパク質の発現に使用することができる。例示的な実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質及びそのような融合タンパク質の成分をコードする例示的な核酸を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２３９５】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡである。例示的な実施形態では、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの細胞内安定性及び／または翻訳効率を改善する１つ以上の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ｍＲＮＡは、ｍＲＮＡの半減期を改善する５’キャップまたはキャップ類似体を含む。例示的なキャップ構造としては、ＡＲＣＡ、ｍＣＡＰ、m^7ＧｐｐｐＮ（キャップ０）、m^7ＧｐｐｐＮｍ

（キャップ１）、及びｍ７ＧｐｐｐＮｍｐＮｍ（キャップ２）キャップが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、５’キャップは、式 ｍ７Ｇｐｐｐ［Ｎ２’Ｏｍｅ］ｎ［Ｎ］ｍによるものであり、式中、ｍ７Ｇは、Ｎ７－メチル化グアノシンまたは任意のグアノシン類似体であり、Ｎは、任意の天然、修飾または非天然ヌクレオシドであり、「ｎ」は、０～４の任意の整数であり得、かつ「ｍ」は、１～９の整数であり得る。例示的な５’キャップは、米国特許第１０，７０３，７８９号及びＷＯ２０１７０５３２９７に開示されており、これらは参照によりそれら全体が組み込まれており、具体的には５’キャップ及びキャップ類似体に関する開示についてのものである。

【２３９６】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、３’非翻訳領域（ＵＴＲ）または修飾ＵＴＲをさらに含む。３’ＵＴＲは、アデノシン及びウリジンの伸長を有することが知られている。これらのＡＵリッチシグネチャーは、高い転換率を有する遺伝子において特に一般的である。それらの配列特徴及び機能的特性に基づいて、ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）は、３つのクラスに分けることができる（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９５）：クラスＩ ＡＲＥは、Ｕリッチ領域内にＡＵＵＵＡモチーフのいくつかの分散コピーを含有する。Ｃ－Ｍｙｃ及びＭｙｏＤは、クラスＩ ＡＲＥを含有する。クラスＩＩ ＡＲＥは、２つ以上の重複するＵＵＡＵＵＵＡ（Ｕ／Ａ）（Ｕ／Ａ）ノナマーを有する。このタイプのＡＲＥを含有する分子としては、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦ－ａが挙げられる。クラスＩＩＩ ＡＲＥＳは、あまり明確に定義されていない。これらのＵリッチ領域は、ＡＵＵＵＡモチーフを含有しない。ｃ－Ｊｕｎ及びＭｙｏｇｅｎｉｎは、このクラスの２つのよく研究された例である。ＡＲＥに結合するほとんどのタンパク質は、メッセンジャーを不安定化することが知られているが、ＥＬＡＶファミリーのメンバー、特にＨｕＲは、ｍＲＮＡの安定性を増加させることが報告されている。ＨｕＲは、３つすべてのクラスのＡＲＥに結合する。ＨｕＲ特異的結合部位を核酸分子の３’ＵＴＲに操作すると、ＨｕＲ結合、したがってインビボでのメッセージの安定化につながる。

【２３９７】

３’ＵＴＲ ＡＵリッチエレメント（ＡＲＥ）の導入、除去、または修飾を使用して、本明細書に記載の核酸の安定性を調節することができる。特定の核酸を操作する場合、ＡＲＥの１つ以上のコピーを導入して、本発明のポリヌクレオチドを不安定にし、それによって翻訳を抑制し、得られるタンパク質の産生を減少させることができる。同様に、ＡＲＥを同定し、除去または変異させて、細胞内安定性を増加させ、したがって、結果として生じるタンパク質の翻訳及び産生を増加させることができる。トランスフェクション実験は、関連する細胞株において、核酸を使用して実施することができ、タンパク質産生は、トランスフェクション後の様々な時点でアッセイすることができる。例えば、細胞は、異なるＡＲＥ操作分子で、かつＥＬＩＳＡキットを使用することによって関連するタンパク質にトランスフェクトすることができ、トランスフェクションの６時間、１２時間、２４時間、４８時間、及び７日後に産生されるタンパク質をアッセイする。

【２３９８】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、活性化Ｔ細胞（ＮＦＡＴ）プロモーターの核因子、またはその機能的部分もしくは機能的バリアントに作動可能に連結される。本明細書で使用される「ＮＦＡＴプロモーター」とは、Ｔ細胞によって発現される任意の遺伝子の最小プロモーターに連結された１つ以上のＮＦＡＴ応答性エレメントを意味する。好ましくは、Ｔ細胞によって発現される遺伝子の最小プロモーターは、最小ヒトＩＬ－２プロモーターである。ＮＦＡＴ応答性エレメントは、例えば、ＮＦＡＴ１、ＮＦＡＴ２、ＮＦＡＴ３、及び／またはＮＦＡＴ４応答性エレメントを含み得る。ＮＦＡＴプロモーター（またはその機能的部分もしくは機能的バリアント）は、任意の数の結合モチーフ、例えば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、または少なくとも６個、少なくとも７個、少なくとも８個、少なくとも９個、少なくとも１０個、少なくとも１１個、または最大１２個の結合モチーフ

を含み得る。
【２３９９】
【表２１】

表４－ＮＦＡＴプロモーター関連配列。

説明	アミノ酸配列
6×NFAT IL-2 最小プロモーター	TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGA TATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCA TACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAA ACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAG GAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCG TCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAA AAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATT AGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAG GCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCA TACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGAC ATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAG AATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTT CAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCA CTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGGCC ACC (配列番号 255)
NFAT 応答性エレメント	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGC GT (配列番号 256)
ヒト IL-2 プロモーター	CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCA GAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTG TTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAAT CACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG (配列番号 257)

【２４００】
好ましい実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、６つのＮＦＡＴ結合モチーフを含む。例えば、米国特許第８，５５６，８８２号（参照によりその全体が、特にＮＦＡＴプロモーターに関連する関連部分について組み込まれる）を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、本明細書に記載の免疫調節剤のうちのいずれかを含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントから選択される。ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された例示的な対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする例示的な核酸を表５９に示す。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーター系は、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現を制御する。
【２４０１】
いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された免

疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡを含むように遺伝子修飾されたＴＩＬを提供する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、本明細書に記載の免疫調節剤のうちのいずれかを含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、及びＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントから選択される。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。いくつかの実施形態では、ＮＦＡＴプロモーターは、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡの発現を制御する。

【２４０２】

いくつかの実施形態では、本発明は、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結された免疫調節融合タンパク質をコードするＤＮＡを含むように遺伝子修飾されたＴＩＬを提供し、免疫調節融合タンパク質は、Ｎ末端からＣ末端へ、式：

【２４０３】

Ｓ１－ＩＡ１－Ｌ１－Ｃ１－Ｌ２－Ｓ２－ＩＡ２－Ｌ３－Ｃ２に従って配置され、

【２４０４】

式中、Ｓ１及びＳ２は、各々シグナルペプチドであり、ＩＡ１及びＩＡ２は、各々免疫調節剤であり、Ｌ１－Ｌ３は、各々リンカーであり、Ｃ１及びＣ２は、各々細胞膜アンカー部分である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、同じ免疫調節剤である。ある特定の実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、異なる免疫調節剤である。本明細書に記載されるもののうちのいずれかを含む、好適な免疫調節剤。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））、またはそれらの生体活性バリアントから選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、ＩＬ－１２及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－１５、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１、ならびにＩＬ－２及びＩＬ－１２からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１及びＩＡ２は、独立して、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＡ１は、ＩＬ－１５であり、ＩＡ２は、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、ＩＡ１は、ＩＬ－２１であり、ＩＡ２は、ＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの１つ以上は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ１～Ｌ３のうちの２つ以上は、異なるリンカーである。例示的な実施形態では、Ｌ２は、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、Ｌ２は、フリン切断可能なＰ２Ａリンカーである（例えば、配列番号２５１）。いくつかの実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、独立して、膜貫通ドメイン及び／または膜貫通－細胞内ドメインである。ある特定の実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、同じである。例示的な実施形態では、Ｃ１及びＣ２は、各々Ｂ７－１膜貫通－細胞内ドメイン（例えば、配列番号２３９）である。例示的な実施形態では、Ｃ１とＣ２は異なる。上記式による２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む例示的な構築物を、図５１に示す。

【２４０５】

対象の膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に導入して、任意の好適な方法を使用して、膜アンカー免疫調節融合タンパク質を発現する一過的に修飾されたまたは遺伝子修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用してＴＩＬ集団に導入される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第ＵＳ

２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１８／０２０１８８９Ａ１、もしくは同第ＵＳ２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を細胞内に送達することを可能にする。

【２４０６】

いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用してｍＲＮＡをＴＩＬに送達し、一過的に修飾されたＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質をコードする核酸は、ＤＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用してＤＮＡをＴＩＬに送達し、安定した遺伝子修飾されたＴＩＬを産生する。マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、本明細書のプロセス２Ａ方法開示（例えば、図２～６を参照）または本明細書のＧＥＮ３方法開示（例えば、図７を参照）の任意のステップ中に産生される任意のＴＩＬ集団に核酸を送達して、修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【２４０７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ）である。

【２４０８】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌである。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。

【２４０９】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４１０】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４１１】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、第

２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４１２】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４１３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１２である。

【２４１４】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。

【２４１５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。

【２４１６】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。

【２４１７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４１８】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１５である。

【２４１９】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。

【２４２０】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。

【２４２１】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫

調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１２であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４２２】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－１８である。

【２４２３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。

【２４２４】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１５であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４２５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８であり、第２の免疫調節剤は、ＩＬ－２１である。

【２４２６】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－１８であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４２７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、各々が異なる免疫調節剤（すなわち、第１及び第２の免疫調節剤）を含む２つの膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含み、第１の免疫調節剤は、ＩＬ－２１であり、第２の免疫調節剤は、ＣＤ４０Ｌまたは抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ）である。

【２４２８】

本明細書で提供される修飾されたＴＩＬに含まれ得る追加の膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＷＯ２０１９／１５７１３０Ａ１（これは参照によりその全体が、特に膜アンカー免疫調節融合タンパク質に関連する関連部分に組み込まれる）に記載されている。

【２４２９】

本明細書で提供される修飾されたＴＩＬに含まれる例示的な膜アンカー免疫調節融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２４３０】

いくつかの実施形態では、上記の膜アンカー免疫調節融合タンパク質のうちのいずれかをコードする核酸は、ＮＦＡＴプロモーターまたはその機能的部分もしくは機能的バリアントに作動可能に連結される。

【２４３１】

２．免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、免疫調節融合タンパク質を含み、そのような融合タンパク質は、ＴＩＬ抗原結合ドメイン（ＡＢＤ）に連結された１つ以上の免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、１種以上の免疫調節剤は、ＴＩＬ　ＡＢＤがＴＩＬ表面抗原に結合すると、ＴＩＬ表面膜にテザリングされる。

【２４３２】
ＴＩＬ抗原結合ドメインは、抗体可変重ドメイン（ＶＨ）及び可変軽ドメイン（ＶＬ）を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、式：ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３による重鎖及び式：ＶＬ－ＣＬによる軽鎖（式中、ＶＨは可変重ドメインであり、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３は重鎖定常ドメインであり、ＶＬは可変軽ドメインであり、ＣＬは軽鎖定常ドメインである）を含む全長抗体である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、抗体断片である。ある特定の実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆ（ａｂ）２、可変断片（Ｆｖ）、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、または一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。
【２４３３】
ＴＩＬ抗原結合ドメインは、免疫調節剤－ＴＩＬ　ＡＢＤ融合タンパク質の、ＴＩＬの表面への付着を可能にする任意の好適なＴＩＬ抗原に結合することができる。例示的な実施形態では、ＴＩＬ抗原結合ドメインは、ＴＩＬ表面抗原に結合することができる。ＴＩＬ表面抗原には、Ｄ１６、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＣＤ２５、ＣＤ１２７、ＣＤ５６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１９７、ＣＤ３８、ＣＤ２７、ＣＤ１３７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＣＤ５６、ＣＤ１９６、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ５、ＣＤ８４、ＣＤ２２９、ＣＣＲ１、ＣＣＲ５、ＣＣＲ４、ＣＣＲ６、ＣＣＲ８、及び／またはＣＣＲ１０が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、ＣＤ４５に結合する。特定の実施形態では、ＡＢＤは、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＢ、ＣＤ４５ＲＣまたはＣＤ４５Ｒβから選択されるＣＤ４５アイソフォームに結合する。特定の実施形態では、ＡＢＤは、Ｔ細胞上で一次的に発現されるＣＤ４５に結合する。
【２４３４】
ある特定の実施形態では、ＡＢＤは、チェックポイント阻害剤に結合する。例示的なチェックポイント阻害剤としては、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３及びＣＴＬＡ－４が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Ｑｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃａｎｃｅｒ　１８：１５５（２０１９）を参照）。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、免疫エフェクター細胞（例えば、Ｔ細胞またはＮＫ細胞）上に発現されるチェックポイント阻害剤に結合する。例示的な抗ＰＤ－１抗体は、例えば、米国特許第ＵＳ７，６９５，７１５号、同第ＵＳ７，３３２，５８２号、同第ＵＳ９，２０５，１４８号、同第ＵＳ８，６８６，１１９号、同第ＵＳ８，７３５，５５３号、同第ＵＳ７，４８８，８０２号、同第ＵＳ８，９２７，６９７号、同第ＵＳ８，９９３，７３１号、及び同第ＵＳ９，１０２，７２７号において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＰＤ－１抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的な抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国特許第ＵＳ８，２１７，１４９号、同第ＵＳ８，７７９，１０８号、同第ＵＳ８，１６８，１７９号、同第ＵＳ８，５５２，１５４号、同第ＵＳ８，４６０，９２７号、及び同第ＵＳ９，１７５，０８２号において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＰＤ－Ｌ１抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的な抗ＬＡＧ－３抗体は、米国特許第ＵＳ９，２４４，０５９号、同第ＵＳ９，２４４，０５９号、同第ＵＳ９，５０５，８３９号に開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＬＡＧ－３抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的なＴＩＭ－３抗体は、ＷＯ２０１６／１６１２７０、ＵＳ８，８４１，４１８、及びＵＳ９，１６３，０８７において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＴＩＭ－３抗体に関連する関連部分が組み込まれる。例示的なＣＴＬＡ－４抗体は、ＵＳ６，９８４，７２０及びＵＳ７，４１１，０５７において開示されており、これらは参照によりそれら全体が、特に抗ＣＴＬＡ－４抗体に関連する関連部分が組み込まれる。
【２４３５】
いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体またはその断片である。ある特定の実施形態では、抗ＣＤ４５抗体は、ヒト抗ＣＤ４５抗体、ヒト化抗ＣＤ４５抗体、またはキメラ抗ＣＤ４５抗体である。例示的な実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ

８のｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３を含む（参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２０１７０３２６２５９、特に抗ＣＤ４５抗体配列に関連する関連する部分を参照）。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８の可変重ドメイン及び可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、以下の抗ＣＤ４５抗体：１０Ｇ１０、ＵＣＨＬ１、９．４、４Ｂ２、またはＧＡＰ８．３のうちの１つのｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３またはＶＨ及びＶＬを含む（Ｓｐｅｒｔｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １１３（４）：４４１－４５２（２００４）、Ｂｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：４０２７－４０３５（１９９２）を参照）。

【２４３６】

免疫調節融合タンパク質は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはそれらの生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、２つ以上の免疫調節剤を含む。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる免疫調節剤を含む。

【２４３７】

ＴＩＬ抗原結合ドメインは、任意の好適なリンカーを使用して免疫調節剤に付着する。好適なリンカーとしては、限定されないが、切断可能なリンカー、非切断可能なリンカー、ペプチドリンカー、可撓性リンカー、剛性リンカー、ヘリカルリンカー、または非ヘリカルリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でＧｌｙ及びＳｅｒを含むペプチドリンカーである。好適なリンカーとしては、少なくとも約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０アミノ酸残基の長さであるリンカーが挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーは、５～１０、１０～１５、１５～２０、２０～２５、２５～３０、３０～３５、３５～４０、４５～５０、または５０～６０アミノ酸の長さである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、$(GGGS)_n$または$(GGGGS)_n$リンカーであり、式中、ｎは、モチーフの反復の数を示し、１～１０から選択される整数である。いくつかの実施形態では、リンカーは、抗体ヒンジドメインまたはその断片である。ある特定の実施形態では、リンカーは、ヒト免疫グロブリン（Ｉｇ）ヒンジドメイン（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、もしくはＩｇＡヒンジ）またはその断片である。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、リンカーなしでＴＩＬに直接連結される。

【２４３８】

免疫調節剤は、融合タンパク質のＴＩＬへの結合を妨げない好適な位置でＴＩＬ抗原結合ドメインに付着することができる。抗原結合ドメインが全長抗体であるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、重鎖または軽鎖のいずれかのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがｓｃＦｖであるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがＦａｂであるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがＦａｂ’であるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。抗原結合ドメインがFab'_2であるいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、可変重ドメインまたは可変軽ドメインのＣ末端またはＮ末端に付着される。

【２４３９】

融合タンパク質が２つ以上の免疫調節剤を含むいくつかの実施形態では、免疫調節剤は、本明細書に記載のリンカーのうちのいずれかを使用して互いに付着する。いくつかの実施形態では、２つ以上の免疫調節剤が、抗原結合ドメインの異なる位置に付着する。例え

ば、ＴＩＬ抗原結合ドメインが全長抗体であるいくつかの実施形態では、２つ以上の免疫調節剤は、（ｉ）重鎖上の異なる位置、（ｉｉ）軽鎖上の異なる位置または（ｉｉｉ）重鎖及び／または軽鎖上の異なる位置に付着される。

【２４４０】

対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質は、任意の好適な方法を使用して作製することができる。一態様では、本明細書で提供されるのは、対象の融合タンパク質をコードする核酸、かかる核酸を含む発現ベクター、及び発現ベクターを含む宿主細胞である。対象の融合タンパク質をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を、融合タンパク質の発現のための条件下で培養し、その後、融合タンパク質を単離し、精製する。いくつかの実施形態では、次いで、精製された融合タンパク質を、融合タンパク質のＴＩＬへの結合を可能にする条件下で、ＴＩＬ集団とともにインキュベートする。

【２４４１】

いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質は、本明細書のプロセス２Ａ方法開示（例えば、図２～６を参照）のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに付着される。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、本明細書のＧＥＮ３方法開示（例えば、図７を参照）のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに付着される。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、プロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されるＴＩＬに付着される。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、プロセス２Ａ方法の第２の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されるＴＩＬに付着される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載される方法を使用して事前選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬである。

【２４４２】

対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸をＴＩＬ集団に導入して、任意の好適な方法を使用して、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質を発現する一過的に修飾されたまたは遺伝子修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸は、マイクロ流体プラットフォームを使用して、ＴＩＬ集団に導入される。いくつかの実施形態では、マイクロ流体プラットフォームは、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームである。例えば、国際特許出願公開第ＷＯ２０１３／０５９３４３Ａ１号、同第ＷＯ２０１７／００８０６３Ａ１号、もしくは同第ＷＯ２０１７／１２３６６３Ａ１号、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０２８７５０９Ａ１号、同第ＵＳ２０１８／０２０１８８９Ａ１、もしくは同第ＵＳ２０１８／０２４５０８９Ａ１号を参照されたい（これらのすべては、参照によりそれら全体が、特に核酸送達のためのマイクロ流体プラットフォームの開示について本明細書に組み込まれる）。ＳＱＺプラットフォームでは、修飾のための細胞（例えば、ＴＩＬ）の細胞膜は、マイクロ流体収縮によって一時的に破壊され、それによって、免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸を細胞に送達することを可能にする。

【２４４３】

いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸は、ｍＲＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、ｍＲＮＡをＴＩＬに送達し、一過的に修飾ＴＩＬを産生する。いくつかの実施形態では、対象の免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質をコードする核酸は、ＤＮＡであり、マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、核酸をＴＩＬに送達し、安定した遺伝子修飾ＴＩＬを産生する。マイクロ流体プラットフォーム（例えば、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォーム）を使用して、本明細書のプロセス２Ａ方法開示（例えば、図２～６を参照）または本明細書のＧＥＮ３方法開示（例えば、図７を参照）の任意のステップ中に産生される任意の

ＴＩＬ集団に核酸を送達して、修飾されたＴＩＬを産生してもよい。いくつかの実施形態では、膜アンカー免疫調節融合タンパク質は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはそれらの組み合わせ（例えば、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１）を含む。

【２４４４】

本明細書で提供される組成物及び方法に有用な例示的な免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質は、例えば、米国特許出願公開第２０２００３３０５１４号（これは参照によりその全体が組み込まれる）、及び免疫調節剤－ＴＩＬ抗原結合ドメイン融合タンパク質に関連する関連部分にさらに記載されている。

【２４４５】

Ｂ．ナノ粒子組成物

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される対象の修飾されたＴＩＬは、１つ以上のナノ粒子を含み、それらのナノ粒子は、１種以上の免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるナノ粒子は、互いにカップリングされた複数の２つ以上のタンパク質及び／または粒子の第２の成分（例えば、分解可能なリンカーを介して可逆的に連結された）を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子のタンパク質は、ポリマーまたはシリカ中に存在する。ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、ナノシェルを含む。本明細書で提供されるナノ粒子は、１つ以上の免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌもしくはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖ））またはその生体活性バリアントである。ナノ粒子は、本明細書に記載される任意の好適な技術を使用して、ＴＩＬの表面に付着される。

【２４４６】

本明細書で提供される対象の修飾されたＴＩＬにおける使用の例示的なナノ粒子としては、リポソーム、タンパク質ナノゲル、ヌクレオチドナノゲル、ポリマーナノ粒子、または固体ナノ粒子が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、リポソームを含む。例示的な実施形態では、ナノ粒子は、免疫調節剤ナノゲルを含む。特定の実施形態では、ナノ粒子は、互いに共有結合した複数の免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を有する免疫調節剤ナノゲルである。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子表面上に少なくとも１種のポリマー、カチオン性ポリマー、またはカチオン性ブロックコポリマーを含む。本明細書で提供される組成物に使用することができる例示的なナノ粒子は、例えば、米国特許第９，２８３，１８４号及び同第９，６０３，９４４号に開示されており、これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、ナノ粒子に関連する関連部分に組み込まれる。

【２４４７】

免疫調節剤は、例えば、本明細書で提供される免疫調節剤のうちのいずれかを含む、任意の好適な免疫調節剤であり得る。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、抗腫瘍応答を促進するインターロイキンである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、サイトカインである。特定の実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはそれらの生体活性バリアントである。ある特定の実施形態では、融合タンパク質は、２つ以上の免疫調節剤を含む。例示的な実施形態では、融合タンパク質は、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の異なる免疫調節剤を含む。

【２４４８】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、互いに共有結合的に架橋されたタンパク質及び／または第２の成分（例えば、分解可能なリンカー）を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、分解可能なリンカーを介して機能基もしくはポリマーに可逆的に連結されるか、または「可逆的に修飾される」免疫調節剤を含む。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、分解可能なリンカーを介して互いに架橋された複数の免疫調節剤を含むナノゲルである（米国特許第９，６０３，９４４号を参照）。例示的な実施形態では、ナノゲルのタンパク質は、ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ））に架橋される。いくつかの実施形態では、ポリマーは、ナノゲル表面に架橋される。

【２４４９】
いくつかの実施形態では、ナノ粒子の免疫調節剤は、生理学的条件下でリンカーが分解し、それによって免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）を介して互いに可逆的に連結される。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の免疫調節剤は、生理学的条件下で、リンカーが分解し、免疫調節剤を放出するように、分解可能なリンカーを介して官能基に可逆的に連結される。好適な分解可能なリンカーとしては、還元生理学的環境に感受性のある可撓性ジスルフィド含有リンカーによって一緒に接合された２つのＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル基、酸性生理学的環境（ｐＨ＜７、例えば、ｐＨ４～５、５～６、または６～７未満、例えば、６．９）に感受性の加水分解可能なリンカー、あるいは腫瘍微小環境または炎症組織（例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼ２（ＭＭＰ２）もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼ９（ＭＭＰ９））に存在するマトリックスメタロプロテイナーゼなどの生物学的媒体中に存在する１つ以上の酵素に感受性のあるプロテアーゼ感受性リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。還元的な生理学的環境に感受性のある架橋剤は、例えば、タンパク質を高密度タンパク質ナノゲルに架橋するＮＨＳ基の存在によってタンパク質上のアミン基と反応するジスルフィド含有リンカーを有する架橋剤である。いくつかの実施形態では、分解可能な架橋剤は、ビス［２－（Ｎ－スクシンイミジル－オキシカルボニルオキシ）エチル］ジスルフィドを含む。

【２４５０】
いくつかの実施形態では、分解可能なリンカーは、少なくとも１種のＮ－ヒドロキシスクシンイミドエステルを含む。いくつかの実施形態では、分解可能なリンカーは、酸化還元応答性リンカーである。いくつかの実施形態では、酸化還元応答性リンカーは、ジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される分解可能なリンカーは、タンパク質を実質的に変性させることなく、中性ｐＨ（例えば、約６～約８または約７）でタンパク質と反応することができる、少なくとも１つのＮヒドロキシスクシンイミドエステルを含む。いくつかの実施形態では、分解可能なリンカーは、「酸化還元応答性」リンカーであり、それらが生理学的条件下（例えば、２０～４０℃及び／またはｐＨ４～８）で還元剤（例えば、グルタチオン、ＧＳＨ）の存在下で分解され、それによって、それが可逆的に連結される化合物から無傷のタンパク質を放出することを意味する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子のタンパク質は、末端または内部のNH_2官能基（例えば、リジンの側鎖）を介して分解可能なリンカーに連結されている。

【２４５１】
他の実施形態では、ナノ粒子のタンパク質は、酵素感受性リンカーによって連結される。例示的な切断可能なリンカーとしては、以下の酵素：メタロプロテアーゼＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、プラスミン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥのうちの１つによって認識されるものが挙げられる。例えば、米国特許第８，５４１，２０３号及び同第８，５８０，２４４号（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれ、切断可能なリンカーに関連する関連部分において組み込まれる）を参照されたい。

【２４５２】
いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、単分散複数の免疫調節剤（例えば、サイトカイン）を含むナノゲルである。いくつかの実施形態では、ナノゲルの免疫調節剤は、ポリマーに架橋される。ある特定の実施形態では、ポリマーは、ナノゲルの表面に架橋される。特定の実施形態では、ナノゲルは、ａ）分解可能なリンカーを介して互いに可逆的かつ共有結合的に架橋された１つ以上の免疫調節剤、及びｂ）ナノゲルの表面露出タンパク質に架橋されたポリマーを含む。そのようなナノゲルは、分解可能なリンカーを介して免疫調

節剤を互いに可逆的に共有結合して複数の免疫調節剤ナノゲルを形成することを可能にする条件下で、１種以上の免疫調節剤を分解可能なリンカーと接触させることによって作製することができる。その後、免疫調節剤ナノゲルは、ポリマーの免疫調節剤ナノゲルへの架橋を可能にする条件下でポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）と接触し、それによって複数の免疫調節剤ポリマーナノゲルを生成する。

【２４５３】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、１つ以上のポリマーを含む。例示的なポリマーとしては、脂肪族ポリエステル、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）、ポリ（グリコール酸）（ＰＧＡ）、乳酸及びグリコール酸のコポリマー（ＰＬＧＡ）、ポリカープロラクトン（ＰＣＬ）、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、及びポリ（ラクチド－コ－カプロラクトン）、ならびにアルギン酸塩及びデキストラン及びセルロースを含む他の多糖類、コラーゲン、それらの化学誘導体（例えば、アルキル、アルキレン、ヒドロキシル化、酸化、及び当業者によって日常的に行われる他の修飾などの化学基の置換、付加を含む）、アルブミン及び他の親水性タンパク質、ゼイン及び他のプロラミン、ならびにそれらの親水性タンパク質、コポリマー及び混合物などの天然ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ナノ粒子の免疫調節剤は、親水性ポリマーに連結されている。例示的な親水性ポリマーとしては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリエチレングリコール－ｂ－ポリリジン（ＰＥＧ－ＰＬＬ）、及び／またはポリエチレングリコール－ｂ－ポリアルギニン（ＰＥＧ－ＰＡｒｇ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【２４５４】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子（例えば、ナノゲル）は、その表面に１つ以上のポリカチオンを含む。対象のナノ粒子で使用するための例示的なポリカチオンとしては、ポリリジン（ポリ－Ｌ－リジン及び／またはポリ－Ｄ－リジン）、ポリ（アルギニン酸グリセリルコハク酸塩）（ＰＡＧＳ、アルギニン系ポリマー）、ポリエチレンイミン、ポリヒスチジン、ポリアルギニン、プロタミン硫酸塩、ポリエチレングリコール－ｂ－ポリリジン（ＰＥＧ－ＰＬＬ）、及びポリエチレングリコール－ｇ－ポリリジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【２４５５】

いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬへの静電吸引によってＴＩＬ表面と会合する。ある特定の実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬの表面分子（例えば、表面タンパク質、炭水化物及び／または脂質）に対して親和性を有するリガンドを含む。

【２４５６】

特定の実施形態では、ナノ粒子は、本明細書に記載のＴＩＬ表面抗原に結合する抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体またはその断片である。例示的な実施形態では、ＴＩＬ表面抗原は、ＣＤ４５、ＬＦＡ－１、ＣＤ１１ａ（インテグリンアルファ－Ｌ）、ＣＤ１８（インテグリンベーター２）、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ２５、ＣＤ８、またはＣＤ４である。例示的な実施形態では、抗原結合ドメイン（ＡＢＤ）は、抗ＣＤ４５抗体またはその断片である。ある特定の実施形態では、抗ＣＤ４５抗体は、ヒト抗ＣＤ４５抗体、ヒト化抗ＣＤ４５抗体、またはキメラ抗ＣＤ４５抗体である。例示的な実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８のｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３を含む（参照により本明細書に組み込まれる、ＵＳ２０１７０３２６２５９、特に抗ＣＤ４５抗体配列に関連する関連する部分を参照）。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、抗ＣＤ４５抗体ＢＣ８の可変重ドメイン及び可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、ＡＢＤは、以下の抗ＣＤ４５抗体：１０Ｇ１０、ＵＣＨＬ１、９．４、４Ｂ２、またはＧＡＰ８．３のうちの１つのｖｈＣＤＲ１－３及びｖｌＣＤＲ１－３またはＶＨ及びＶＬを含む（Ｓｐｅｒｔｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １１３（４）：４４１－４５２（２００４）、Ｂｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：４０２７－４０３５（１９９２）を参照）。そのような実施形態では、ナノ粒子は、ナノ粒子がＴＩＬの表面に結合する条件下で、ナノ粒子の存

在下でＴＩＬをインキュベートすることにより、ＴＩＬの集団の表面に付着される。
【２４５７】
いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、静電吸引によってＴＩＬ細胞表面と会合する。いくつかの実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬと共有結合される。他の実施形態では、ナノ粒子は、ＴＩＬに共有結合されない。
【２４５８】
いくつかの実施形態では、対象のナノ粒子は、本明細書のプロセス２Ａ方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに付着される（例えば、図２～６を参照）。例示的な実施形態では、対象のナノ粒子は、本明細書のＧＥＮ３方法開示のステップのうちのいずれかの間に産生されるＴＩＬに付着される（例えば、図７を参照）。例示的な実施形態では、対象のナノ粒子は、プロセス２Ａ方法における第１の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法におけるプライミングによる拡張ステップから産生されるＴＩＬに付着される。例示的な実施形態では、対象のナノ粒子は、プロセス２Ａ方法の第２の拡張ステップ及び／または本明細書で提供されるＧＥＮ３方法の急速拡張ステップから産生されるＴＩＬに付着される。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、本明細書に記載される方法を使用して事前選択されたＰＤ－１陽性ＴＩＬである。
【２４５９】
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬで使用するための追加の適切なナノ粒子は、米国特許出願公開第ＵＳ２０２００１３１２３９号及びＷＯ２０２０２０５８０８号（これらの各々は参照によりその全体が組み込まれる）、及びナノ粒子に関連する関連部分において開示されている。
【２４６０】
Ｃ．免疫調節剤
本明細書で提供される修飾されたＴＩＬには、その表面に付着された１つ以上の免疫調節剤が含まれる。免疫調節剤は、例えば、本明細書に記載の膜アンカー免疫調節融合タンパク質を含む、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質のうちのいずれかに組み込むことができる。任意の好適な免疫調節剤を、対象の修飾されたＴＩＬに含めることができる。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、一度患者に移されると、ＴＩＬ生存及び／または抗腫瘍活性を増強する。例示的な免疫調節剤としては、例えば、サイトカインが挙げられる。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、以下のサイトカイン：ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＩＬ－４、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－５、ＩＦＮγ、ＴＮＦα（ＴＮＦａ）、ＩＦＮα、ＩＦＮβ、ＧＭ－ＣＳＦ、もしくはＧＣＳＦ、またはそれらの生物学的に活性なバリアントのうちの１つを含む。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、共刺激分子である。特定の実施形態では、共刺激分子は、以下：ＯＸ４０、ＣＤ２８、ＧＩＴＲ、ＶＩＳＴＡ、ＣＤ４０、ＣＤ３、またはＣＤ１３７のアゴニストのうちの１つである。いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＣＤ４０アゴニスト（例えば、ＣＤ４０Ｌまたはアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン）である。例示的な免疫調節剤は、以下でさらに詳細に論じられる。
【２４６１】
１．ＩＬ－１５
いくつかの実施形態では、本明細書で提供される修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１５を含む。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。
【２４６２】
本明細書で使用される場合、「インターロイキン１５」、「ＩＬ－１５」及び「ＩＬ１５」はすべて、ＩＬ－１５特異的受容体アルファ鎖（ＩＬ－１５Ｒα）、ＩＬ－２／ＩＬ－１５受容体ベータ鎖（ＣＤ１２２）及び共通のガンマ鎖（ガンマ－Ｃ、ＣＤ１３２）（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００００５８５、ＮＰ＿０００５７６及びＮＰ＿７５１９１５（ヒト）；ならびにＮＭ＿００１２５４７４７及びＮＰ＿００１２４１

６７６（マウス））で構成された複合体に結合し、それを通じてシグナル伝達するインターロイキンを指す。ＩＬ－１５は、腫瘍内のＴ細胞増殖を刺激することが示されている。ＩＬ－１５はまた、エフェクターメモリーＣＤ８＋Ｔ細胞の生存可能性を拡張することができ、ＮＫ細胞の発達にとって重要である。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、本明細書に記載のＩＬ－１５と会合する修飾されたＴＩＬは、向上した生存及び／または抗腫瘍効果を示すと考えられる。

【２４６３】

ＩＬ－１５は、インビボで４０分未満の短い半減期を有する。ＩＬ－１５モノマーへの修飾は、がんの治療におけるそのインビボ薬物動態を改善することができる。これらの修飾は、概して、ＩＬ－１５受容体のアルファサブユニット、ＩＬ－１５ＲαによるＩＬ－１５のトランスプレゼンテーションの改善に焦点を当てている。そのような修正には、以下が含まれる：１）ＩＬ－１５とその可溶性受容体ａ－サブユニット－Ｆｃ融合体との事前会合により、ＩＬ－１５：ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ複合体（例えば、Ｒｕｂｉｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．１０３：９１６６－７１（２００６）を参照））、２）スーパーアゴニストＩＬ－１５－ｓＩＬ－１５Ｒα－ｓｕｓｈｉタンパク質の発現（例えば、Ｂｅｓｓａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃａｎｃｅｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ ８：２７３６－４５（２００９）を参照）、及び３）ヒトＩＬ－１５変異体ＩＬ－１５Ｎ７２ＤとＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ ｓｕｓｈｉ－Ｆｃ融合複合体との事前会合（例えば、Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １８３：３５９８－６００７（２００９）を参照）。

【２４６４】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１５は、全長ＩＬ－１５、ＩＬ－１５の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、ヒトＩＬ－１５またはバリアントヒトＩＬ－１５である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１５バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５は、野生型ＩＬ－１５と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。ある特定の実施形態では、ＩＬ－１５は、野生型ヒトＩＬ－１５に対してＮ７２Ｄ変異を含む。いくつかの実施形態では、バリアントＩＬ－１５は、ＩＬ－１５Ｒα結合活性を示す。

【２４６５】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１５及びＩＬ－１５Ｒαの細胞外ドメインを含む。ある特定の実施形態では、免疫調節剤は、Ｆｃドメインに融合したＩＬ－１５及びＩＬ－１５Ｒα（ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ）を含む。

【２４６６】

【表２２－１】

表５－ＩＬ－１５関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-15(N72D変異体)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSF VHIVQMFINTS (配列番号258)
ヒトIL-15R-アルファ-Su/Fcドメイン	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIREP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K (配列番号259)
ヒトIL-15R-アルファ-Su(65aa切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFK RKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR (配列番号260)
ヒトIL-15アイソフォーム2	MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKI EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLL ELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNV TESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号261)
ヒトIL-15アイソフォーム1	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFIL GCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHID ATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESG DASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号262)
ヒトIL-15(シグナルペプチドなし)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIIL ANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSF VHIVQMFINTS (配列番号263)

【表２２－２】

ヒトIL-15R-アルファ(85aa切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGV (配列番号264)
ヒトIL-15R-アルファ(182aa切断細胞外ドメイン)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTST (配列番号265)
ヒトIL-15R-アルファ	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL (配列番号266)

【２４６７】

いくつかの実施形態では、免疫刺激タンパク質は、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む、ＩＬ－１５スーパーアゴニスト（ＩＬ－１５ＳＡ）などのＩＬ－１５Ｒアゴニストである。ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの組み合わせは、ヒトＩＬ－１５単独よりも高い生物活性を有するＩＬ－１５ＳＡ複合体を形成する。可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒα、ならびに細胞外ドメインの切断型は、当該技術分野において記載されている（Ｗｅｉ ｅｔ ａｌ．，２００１ Ｊ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７：２７７－２８２）。ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸配列は、配列番号２６６に示されている。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトとの複合体を含む。膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインなしで、細胞外ドメインの全部または一部を含むＩＬ－１５Ｒα。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、完全な細胞外ドメインまたはＩＬ－１５結合活性を保持する細胞外ドメインの切断形態を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む。

【２４６８】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、ＩＬ－１５結合活性を保持する細胞外ドメインの切断形態を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαとの複合体を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－６０、１－６１、１－６２、１－６３、１－６４または１－６５を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－８０、１－８１、１－８２、１－８３、１－８４または１－８５を含む。いくつかの実施形態では、可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαは、ヒトＩＬ－１５Ｒαのアミノ酸１－１８０、１－１８１、または１－１８２を含む。

【２４６９】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、ＩＬ－１５結合活性を保持し、Ｓｕｓｈｉドメインを含む細胞外ドメインの切断型を含む、ヒトＩＬ－１５と可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒ

αとの複合体を含むＩＬ－１５ＳＡである。ＩＬ－１５ＲαのＳｕｓｈｉドメインは、当該技術分野では、およそ６０アミノ酸長であり、４つのシステインを含むと説明されている。（Ｗｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。ＩＬ－１５活性を保持し、Ｓｕｓｈｉドメインを含む可溶性ヒトＩＬ－１５Ｒαの切断形態は、本開示のＩＬ－１５ＳＡにおいて有用である。

【２４７０】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、本明細書に記載のＦｃ融合体（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ）などの融合タンパク質として発現される可溶性ヒトＩＬ－１５ＲαとＩＬ－１５とを含む複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、２つのヒトＩＬ－１５分子と複合体化された二量体ヒトＩＬ－１５ＲαＦｃ融合タンパク質（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ）を含む。

【２４７１】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、配列番号２５８、配列番号２６１、配列番号２６２、または配列番号２６３に示されるアミノ酸配列を含むＩＬ－１５分子を含む、ＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体は、配列番号２６０、配列番号２６４または配列番号２６５の配列を含む、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子を含む。

【２４７２】

いくつかの実施形態では、免疫調節剤は、２つのＩＬ－１５分子と複合体化された二量体ＩＬ－１５ＲαＦｃ融合タンパク質を含むＩＬ－１５ＳＡサイトカイン複合体である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５－ＳＡは、ＵＳ２０１４０１３４１２８（参照により本明細書に組み込まれる）に記載の二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ（Ｓｕｓｈｉドメイン）／Ｆｃ（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５Ｎ７２Ｄ（配列番号２５８）分子（ＡＬＴ－８０３としても知られる）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２４７３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ分子（配列番号２５９）、及び配列番号２５８、２５８、２６２、及び２６３から選択されるアミノ酸配列を有する２つのＩＬ－１５分子を含む。

【２４７４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６０）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２４７５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６４）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。

【２４７６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２５８）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６１）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、可溶性ＩＬ－１５Ｒα分子（配列番号２６５）及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２４７７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ（配列番号２６９）分子及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６２）を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、二量体ＩＬ－１５ＲαＳｕ／Ｆｃ（配列番号２５９）分子及び２つのＩＬ－１５分子（配列番号２６３）を含む。

【２４７８】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２５９及び配列番号２６０を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１または配列番号２６２を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６２及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６３及び配列番号２５９を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６１及び配列番号２６０を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＳＡは、配列番号２６２及び配列番号２６０を含む。

【２４７９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１５またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－１５を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２４８０】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。ＩＬ－１５を含む免疫調節融合タンパク質の発現のための例示的なＮＦＡＴプロモーター駆動型構築物を表５９に示す。

【２４８１】

２．ＩＬ－１２

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１２またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－１２は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２４８２】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１２」、「ＩＬ－１２」及び「ＩＬ１２」はすべて、ＩＬ－１２Ａ及びＩＬ－１２Ｂ遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００８８２（ＩＬ－１２Ａ）及びＮＭ＿００２１８７（ＩＬ－１２Ｂ））によってコードされるヘテロ二量体サイトカインであるインターロイキンを指す。ＩＬ－１２は、４つのアルファヘリックスのバンドルで構成され、天然Ｔ細胞のＴＨ１細胞への分化に関与する。それは２つの別々の遺伝子、ＩＬ－１２Ａ（ｐ３５）及びＩＬ－１２Ｂ（ｐ４０）によってコードされる。活性ヘテロ二量体（「ｐ７０」と称される）、及びｐ４０のホモ二量体は、タンパク質合成の後に形成される。ＩＬ－１２は、ＩＬ－１２Ｒ－β１及びＩＬ－１２Ｒ－β２によって形成されるヘテロ二量体受容体である、ＩＬ－１２受容体に結合する。ＩＬ－１２は、Ｔ細胞の成長及び機能を刺激することができるＴ細胞刺激因子として知られている。特に、ＩＬ－１２は、Ｔ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞からのインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）及び腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）の産生を刺激し、ＩＦＮ－γのＩＬ－４媒介抑制を低減することができる。ＩＬ－１２は、ＮＫ細胞及びＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球の細胞傷害活性の増強をさらに媒介することが

できる。さらに、ＩＬ－１２はまた、インターフェロンガンマの産生を増加させることによって抗血管新生活性を有し得、これは順に、ケモカイン誘導性タンパク質－１０（ＩＰ－１０またはＣＸＣＬ１０）の産生を増加させる。次いで、ＩＰ－１０が、この抗血管新生効果を媒介する。したがって、いかなる特定の操作理論にも拘束されることなく、ＩＬ－１２は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【２４８３】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－１２は、全長ＩＬ－１２、ＩＬ－１２の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２は、ヒトＩＬ－１２またはバリアントヒトＩＬ－１２である。例示的な実施形態では、ＩＬ－１２は、生物学的に活性なヒトＩＬ－１２バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２は、野生型ＩＬ－１２と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。

【２４８４】

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬ組成物に含まれるＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットまたはそのバリアントを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットは、ヒトＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットは、アミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、修飾されたＴＩＬ組成物に含まれるＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットまたはそのバリアントを含む。ある特定の実施形態では、ＩＬ－１２は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットに付着したＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットを含む一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドである。そのようなＩＬ－１２一本鎖ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１２の生物学的活性のうちの１つ以上を有利に保持する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端へ、式（ｐ４０）－（Ｌ）－（ｐ３５）によるものであり、式中、「ｐ４０」は、ＩＬ－１２　ｐ４０サブユニットであり、「ｐ３５」は、ＩＬ－１２　ｐ３５サブユニットであり、Ｌは、リンカーである。他の実施形態では、一本鎖ＩＬ－１２は、Ｎ末端からＣ末端へ、式（ｐ３５）－（Ｌ）－（ｐ４０）によるものである。任意の好適なリンカーは、本明細書に記載のものを含む、一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドで使用され得る。好適なリンカーには、例えば、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）$_x$を有するリンカーが含まれ得、ここで、ｘは、１～１０の整数である。他の好適なリンカーとしては、例えば、アミノ酸配列ＧＧＧＧＧＧＳが挙げられる。対象の一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドとともに使用することができる例示的な一本鎖ＩＬ－１２リンカーもまた、Ｌｉｅｓｃｈｋｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１５：３５～４０（１９９７）（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）において、特にＩＬ－１２ポリペプチドリンカーの教示のために記載されている。例示的な実施形態では、一本鎖ＩＬ－１２ポリペプチドは、一本鎖ヒトＩＬ－１２ポリペプチドである（すなわち、それは、ヒトｐ３５及びｐ４０　ＩＬ－１２サブユニットを含む）。

【２４８５】

【表２３】

表６－ＩＬ－１２関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-12 p35サブユニット	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNM LQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTST VEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLA SRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTM NAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQA LNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLH AFRIRAVTIDRVMSYLNAS (配列番号267)
ヒトIL-12 p40サブユニット	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKED GIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSG RFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDS ACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWE YPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKK DRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYS SSWSEWASVPCS (配列番号268)

【２４８６】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１２またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。

【２４８７】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１２を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。例えば、米国特許第８，５５６，８８２号（これは参照によりその全体が、特にＩＬ－１２発現のためのＮＦＡＴプロモーターに関連する関連部分について組み込まれる）を参照されたい。ＩＬ－１２を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８に示す。

【２４８８】

３．ＩＬ－１８

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－１８またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－１８は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２４８９】

本明細書で使用される場合、「インターロイキン１８」、「ＩＬ－１８」、「ＩＬ１８」、「ＩＧＩＦ」、「ＩＬ－１ｇ」、「インターフェロン－ガンマ誘導因子」、及び「ＩＬ１Ｆ４」はすべて、ＩＬ－１８遺伝子（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２４３２１１、ＮＭ＿００１５６２及びＮＭ＿００１３８６４２０）によってコードされるヘテロ二量体サイトカインである、インターロイキンを指す。ＩＬ－１βと構造的に類似するＩＬ－１８は、サイトカインのＩＬ－１スーパーファミリーのメンバーである。多くのヒトリンパ球及び非リンパ球細胞によって発現されるこのサイトカインは、炎症プ

ロセスにおいて重要な役割を果たす。ＩＬ－１２と組み合わせたＩＬ－１８は、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）、ならびにナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を活性化して、ＩＦＮ－γを産生することができ、したがって、腫瘍免疫に寄与する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、ＩＬ－１８は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。

【２４９０】

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

【２４９１】

【表２４】

表７－ＩＬ－１８関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDM TDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISV KCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIF FQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDL FKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号 269)
ヒト IL-18 バリアント	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDM TDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAVTISVK CEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFF ARVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFK LILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号 270)

【２４９２】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－１８を含む例示的な融合タンパク質を、図５１に示す。

【２４９３】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－１８を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質の発現のための例示的なＮＦＡＴプロモーター駆動型構築物を、表５９に示す。

【２４９４】

４．ＩＬ－２１

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－２１またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－２１は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２４９５】

ある特定の実施形態では、サイトカイン－ＡＢＤは、ＩＬ－２１分子またはその断片を含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン２１」、「ＩＬ－２１」、及び「

ＩＬ２１」（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００１２０７００６及びＮＰ＿００１１９３９３５（ヒト）、ならびにＮＭ＿０００１２９１０４１及びＮＰ＿００１２７７９７０（マウス））はすべて、ＩＬ－２１受容体に結合し、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞及び細胞傷害性細胞を含む免疫系の細胞に対して強力な調節効果を有し、ウイルス感染またはがん細胞を破壊することができるＩＬ－２１受容体に結合するサイトカインのメンバーを指す。したがって、いかなる特定の操作理論にも拘束されることなく、ＩＬ－２１は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【２４９６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、ヒトＩＬ－２１である。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－２１は、全長ＩＬ－２１、ＩＬ－２１の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、ヒトＩＬ－２１またはバリアントヒトＩＬ－２１である。例示的な実施形態では、ＩＬ－２１は、生物学的に活性なヒトＩＬ－２１バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２１は、野生型ＩＬ－２１と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。

【２４９７】

【表２５】

表８－ＩＬ－２１関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-21	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFL PAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNE RIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDS YEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSE DS (配列番号 271)

【２４９８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２１またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－２１を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２、ならびに表５８及び５９に示す。

【２４９９】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２１を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。

【２５００】

５．ＩＬ－２

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＩＬ－２またはそのバリアントと会合する。例示的な実施形態では、ＩＬ－２は、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２５０１】

ある特定の実施形態では、サイトカイン－ＡＢＤは、ＩＬ－２分子またはその断片を含む。本明細書で使用される場合、「インターロイキン２」、「ＩＬ－２」、「ＩＬ２」、及び「ＴＣＧＦ」（例えば、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿０００５８６及びＮＰ＿０００５７７（ヒト）はすべて、ＩＬ－２受容体に結合するサイトカインのメンバーを指す。ＩＬ－２は、活性化誘発性細胞死（ＡＩＣＤ）を増強する。ＩＬ－２はまた、初期Ｔ細胞が抗原によっても刺激されるときに、Ｔ細胞の、エフェクターＴ細胞への分化及びメモリーＴ細胞への分化を促進し、したがって、身体が感染症を撃退するのを助ける。他の分

極サイトカインとともに、ＩＬ－２は、Ｔｈ１及びＴｈ２リンパ球へのナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞分化を刺激し、Ｔｈ１７及び濾胞性Ｔｈリンパ球への分化を阻害する。ＩＬ－２はまた、ナチュラルキラー細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞の両方の細胞殺傷活性を増加させる。したがって、いかなる特定の操作理論にも拘束されることなく、ＩＬ－２は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の生存可能性及び／または抗腫瘍効果を増加させることができると考えられる。

【２５０２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ヒトＩＬ－２である。いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬと会合するＩＬ－２は、全長ＩＬ－２、ＩＬ－２の断片またはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、ヒトＩＬ－２またはバリアントヒトＩＬ－２である。例示的な実施形態では、ＩＬ－２は、生物学的に活性なヒトＩＬ－２バリアントである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、野生型ＩＬ－２と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０の変異を含む。

【２５０３】

【表２６】

表９－ＩＬ－２関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒトIL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT (配列番号 272)

【２５０４】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２またはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。ＩＬ－２を含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２に示す。

【２５０５】

例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＩＬ－２を含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。

【２５０６】

６．ＣＤ４０アゴニスト

いくつかの実施形態では、修飾されたＴＩＬは、ＣＤ４０アゴニストと会合する。例示的な実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、本明細書に記載の免疫調節融合タンパク質（例えば、膜アンカー免疫調節融合タンパク質）の一部として含まれる。

【２５０７】

分化クラスター４０、ＣＤ４０は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に見出される共刺激タンパク質であり、ＡＰＣ活性化に必要である。Ｔヘルパー細胞上のＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４）のＣＤ４０への結合は、抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を活性化し、様々な下流効果を誘導する。いかなる特定の操作理論によるものではないが、抗原提示細胞（すなわち、ＣＤ４０アゴニスト）上でＣＤ４０を活性化する１つ以上の免疫調節剤の添加は、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物の抗腫瘍効果を増強することができると考えられる。ＣＤ４０アゴニストとしては、例えば、ＣＤ４０Ｌ及びＣＤ４０にアゴニスト的に結合する抗体またはその抗体断片（例えば、ｓｃＦｖ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、ＣＤ４０Ｌまたはその生体活性バリアントを含む免疫調節融合タンパク質またはナノ粒子組成物を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、アゴニスト抗

ＣＤ４０結合ドメイン（例えば、ｓｃＦｖ）を含む免疫調節融合タンパク質を含む。例示的なＣＤ４０アゴニスト配列を以下の表に示す。

【２５０８】

ＣＤ４０アゴニスト活性は、当該技術分野で知られている任意の好適な方法を使用して測定することができる。例えば、ＤＣ上のＣＤ４０のライゲーションは、共刺激及びＭＨＣ分子の表面発現の増加、炎症誘発性サイトカインの産生、ならびにＴ細胞トリガーの増強を誘導する。安静Ｂ細胞上のＣＤ４０ライゲーションは、抗原提示機能及び増殖を増加させる。例示的な実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、ヒト樹状細胞を活性化することができる。

【２５０９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬ組成物は、表１０に示される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖのＶＨ及びＶＬ配列を有するアゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメイン、またはその生体活性バリアントを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＨ配列と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、アゴニスト抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＨ配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含むＶＨ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＬ配列と少なくとも約８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％同一であるＶＬ配列を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０に示されるＶＬ配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含むＶＬ配列を含む。例示的な実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、表１０の配列番号２７６、２７９、２８２、及び２８５から選択される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖである。

【２５１０】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ４０結合ドメインは、ヒトＣＤ４０に結合することができる、表１０の抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖのバリアントである。例示的な実施形態では、バリアント抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖは、表１０の配列番号２７６、２７９、２８２、及び２８５から選択される抗ＣＤ４０　ｓｃＦｖと少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一である。

【２５１１】

ＣＤ４０結合ドメイン結合の評価は、Ｂｉａｃｏｒｅ、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）及び／またはＢＬＩ（バイオレイヤー干渉法、例えば、Ｏｃｔｅｔアッセイ）アッセイを含むがこれらに限定されない、当該技術分野で知られている任意の好適なアッセイを使用して測定することができる。

【２５１２】

免疫調節剤として有用な追加のＣＤ４０結合ドメイン（ＶＨ及びＶＬ）としては、米国特許第ＵＳ６，８３８，２６１号、同第ＵＳ６，８４３，９８９号、同第ＵＳ７，３３８，６６０号、同第ＵＳ８，７７７８，３４５号に記載されるものが挙げられ、これらは特に抗ＣＤ４０抗体ならびにＶＨ、ＶＬ及びＣＤＲ配列の教示に関して参照により本明細書に組み込まれる。

【２５１３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）である。例示的な実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、ヒトＣＤ４０Ｌ（配列番号２７０）である。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、配列番号２５３と少なくとも約７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるヒトＣＤ４０Ｌのバリアントである。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０Ｌは、配列番号２７３と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個のアミノ酸置換を含む、ヒトＣＤ４０Ｌのバリアントである。

【２５１４】
ＣＤ４０アゴニストを含む例示的な融合タンパク質を、図５１及び５２に示す。
【２５１５】
例示的な実施形態では、本明細書で提供されるＴＩＬ組成物は、ＣＤ４０アゴニストを含む免疫調節融合タンパク質をコードする核酸を含み、核酸は、本明細書に記載されるように、ＮＦＡＴプロモーターに作動可能に連結される。
【２５１６】
【表２７－１】

表１０－ＣＤ４０アゴニスト関連配列。

説明	アミノ酸配列
ヒト CD40L	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTV FLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLH EDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQ FEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQN PQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTM SNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTF CSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRA ANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVF VNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号 273)
抗ヒト CD40 VH(ソチガリマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF SSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTN YSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLV TVSS (配列番号 274)
抗ヒト CD40 VL(ソチガリマブ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISS RLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQC TGYGISWPIGGGTKVEIK (配列番号 275)
抗ヒト CD40 scFv(ソチガリマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF SSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTN YSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLA WYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYG ISWPIGGGTKVEIK (配列番号 276)
抗ヒト CD40 VH(ダセツズマブ)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTG YYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTS YNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS (配列番号 277)

【表２７－２】

抗ヒト CD40 VL(ダセツズマブ)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLV HSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNR FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK (配列番号 278)
抗ヒト CD40 scFv(ダセツズマブ)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTG YYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTS YNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLH WYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHV PWTFGQGTKVEIK (配列番号 279)
抗 CD40 VH(ルカツツズマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESN RYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLR TEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTL VTVSS (配列番号 280)
抗 CD40 VL(ルカツツズマブ)	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLY SNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR (配列番号 281)
抗 CD40 scFv(ルカツツズマブ)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESN RYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLR TEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNG YNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQARQTPFTFGPGTKVDIR (配列番号 282)
抗 CD40 VH(セリクレルマブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 283)

【表２７－３】

抗 CD40 VL(セリクレルマブ)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIY SWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGTKVEIK (配列番号 284)
抗 CD40 scFv(セリクレルマブ)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL NRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCS YFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC RASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK (配列番号 285)

【２５１７】

ＶＩＩ．薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

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

【２５１８】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣまたは黒色腫である場合、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}のＴＩＬが投与され、平均約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬが、投与される。いくつかの実施形態では、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０

10^{10}～約8×10^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約1×10^{9}～約1×10^{11}のＴＩＬである。

【２５１９】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物に提供されるＴＩＬの数は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの数は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【２５２０】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖより小さい。

【２５２１】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％

、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖより大きい。

【２５２２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２５２３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２５２４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【２５２５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇより大きい。

【２５２６】

本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動

物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【２５２７】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回より多くてもよい。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。

【２５２８】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効用量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。

【２５２９】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【２５３０】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、

約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【２５３１】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【２５３２】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を含む注入バッグを提供する。

【２５３３】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【２５３４】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を含む注入バッグを提供する。

【２５３５】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団の凍結保存された調製物を提供する。

【２５３６】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団及び凍結保存培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【２５３７】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２５３８】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物を提供する。

【２５３９】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のＴＩＬ組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【２５４０】

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

【２５４１】

任意の好適な用量のＴＩＬが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣＬＣである場合、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}のＴＩＬが投与され、平均約７．８×10^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}のＴＩＬが、投与される。いくつかの実施形態では、約３×10^{10}～約１２×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約４×10^{10}～約１０×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約５×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約６×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、約７×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}である。いくつかの実施形態では、特にがんがＮＳＣ

ＬＣである場合、治療上有効な投与量は、約７．８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}のＴＩＬである。

【２５４２】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物に提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}、及び９×１０^{13}である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの数は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}、及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【２５４３】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、薬学的組成物の１００％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９％、１８％、１７％、１６％、１５％、１４％、１３％、１２％、１１％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖより小さい。

【２５４４】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．

５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％、または０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖより大きい。

【２５４５】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．０００１％～約５０％、約０．００１％～約４０％、約０．０１％～約３０％、約０．０２％～約２９％、約０．０３％～約２８％、約０．０４％～約２７％、約０．０５％～約２６％、約０．０６％～約２５％、約０．０７％～約２４％、約０．０８％～約２３％、約０．０９％～約２２％、約０．１％～約２１％、約０．２％～約２０％、約０．３％～約１９％、約０．４％～約１８％、約０．５％～約１７％、約０．６％～約１６％、約０．７％～約１５％、約０．８％～約１４％、約０．９％～約１２％、または約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２５４６】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、薬学的組成物の約０．００１％～約１０％、約０．０１％～約５％、約０．０２％～約４．５％、約０．０３％～約４％、約０．０４％～約３．５％、約０．０５％～約３％、約０．０６％～約２．５％、約０．０７％～約２％、約０．０８％～約１．５％、約０．０９％～約１％、約０．１％～約０．９％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ、またはｖ／ｖの範囲内である。

【２５４７】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、１０ｇ、９．５ｇ、９．０ｇ、８．５ｇ、８．０ｇ、７．５ｇ、７．０ｇ、６．５ｇ、６．０ｇ、５．５ｇ、５．０ｇ、４．５ｇ、４．０ｇ、３．５ｇ、３．０ｇ、２．５ｇ、２．０ｇ、１．５ｇ、１．０ｇ、０．９５ｇ、０．９ｇ、０．８５ｇ、０．８ｇ、０．７５ｇ、０．７ｇ、０．６５ｇ、０．６ｇ、０．５５ｇ、０．５ｇ、０．４５ｇ、０．４ｇ、０．３５ｇ、０．３ｇ、０．２５ｇ、０．２ｇ、０．１５ｇ、０．１ｇ、０．０９ｇ、０．０８ｇ、０．０７ｇ、０．０６ｇ、０．０５ｇ、０．０４ｇ、０．０３ｇ、０．０２ｇ、０．０１ｇ、０．００９ｇ、０．００８ｇ、０．００７ｇ、０．００６ｇ、０．００５ｇ、０．００４ｇ、０．００３ｇ、０．００２ｇ、０．００１ｇ、０．０００９ｇ、０．０００８ｇ、０．０００７ｇ、０．０００６ｇ、０．０００５ｇ、０．０００４ｇ、０．０００３ｇ、０．０００２ｇ、または０．０００１ｇ以下である。

【２５４８】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ、または１０ｇより大きい。

【２５４９】
本発明の薬学的組成物中に提供されるＴＩＬは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、ＴＩＬの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。ＴＩＬの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。
【２５５０】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、複数回用量で投与され得る。投薬は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回、または６回より多くてもよい。投薬は、月１回、２週間に１回、週１回、または隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は、必要な限り継続することができる。
【２５５１】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効用量は、約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}、及び9×10^{13}である。いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効投与量は、1×10^{6}～5×10^{6}、5×10^{6}～1×10^{7}、1×10^{7}～5×10^{7}、5×10^{7}～1×10^{8}、1×10^{8}～5×10^{8}、5×10^{8}～1×10^{9}、1×10^{9}～5×10^{9}、5×10^{9}～1×10^{10}、1×10^{10}～5×10^{10}、5×10^{10}～1×10^{11}、5×10^{11}～1×10^{12}、1×10^{12}～5×10^{12}、及び5×10^{12}～1×10^{13}の範囲内である。
【２５５２】
いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、または約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。
【２５５３】

いくつかの実施形態では、ＴＩＬの有効な投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ、または約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ、または約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【２５５４】

ＴＩＬの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【２５５５】

ＶＩＩＩ．患者を治療する方法

治療方法は、最初のＴＩＬ収集及びＴＩＬの培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｊｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ，２０１２，３５（３）：２８３－２９２によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【２５５６】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（また例えば、図１及びまたは図８に示されるように）産生される拡張ＴＩＬは、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１６，３４（２０）：２３８９－２３９、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から成長させた（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２００３，２６：３３２－３４２を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり５、１０、１５、２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２５、または３０個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２０、２２、２４、２６、または２８個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり２４個の試料が取得される。試料は、２４ウェルプレートの個々のウェルに入れ、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中で維持し、腫瘍の破壊及び／またはＴＩＬの増殖をモニターすることができる。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

【２５５７】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長したＴＩＬは、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、及びＣＤ５６）のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晩の共培養によりインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）レベルが２００ｐｇ／ｍＬを超え、バックグラウンドの２倍になった場合、ＴＩＬは反応性があるとみなされ得る。（Ｇｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，２０１０，３３：８４０－８４７、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡張を含む、第２の拡張（例えば、図１及び／または図８のステップＤに従って提供される第２の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施

形態では、高い自己反応性（例えば、第２の拡張中の高い増殖）を有する拡張ＴＩＬが、追加の第２の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図１及び／または図８のステップＤで提供されるような第２の拡張中の高い拡張）を有するＴＩＬが、図１及び／または図８のステップＤに従って、追加の第２の拡張のために選択される。

【２５５８】

注入バッグＴＩＬの凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＣＲ７、及びＣＤ４５ＲＡ（ＢＤ　ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ）のフローサイトメトリー（例えば、ＦｌｏｗＪｏ）、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、１００ｐｇ／ｍＬを超え、かつ４３ベースラインレベルを超えると定義された。

【２５５９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１及び／または図８に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス１Ｃ及び／または第１世代（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、ＤＣＲ、ＯＲＲ、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図１に例示される方法によって産生されるＴＩＬは、例えば、図１及び／または図８に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生されるＴＩＬと比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

【２５６０】

いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって生成されるＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、３倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、

４倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５倍増加する。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでのＴＩＬにおいて測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のＴＩＬ血清において測定される。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。

【２５６１】

いくつかの実施形態では、例えば図１に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬ。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、治療有効性及び／または臨床有効性の増加を示す。いくつかの実施形態では、ＴＩＬで治療された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性なＴＩＬを示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能の別の尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、例えば、図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたＴＩＬで治療された対象のエクスビボでの血液、血清、またはＴＩＬ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法によって生成されるＴＩＬで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、ＩＦＮ－γは、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、ＩＦＮ－γが１倍、２倍、３倍、４倍、または５倍以上増加する。

【２５６２】

いくつかの実施形態では、例えば図１及び／または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えばプロセス１Ｃ法と称される方法を含む、図１及び／または図８に例示されていないものを含む他の方法によって生成されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって生成されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／また

は例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２５６３】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）及び全応答率（ＯＲＲ）が含まれ得る。

【２５６４】

Ａ．がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。本明細書に記載の組成物及び方法は、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【２５６５】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒト乳頭腫ウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽細胞腫、神経芽細胞腫、松果芽細胞腫、及び原始神経外胚腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮細胞子宮頸癌、腺扁平上皮子宮頸癌、及び子宮頸部腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合部癌、胃癌、胃腸癌、胃腸間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎癌、肝癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、及び他の骨及び軟部組織の肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、及び膣癌からなる群から選択される。

【２５６６】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＭＩＬまたはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【２５６７】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少なくとも１つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍癌及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも２つの以前

の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの１つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも３つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述のがんのうちの１つである。

【２５６８】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）癌である。したがって、ＭＳＩ－Ｈ及びｄＭＭＲ癌及び試験は、Ｋａｗａｋａｍｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｔｒｅａｔ．Ｏｐｔｉｏｎｓ　Ｏｎｃｏｌ．２０１５，１６，３０に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２５６９】

いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、コンパニオンアニマルである。

【２５７０】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の集団及びＩＬ－１５Ｒアゴニストを投与することを含む、がんの治療を必要とする患者においてそれを行う方法を提供する。理論によって拘束されることを望まないが、ｉ）サイトカインサポートは、ＩＬ－１５Ｒアゴニスト－ＴＩＬ併用療法を使用して最適化されることができ、これは、ＴＩＬ注入前に必要とされるＮＭＡＬＤレジメンの用量強度を潜在的に回避または低減することができ、ｉｉ）Ｔ制御性細胞を増加させることなくＣＤ８及びＣＤ４を、ＩＬ－１５Ｒアゴニストを用いたＴＩＬレジメンで達成することができると考えられている。さらに、ＴＩＬ療法と組み合わせたＩＬ－１５Ｒアゴニストの使用が、ＴＩＬ注入後のＩＬ２（アルデスロイキン）支持療法の必要条件の低減または排除をもたらし得ると考えられている。

【２５７１】

したがって、いくつかの実施形態では、患者は、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受ける。いくつかの実施形態では、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、約２５０～７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でシクロホスファミドの投与を含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約２５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約５００ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、３または４日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの投与に続いて、３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でフルダラビンの投与が行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、３、４、または５日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、患者は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受けない。

【２５７２】

いくつかの実施形態では、低減用量ＩＬ－２レジメンは、８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、低減された数、例えば、１、２、３、４、もしくは５つの用量の６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む。いくつかの実施形態では、患者は、ＩＬ－２レジメンを受けない。

【２５７３】

ＩＬ－１５の安全性プロファイルは、堅牢なＴＩＬ持続性を可能にすることができる反

復投与に適していると考えられている。ＴＩＬ持続性と有効性との間の関連は十分に定義されていないが、ＣＡＲＴ細胞療法の文献からの経験は、ＣＡＲＴ持続性が応答及び応答の持続時間にとって重要であることを示唆している。

【２５７４】

いくつかの実施形態では、がんの治療を必要とするがん患者は、本明細書に提供されるＴＩＬ及び本明細書に開示される少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニストの両方で治療される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＴＩＬと同時に患者に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニスト及びＴＩＬは、連続的に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＴＩＬの投与前に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＴＩＬの投与後に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニストが、ＴＩＬの投与の前後の両方に投与される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのＩＬ－１５Ｒアゴニストの投与は、ＴＩＬの投与後に維持される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒαアゴニストは、ＴＩＬ集団を投与するのと同じ日に、患者または対象に投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＴＩＬ集団を投与した後、患者または対象に、約１日間、約２日間、約３日間、約４日間、約５日間、約６日間、約７日間、約８日間、約９日間、または約１０日間投与される。

【２５７５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、または月に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、合計約１用量、約２用量、約３用量、約４用量、約５用量、約６用量、約７用量、約８用量、約９用量、約１０用量、約１１用量、約１２用量、約１３用量、約１４用量、約１５用量、約１６用量、約１７用量、約１８用量、約１９用量、約２０用量、約２１用量、約２２用量、約２３用量、約２４用量、約２５用量、約２６用量、約２７用量、約２８用量、約２９用量、または約３０用量で投与される。

【２５７６】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１日約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１日少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１日１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態で

は、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。

【２５７７】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【２５７８】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。

【２５７９】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。

【２５８０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、肉腫である。

【２５８１】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。

【２５８２】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【２５８３】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（ＰＮＥＴ）である。

【２５８４】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（ＣＮＳ）関連がんである。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【２５８５】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ＣＮＳ関連がんは、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【２５８６】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対して不応性であるか、または抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体による治療に対する前治療に対して耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する事前の応答を示し、その後に患者のがんの進行が続く。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも１つの化学療法剤と組み合わせた抗ＣＴＬＡ－４抗体及び／または抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの以前の実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み

合わされている。
【２５８７】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、ＰＤ－Ｌ１陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）でＰＤ－Ｌ１を発現するがんを有する患者からのものである。
【２５８８】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、
ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。
【２５８９】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、
ｉ）シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第１の化学療法剤と、
ｉｉ）ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはｎａｂ－パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第２の化学療法剤と、を含む。
【２５９０】
いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣを有するか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブであるか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、低いＰＤ－Ｌ１の発現を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブであるか、または化学療法治療後であるが、抗ＰＤ－１／　ＰＤ－Ｌ１ナイーブであり、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘤病変を有し、検出可能なＰＤ－Ｌ１の発現を有しない。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ患者は、治療ナイーブのＮＳＣＬＣまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、ＰＤ－Ｌ１の発現が低く、かつ／またはベースラインで巨大腫瘤病変を有する抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１ナイーブである。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された７ｃｍより大きい場合、巨大腫瘤病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘤病変は、２０ｍｍ以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、ＮＳＣＬＣの標準治療の治療薬を含む。
【２５９１】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、＜１％の腫瘍割合スコア

（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、当該抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性ＮＳＣＬＣを有する対象は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、当該抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２５９２】

いくつかの実施形態では、例えば、図１または図８に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるＴＩＬは、例えば、プロセス１Ｃ法と称される方法などの、図１または図８に例示されていないものを含む他の方法によって生成されるＴＩＬと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有効性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって生成されたＴＩＬの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬと比較して、１倍、２倍、１０倍、１００倍、５００倍、または１０００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

【２５９３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１発現は、本明細書に記載の１つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、＜１％の腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する対象または患者は、≧１％　ＴＰＳを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗

ＰＤ－１及び／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性ＮＳＣＬＣを有する対象または患者は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の前に決定された。

【２５９４】

いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、１％未満（ＴＰＳ＜１％）のＰＤ－Ｌ１タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、＜５０％、＜４５％、＜４０％、＜３５％、＜３０％、＜２５％、＜２０％、＜１５％、＜１０％、＜９％、＜８％、＜７％、＜６％、＜５％、＜４％、＜３％、＜２％、＜１％、＜０．９％、＜０．８％、＜０．７％、＜０．６％、＜０．５％、＜０．４％、＜０．３％、＜０．２％、＜０．１％、＜０．０９％、＜０．０８％、＜０．０７％、＜０．０６％、＜０．０５％、＜０．０４％、＜０．０３％、＜０．０２％、及び＜０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、約５０％、約４５％、約４０％、約３５％、約３０％、約２５％、約２０％、約１５％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、約１％、約０．９％、約０．８％、約０．７％、約０．６％、約０．５％、約０．４％、約０．３％、約０．２％、約０．１％、約０．０９％、約０．０８％、約０．０７％、約０．０６％、約０．０５％、約０．０４％、約０．０３％、約０．０２％、及び約０．０１％からなる群から選択されるＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．９％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．８％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．７％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．６％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．５％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．４％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．３％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．２％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。いくつかの実施形態では、ＮＳＣＬＣは、０％～０．１％のＴＰＳを示すＮＳＣＬＣである。ＴＰＳは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Ｈｉｒｓｃｈ，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｔｈｏｒａｃ．Ｏｎｃｏｌ．２０１７，１２，２０８－２２２に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗ＰＤ－１もしくは抗ＰＤ－Ｌ１療法による治療前のＴＰＳの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局（Ｕ．Ｓ．Ｆｏｏｄ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）によって承認されたＴＰＳの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に見出される。

【２５９５】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ１００％膜染色を含む。

【２５９６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１の試験は、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のＰＤ－Ｌ１の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【２５９７】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性ＰＤ－Ｌ１の上昇は、ＮＳＣＬＣにおける予後の悪化と相関する。例えば、Ｏｋｕｍａ，ｅｔ　ａ

ｌ．，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ，２０１８，１９，４１０－４１７、Ｖｅｃｃｈｉａｒｅｌｌｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ，２０１８，９，１７５５４－１７５６３を参照されたい。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、エクソソームＰＤ－Ｌ１である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【２５９８】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせて、対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２５９９】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のＴＩＬ組成物を、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせて、対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６００】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的ＴＩＬ集団を、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせて、ＴＩＬ組成物を、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせて、それぞれ投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンである。いくつかの実施形態では、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、約２５０～７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でシクロホスファミドの投与を含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約２５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約５００ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、３または４日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの投与に続いて、３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でフルダラビンの投与が行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、３、４、または５日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、対象は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを投与されていない。

【２６０１】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０２】

他の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、高用量のＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０３】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０４】

他の実施形態では、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に開始する、低減用量ＩＬ－２レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、低減用量ＩＬ－２レジメンは、８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、低減された数、例えば、１、２、３、４、もしくは５つの用量の６００，０００もしく

は７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む。いくつかの実施形態では、本発明は、対象をＩＬ－２レジメンで治療するステップなしで、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０５】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０６】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒト乳頭癌ウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上皮癌、髄芽細胞腫、神経芽細胞腫、松果芽細胞腫、及び原始神経外胚葉腫を含む）、子宮頸癌（扁平上皮子宮頸癌、腺扁平上皮子宮頸癌、及び子宮頸腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道接合部癌、胃癌、胃腸癌、胃腸間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、下咽頭癌、喉頭癌、上咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎癌、肝癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫を含む）、横紋筋肉腫、及び他の骨及び軟部組織肉腫）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、及び膣癌からなる群から選択されるように修飾された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０７】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０８】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６０９】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１０】

他の実施形態では、本発明は、がんがＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１１】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１２】

他の実施形態では、本発明は、がんがＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１３】

他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１４】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１５】

他の実施形態では、本発明は、がんが、高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１６】

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児の高頻度癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６１７】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団を、対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【２６１８】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を、対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６１９】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の本明細書に記載の治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＴＩＬ組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンである。いくつかの実施形態では、対象は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを投与されていない。

【２６２０】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与に続いて、２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６２１】

他の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６２２】

他の実施形態では、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される６００，０００または７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６２３】

他の実施形態では、本発明は、ＴＩＬ細胞を患者に投与した翌日から開始する、低減用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、対象をＩＬ－２レジメンで治療するステップなしで、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【２６２４】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒア

ゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６２５】
いくつかの実施形態では、本発明は、がんが、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒト乳頭癌ウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上皮癌、髄芽細胞腫、神経芽細胞腫、松果芽細胞腫、及び原始神経外胚葉腫を含む）、子宮頸癌（扁平上皮子宮頸癌、腺扁平上皮子宮頸癌、及び子宮頸腺癌を含む）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道接合部癌、胃癌、胃腸癌、胃腸間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、下咽頭癌、喉頭癌、上咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌を含む）、腎癌、肝癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌を含む）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫を含む）、横紋筋肉腫、及び他の骨及び軟部組織肉腫）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、及び膣癌からなる群から選択されるように修飾された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６２６】
他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６２７】
他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽細胞腫（ＧＢＭを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６２８】
他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６２９】
他の実施形態では、本発明は、がんが、ＨＮＳＣＣであるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６３０】
他の実施形態では、本発明は、がんが、子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６３１】
他の実施形態では、本発明は、がんが、ＮＳＣＬＣであるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６３２】
他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。
【２６３３】
他の実施形態では、本発明は、がんが、胃腸癌であるように修正された、本明細書に記

載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６３４】

他の実施形態では、本発明は、がんが、高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６３５】

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、またはＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を提供する。

【２６３６】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団の使用を提供する。

【２６３７】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、ＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における上記の前段落のうちのいずれかに記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【２６３８】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを患者に投与することと、次いで前段落のうちのいずれかに記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団、または治療上有効な投与量の本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物を対象に投与することとを含む、患者においてがんを治療する方法における本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせた治療的ＴＩＬ集団または本明細書に記載のＩＬ－１５Ｒアゴニストと組み合わせたＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【２６３９】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、ＳＴＫ１１またはＣＤＫＮ２Ａ／Ｂ＋低発現の甲状腺転写因子－１（ＴＴＦ－１）による共変異を示す。

【２６４０】

いくつかの実施形態では、患者または対象は、ＳＴＫ１１またはＣＤＫＮ２Ａ／Ｂ＋甲状腺転写因子－１（ＴＴＦ－１）低発現で共変異する。

【２６４１】

１．ＩＬ－１５Ｒアゴニスト

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組み合わせまたは方法は、本明細書に記載のＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＮＫＴＲ－２５５（Ｎｅｋｔａｒ）、ＸｍＡｂ３０６（Ｘｅｎｃｏｒ）、Ｎ－８０３（ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）、ＢＪ－００１（腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ；ＢＪ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）またはＣＹＰ０１５０（Ｃｙｔｕｎｅ）から選択される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＫＴＲ－２５５である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＸｍＡｂ３０６である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、Ｎ－８０３である。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＢＪ－００１である。Ｗａｌｄｍａｎｎ，Ｔ．Ａ．，ｅｔ．ａｌ．，Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１１：１－１０（２０２０）、Ｂｅｓｓａｒｄ Ａ．，ｅｔ．ａｌ．，Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ，２００９；８：２７３６－２７４５、Ｖｉｎｃｅｎｔ Ｍ．，ｅｔ．ａｌ．，Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ ２０１３；１

３３：７５７－７６５、Ｃｏｎｌｏｎ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，２０２１；９：ｅ００３３８８も参照されたく、これらの開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＩＬ－１５スーパーアゴニストである。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇで週１回、６週間投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、最大１、２、３、４、５または１０回の総用量で、毎日１回、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、最大で１、２、３、４、５または１０回の総用量で、２日に１回、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、最大で１、２、３、４、５または１０回の総用量で、３日に１回、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、最大で１、２、３、４、５または１０回の総用量で、４日に１回、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇで投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５ＲアゴニストまたはＩＬ－１５スーパーアゴニストは、最大で１、２、３、４、５または１０回の総用量で、５日に１回、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇで投与される。

【２６４２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１日１回、２日に１回、３日に１回、１週間に２回、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、または月に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、または１２週間もしくはそれ以上、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、２、３、４、５、６、７、または８週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、３、４、５、６、７、または８週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、４、５、６、７、または８週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、４、５、６、または７週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、４、５、または６週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、１～１２週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、２～８週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、３～８週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、４～８週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態

では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、４～７週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、４～６週間、１週間に１回投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、６週間、１週間に１回投与される。

【２６４３】

一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ヒトＩＬ－１５Ｒａの可溶性形態と複合体化されたヒトＩＬ－１５を含む。一態様では、複合体は、ＩＬ－１５Ｒａの可溶性形態に共有結合または非共有結合で結合したＩＬ－１５を含み得る。一実施形態では、ヒトＩＬ－１５は、ＩＬ－１５Ｒａの可溶性形態に非共有結合している。一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＮＩＺ９８５である。別の実施形態では、ＮＩＺ９８５のヒトＩＬ－１５は、表９の配列番号３３２のアミノ酸配列を含み、ＮＩＺ９８５のヒトＩＬ－１５Ｒａの可溶性形態は、ＷＯ２０１４／０６６５２７に記載されるように、表５８の配列番号３３３のアミノ酸配列を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【２６４４】

いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．２５μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．２５μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０μｇ／ｋｇ、約２５μｇ／ｋｇ、約３０μｇ／ｋｇ、約３５μｇ／ｋｇ、約４０μｇ／ｋｇ、約４５μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、約６０μｇ／ｋｇ、約７０μｇ／ｋｇ、約８０μｇ／ｋｇ、約９０μｇ／ｋｇ、または約１００μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、約１．０μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇまたは約４．０μｇ／ｋｇの投与量で１週間に１回、６週間投与される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、１日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、ＮＩＺ９８５は、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、ＮＩＺ９８５は、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与するこ

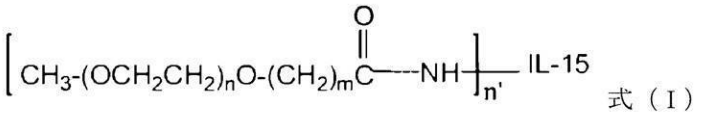
とができる。いくつかの実施形態では、ＮＩＺ９８５は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６４５】

一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＩＬ－１５アミノ基に安定して共有結合する少なくとも１つの水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール）部分を含む長時間作用型ＩＬ－１５受容体アゴニストであるＮＫＴＲ－２５５である。ＮＫＴＲ－２５５は、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３２８１７に記載されており、参照により全体が本明細書に組み込まれる。ＮＫＴＲ－２５５は、とりわけ、ＩＬ－１５及び他のＩＬ－１５受容体アゴニストと比較して、例えば、強力な免疫刺激効果、低い全身毒性、安定性及び／または改善された薬物動態、改善された治療効果などの改善された特性及びインビボプロファイルを提供する。いくつかの実施形態では、長時間作用型ＩＬ－１５受容体アゴニストは、以下の構造を有し、

【２６４６】

【数１】



式（Ｉ）

【２６４７】

構造は、［ＣＨ３Ｏ（ＣＨ２ＣＨ２Ｏ）ｎ（ＣＨ２）ｍＣ（Ｏ）ＮＨ］ｎ’－ＩＬ－１５としても示され得、式中、ＩＬ－１５は、インターロイキン－１５部分であり、（ｎ）は、約１５０～約３，０００の整数であり、（ｍ）は、２、３、４、及び５から選択される整数であり、（ｎ’）は、１であり、～ＮＨ～は、ＩＬ－１５部分のアミノ基を表すか、またはその薬学的に許容される塩形態である。いくつかの特定の実施形態では、式（Ｉ）中の（ｍ）は、２または３である。好ましい実施形態では、式（Ｉ）中の（ｍ）は、３である。いくつかの特定の実施形態では、式（Ｉ）中の（ｎ）は、約２２７の平均値、または約３４０の平均値、または約４５４の平均値、または約６８１の平均値、または約９０９の平均値を有する。１つ以上の実施形態では、（ｎ）は、約９０９の値を有する。

【２６４８】

いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、ま

たは２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、１日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ＮＫＴＲ－２５５は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６４９】

一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、強度低減されたＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質であるＸｍＡｂ３０６である。ＸｍＡｂ３０６は、ＷＯ２０１９／２０４５９２にＸＥＮＰ２４３０６として開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のＩＬ－１５／Ｒａ－Ｆｃ融合タンパク質は、ＸＥＮＰ２４３０６である。ＸＥＮＰ２４３０６は、鎖１（ヒト＿ ＩＬ１５ ＿Ｄ３０Ｎ／Ｅ６４Ｑ／Ｎ６５Ｄ ＿（ＧＧＧＧＳ）１＿Ｆｃ（２１６）＿ＩｇＧ１ ＿ｐＩ（－）＿Ｉｓｏｓｔｅｒｉｃ＿ Ａ＿ Ｃ２２０Ｓ／ＰＶＡ ＿／ Ｓ２６７Ｋ／Ｌ３６８Ｄ／Ｋ３７０Ｓ／Ｍ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ）及び鎖２（ヒト＿ＩＬ１５Ｒａ（Ｓｕｓｈｉ）＿（ＧＧＧＧＳ）１＿Ｆｃ（２１６）＿ＩｇＧ１＿Ｃ２２０Ｓ／ＰＶＡ＿／Ｓ２６７Ｋ／Ｓ３６４Ｋ／Ｅ３５７Ｑ／Ｍ４２８ Ｌ／Ｎ４３４Ｓ）を含む。一実施形態では、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ融合タンパク質は、表５８に開示される配列を含む。

【２６５０】

いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、１日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される

。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ＸｍＡｂ３０６は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６５１】

一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα　Ｆｃ融合タンパク質（ＩＬ－１５Ｎ７２Ｄ：ＩＬ－１５ＲａＳｕ／Ｆｃ可溶性複合体）であるＮ－８０３である。Ｎ－８０３は、ＷＯ２００８／１４３７９４に開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態では、Ｎ－８０３は、表５８に開示される配列を含む。

【２６５２】

いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、Ｎ－８０３は、約２０．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、１日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、２日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、３日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、４日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、５日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、Ｎ－８０３は、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、Ｎ－８０３は、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３投与は、ＴＩＬ投与後０、１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、Ｎ－８０３は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６５３】

一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα　Ｆｃ融合タンパク質（腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ）であるＢＪ－００１である

。ＢＪ－００１は、ＷＯ２０１７／０００９１３に開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態では、ＢＪ－００１は、表５８に開示される配列を含む。

【２６５４】

いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１は、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１は、約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１は、少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１は、１日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、ＢＪ－００１は、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、ＢＪ－００１は、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ＢＪ－００１は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６５５】

一実施形態では、ＩＬ－１５Ｒアゴニストは、ＩＬ－１５Ｒａのｓｕｓｈｉドメイン（ＣＹＰ０１５０、Ｃｙｔｕｎｅ）に融合したＩＬ－１５を含む。ＩＬ－１５Ｒａのｓｕｓｈｉドメインは、ＩＬ－１５Ｒａのシグナルペプチドの後の第１のシステイン残基で始まり、当該シグナルペプチドの後の第４のシステイン残基で終わるドメインを指す。ＣＹＰ０１５０は、ＷＯ２００７／０４６０６及びＷＯ２０１２／１７５２２２に開示されており、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、表５８に開示される配列を含む。

【２６５６】

いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、約０．１μｇ／ｋｇ、約０．２μｇ／ｋｇ、約０．３μｇ／ｋｇ、約０．４μｇ／ｋｇ、約０．５μｇ／ｋｇ、約１．０μｇ／ｋｇ、約１．５μｇ／ｋｇ、約２．０μｇ／ｋｇ、約２．５μｇ／ｋｇ、約３．０μｇ／ｋｇ、約３．５μｇ／ｋｇ、約４．０μｇ／ｋｇ、約４．５μｇ／ｋｇ、約５．０μｇ／ｋｇ、約６．０μｇ／ｋｇ、約７．０μｇ／ｋｇ、約８．０μｇ／ｋｇ、約９．０μｇ／ｋｇ、約１０．０μｇ／ｋｇ、約２０．０μｇ／ｋｇ、約３０．０μｇ／ｋｇ、約４０．０μｇ／ｋｇ、約５０．０μｇ／ｋｇ、約６０．０μｇ／ｋｇ、約７０．０μｇ／ｋｇ、約８０．０μｇ／ｋｇ、約９０．０μｇ／ｋｇ、約１００．０μｇ／ｋｇの投与量で投与さ

れる。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、約１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、少なくとも１００ｍｇ、１５０ｍｇ、２００ｍｇ、２５０ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、４５０ｍｇ、５００ｍｇ、５５０ｍｇ、６００ｍｇ、６５０ｍｇ、７００ｍｇ、７５０ｍｇ、８００ｍｇ、８５０ｍｇ、９００ｍｇ、９５０ｍｇ、１，０００ｍｇ、１，１００ｍｇ、１，２００ｍｇ、１，３００ｍｇ、１，４００ｍｇ、１，５００ｍｇ、１，６００ｍｇ、１，７００ｍｇ、１，８００ｍｇ、１，９００ｍｇ、または２，０００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、１日に１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０回投与される。例示的な実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、約９６０ｍｇの投与量で投与される。例示的な実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、約６００ｍｇの投与量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ＣＹＰ０１５０は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６５７】

【表２８－１】

表５８．他の例示的なＩＬ－１５Ｒアゴニストのアミノ酸配列

NIZ985		
配列番号３３２	ヒトＩＬ－１５	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
配列番号３３３	ヒト可溶性ＩＬ－１５Ｒα	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSP SGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQG
XmAb306		
配列番号３３４	鎖１	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESNVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVQDLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDI AVEWESDGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
配列番号３３５	鎖２	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR/GGGGS/EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGK
N-803		
配列番号３３６	IL-15N72D	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
配列番号３３７	IL-15RαSu/Fc	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK

【表２８－２】

		AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
CYP0150		
配列番号３３８	ヒトＩＬ－１５	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
配列番号３３９		NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEKK NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
配列番号３４０	ヒトＩＬ－１５Ｒα ｓｕｓｈｉ及びヒンジドメイン	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPP
BJ-001		
配列番号３４１	腫瘍標的化ＩＬ－１５／ＩＬ－１５Ｒα－Ｆｃ	ACDCRGDCFCGGGGCGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKA GTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVSGGSGGGGSGGGSGGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDV HPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

【２６５８】

２．ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集団を単独で、または本明細書に開示されるＩＬ－１５Ｒアゴニストとの併用による治療を含んでもよく、ＴＩＬ、ＩＬ－１５Ｒアゴニスト、ならびに１つ以上のＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【２６５９】

プログラム死１（ＰＤ－１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される２８８アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイ

ント受容体タンパク質である。ＣＤ２７９としても知られるＰＤ－１は、ＣＤ２８ファミリーに属し、ヒトでは第２染色体上のＰｄｃｄ１遺伝子によってコードされる。ＰＤ－１は、１つの免疫グロブリン（Ｉｇ）スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ＩＴＩＭ）及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ（ＩＴＳＭ）を含む細胞内ドメインからなる。ＰＤ－１とそのリガンド（ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２）は、Ｋｅｉｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８，２６，６７７－７０４に記載されているように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。ＰＤ－１は、Ｔ細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。ＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１またはＣＤ２７４としても知られる）及びＰＤ－Ｌ２（Ｂ７－ＤＣまたはＣＤ２７３としても知られる）は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、ＰＤ－１を発現する活性化Ｔ細胞が遭遇する可能性があり、Ｔ細胞の免疫抑制につながる。ＰＤ－Ｌ１は、ヒト第９染色体上のＣｄ２７４遺伝子によってコードされる２９０アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Ｔｏｐａｌｉａｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎ．Ｅｎｇ．Ｊ．Ｍｅｄ．２０１２，３６６，２４４３－５４に記載されるものなどの最近の臨床研究で実証されているように、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤の使用による、ＰＤ－１とそのリガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２との間の相互作用をブロックすることで、免疫耐性を克服することができる。ＰＤ－Ｌ１は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、ＰＤ－Ｌ２は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される。Ｔ細胞（活性化後にＰＤ－１を誘導的に発現する）に加えて、ＰＤ－１は、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。

【２６６０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－１遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－１阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－１阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－１阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２６６１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－１との結合について競合し、及び／またはＰＤ－１上のエピトープに結合する。

【２６６２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約２０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－１に約１０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【２６６３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約７．５×１０^{5}　１／

Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約７．５×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約８×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約８．５×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約９×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約９．５×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約１×１０^{6}　１／Ｍ・ｓ以上のｋａｓｓｏｃで結合するものである。

【２６６４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ヒトＰＤ－１に約２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．８×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、ヒトＰＤ－１に約２．９×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合する、またはヒトＰＤ－１に約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋｄｉｓｓｏｃで結合するものである。

【２６６５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【２６６６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＯＰＤＩＶＯとして市販されている）、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ニボルマブは、ＰＤ－１受容体を遮断する完全ヒトＩｇＧ４抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－１抗体は、免疫グロブリンＧ４カッパ、抗（ヒトＣＤ２７４）抗体である。ニボルマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号９４６４１４－９４－４が割り当てられており、５Ｃ４、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ－１１０６、及びＯＮＯ－４５３８としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第８，００８，４４９号及び国際特許公開第ＷＯ２００６／１２１１６８号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１４，２，８４６－５６、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、及びＷｅｂｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２０１３，３１，４３１１－４３１８に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を

、表１８に示す。ニボルマブは、２２～９６、１４０～１９６、２５４～３１４、３６０～４１８、２２’’～９６’’、１４０’’～１９６’’、２５４’’～３１４’’、及び３６０’’～４１８’’に重鎖内ジスルフィド結合、２３’～８８’、１３４’～１９４’、２３’’’～８８’’’及び１３４’’’～１９４’’’に軽鎖内ジスルフィド結合、１２７～２１４’、１２７’’～２１４’’’に重鎖－軽鎖間ジスルフィド結合、２１９～２１９’’及び２２２～２２２’’に重鎖－重鎖間ジスルフィド結合、２９０、２９０’’にＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　８４．４）を有する。

【２６６７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１５８によって与えられる重鎖及び配列番号１５９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１５８及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号４６３及び配列番号１５９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２６６８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１６０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１６１に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６０及び配列番号１６１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２６６９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６２、配列番号１６３、及び配列番号１６４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１６５、配列番号１６６、及び配列番号１６７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【２６７０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一

性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む抗ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ニボルマブである。

【２６７１】

【表２９】

表１８．ニボルマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１５８ ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 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
配列番号１５９ ニボルマブ軽鎖	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
配列番号１６０ ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
配列番号１６１ ニボルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
配列番号１６２ ニボルマブ重鎖ＣＤＲ１	NSGMH	5
配列番号１６３ ニボルマブ重鎖ＣＤＲ２	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
配列番号１６４ ニボルマブ重鎖ＣＤＲ３	NDDY	4
配列番号１６５ ニボルマブ軽鎖ＣＤＲ１	RASQSVSSYL A	11
配列番号１６６ ニボルマブ軽鎖ＣＤＲ２	DASNRAT	7
配列番号１６７ ニボルマブ軽鎖ＣＤＲ３	QQSSNWPRT	9

【２６７２】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６７３】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６７４】
いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６７５】
いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、約１ｍｇ／ｋｇ、続いてイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを同じ日に３週間に４回、次いで２４０ｍｇを２週間、または４８０ｍｇを４週間に投与される。

【２６７６】
いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与され

る。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６７７】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇまたは４週間毎に４８０ｍｇ投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６７８】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６７９】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、３週間毎に約３６０ｍｇで、６週間毎に１ｍｇ／ｋｇのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８０】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間に４回、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与さ

れる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間に４回、次いで２４０ｍｇを２週間毎、４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８１】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的なホジキンリンパ腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的なホジキンリンパ腫を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的なホジキンリンパ腫を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８２】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８３】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８４】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び４０ｋｇ以上の小児患者における２週間毎に約２４０ｍｇで高頻度マイクロサテ

ライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び４０ｋｇ以上の小児患者における４週間毎に約４８０ｍｇで高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８５】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、４０ｋｇ未満の小児患者における２週間毎に約３ｍｇ／ｋｇで高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び４０ｋｇ以上の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間に４回、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び４０ｋｇ以上の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために約３ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ１ｍｇ／ｋｇを３週間に４回、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８６】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間に４回、次いで２４０ｍｇを２週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間に４回、次いで４８０ｍｇを４週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８７】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、２週間毎に約２４０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、４週間毎に約４８０ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの

実施形態では、ニボルマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６８８】

他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｍｅｒｃｋ＆Ｃｏ．，Ｉｎｃ（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ，ＵＳＡ）からＫＥＹＴＲＵＤＡとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、コンジュゲート、もしくはバリアントを含む。ペムブロリズマブには、ＣＡＳ登録番号１３７４８５３－９１－４が割り当てられており、ラムブロリズマブ、ＭＫ－３４７５、及びＳＣＨ－９００４７５としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトタンパク質ＰＤＣＤ１（プログラム細胞死１））（ヒト－ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト－ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリンＧ４、抗（ヒトプログラム細胞死１）；ヒト化マウスモノクローナルκ軽鎖二量体（２２６－２２６′′：２２９－２２９′′）－ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル［２２８－Ｌ－プロリン（Ｈ１０－Ｓ＞Ｐ）］γ４重鎖（１３４－２１８′）－ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第ＷＯ２００８／１５６７１２Ａ１号、米国特許第８，３５４，５０９号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１０／０２６６６１７Ａ１号、同第ＵＳ２０１３／０１０８６５１Ａ１号、及び同第ＵＳ２０１３／０１０９８４３Ａ２号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Ｆｕｅｒｓｔ，Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｔｉｍｅｓ，２０１４，３６，３５－３６、Ｒｏｂｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ，２０１４，３８４，１１０９－１７、及びＴｈｏｍａｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２０１４，１４，１０６１－１０６４に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を、表１９に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－９２′、２３′′′－９２′′′、１３４－２１８′、１３４′′－２１８′′′、１３８′－１９８′、１３８′′′－１９８′′′、１４７－２０３、１４７′′－２０３′′、２２６－２２６′′、２２９－２２９′′、２６１－３２１、２６１′′－３２１′′、３６７－４２５、及び３６７′′－４２５′′、ならびにグリコシル化部位（Ｎ）：Ａｓｎ－２９７及びＡｓｎ－２９７′′を含む。ペムブロリズマブは、Ｆｃ領域に安定化Ｓ２２８Ｐ変異を有するＩｇＧ４／カッパアイソタイプであり、この変異をＩｇＧ４ヒンジ領域に挿入すると、ＩｇＧ４抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のＦｃドメイン内のＡｓｎ２９７で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ１４９ｋＤａになる。ペムブロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォーム（Ｇ０Ｆ）である。

【２６８９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、配列番号１６８によって示される重鎖及び配列番号１６９によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６

８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１６８及び配列番号１６９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２６９０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１７０に示される配列を含み、ＰＤ－１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１７１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７０及び配列番号１７１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２６９１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７２、配列番号１７３、及び配列番号１７４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１７５、配列番号１７６、及び配列番号１７７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－１上の同じエピトープに結合する。

【２６９２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－１抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－１抗体であり、抗ＰＤ－１抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。抗ＰＤ－１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ペムブロリズマブである。

【２６９３】

【表３０】

表１９．ペムブロリズマブに関連するＰＤ－１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１６８ ペムブロリズマブ 重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 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
配列番号１６９ ペムブロリズマブ 軽鎖	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
配列番号１７０ ペムブロリズマブ 可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS	60 120
配列番号１７１ ペムブロリズマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号１７２ ペムブロリズマブ重鎖ＣＤＲ１	NYYMY	5
配列番号１７３ ペムブロリズマブ 重鎖ＣＤＲ２	GINPSNGGTN FNEKFK	16
配列番号１７４ ペムブロリズマブ 重鎖ＣＤＲ３	RDYRFDMGFD Y	11
配列番号１７５ ペムブロリズマブ軽鎖ＣＤＲ１	RASKGVSTSG YSYLH	15
配列番号１７６ ペムブロリズマブ 軽鎖ＣＤＲ２	LASYLES	7
配列番号１７７ ペムブロリズマブ軽鎖ＣＤＲ３	QHSRDLPLT	9

【２６９４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６９５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６９６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６９７】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６９８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＮＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２６９９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＳＣＬＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実

施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７００】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＮＳＣＣ治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０１】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的なホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的なホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的なホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）または原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＣＬ）を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ癌を治療

するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０４】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損結腸直腸癌（ｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲ　ＣＲＣを治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０５】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０６】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０７】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペ

ムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０８】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（ＨＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＨＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７０９】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（ＭＣＣ）を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＭＣＣを治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１０】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（ＲＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＲＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで、１日に２回の経口でのアキシチニブ５ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１１】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内

膜癌を治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで、ＭＳＩ－ＨまたはｄＭＭＲではない腫瘍の場合、１日に１回の経口でのレンバチニブ２０ｍｇとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１２】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高腫瘍変異負荷（ＴＭＢ－Ｈ）癌を治療するために、成人の場合、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、成人の場合、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＭＢ－Ｈ癌を治療するために、小児の場合、３週間毎に約２ｍｇ／ｋｇ（最大２００ｍｇ）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１３】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌（ｃＳＣＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ｃＳＣＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１４】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（ＴＮＢＣ）を治療するために、３週間毎に約２００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、ＴＮＢＣを治療するために、６週間毎に約４００ｍｇで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１５】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び６週間毎に４００ｍｇの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、３、４、または５日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、ＩＬ－２投与後１、２、または３日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、

３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【２７１６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、抗ｍ－ＰＤ－１クローンＪ４３（カタログ番号ＢＥ００３３－２）及びＲＭＰ１－１４（カタログ番号ＢＥ０１４６）（ＢｉｏＸ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ ＵＳＡ）などの市販の抗ＰＤ－１モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－１抗体が、当業者に知られている。

【２７１７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，３５４，５０９号または米国特許出願公開第２０１０／０２６６６１７ Ａ１号、同第２０１３／０１０８６５１Ａ１号、同第２０１３／０１０９８４３ Ａ２号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，２８７，８５６号、同第８，５８０，２４７号、及び同第８，１６８，７５７号、ならびに米国特許出願公開第２００９／００２８８５７ Ａ１号、同第２０１０／０２８５０１３ Ａ１号、同第２０１３／００２２６００ Ａ１号、及び同第２０１１／０００８３６９ Ａ１号に記載されている抗ＰＤ－１抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，７３５，５５３Ｂ１号に開示されている抗ＰＤ－１抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、ＣＴ－０１１としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第８，６８６，１１９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２７１８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、米国特許第８，９０７，０５３号、同第９，０９６，６４２号、及び同第９，０４４，４４２号、ならびに米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／００８７５８１号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第２０１５／００７３０２４号に記載されるものなどの１，２，４－オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／００７３０４２号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第ＵＳ２０１５／０１２５４９１号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３３３０１号に記載されるものなどの１，３，４－オキサジアゾール及び１，３，４－チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第ＷＯ２０１５／０３６９２７号及びＷＯ２０１５／０４４９０号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０２９４８９８号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－１阻害剤は、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ，Ｉｎｃ．から市販されているセミプリマブである。

【２７１９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶

媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２７２０】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、抗体（すなわち、抗ＰＤ－１抗体）、Ｆａｂ断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２との結合について競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２上のエピトープに結合する。

【２７２１】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ１阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ２受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ１と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ１に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ２受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ１受容体に結合する。

【２７２２】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるＰＤ－Ｌ２阻害剤は、化合物が、ＰＤ－Ｌ１受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でＰＤ－Ｌ２と結合または相互作用するという点で、ＰＤ－Ｌ２に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、ＰＤ－Ｌ１受容体に対するより少なくとも約２倍高い濃度、約３倍高い濃度、約５倍高い濃度、約１０倍高い濃度、約２０倍高い濃度、約３０倍高い濃度、約５０倍高い濃度、約１００倍高い濃度、約２００倍高い濃度、約３００倍高い濃度、または約５００倍高い濃度である結合定数でＰＤ－Ｌ２受容体に結合する。

【２７２３】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はＰＤ－Ｌ１を発現し、Ｔ細胞はＰＤ－１を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるＰＤ－Ｌ１の発現は、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、ＰＤ－Ｌ１を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、ＴＩＬと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体の組み合わせを含むことができる。ＰＤ－１及びＰＤ－Ｌ１抗体とＴＩＬとの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

【２７２４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１００ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約６０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約５０ｐＭ以下のＫＤで結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約４０ｐＭ以下のＫＤで結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約３０ｐＭ以下のＫＤで結合するものである。

【２７２５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ

１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約７．５×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約８．５×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約９．５×１０^{5}　１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に約１×１０^{6}　１／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$で結合するものである。

【２７２６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．１×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－１に約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、ヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合する、またはヒトＰＤ－Ｌ１もしくはＰＤ－Ｌ２に約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$で結合するものである。

【２７２７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２阻害剤は、約１０ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約９ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約８ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約７ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約６ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約５ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約４ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約３ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、約２ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－１へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断もしくは阻害し、またはヒトＰＤ－１を遮断し、または約１ｎＭ以下のＩＣ５０でのヒトＰＤ－へのヒトＰＤ－Ｌ１もしくはヒトＰＤ－Ｌ２の結合を遮断するものである。

【２７２８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＥＤＩ４７３６としても知られるデュルバルマブ（これは、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ　ｐｌｃ．の子会社であるＭｅｄｉｍｍｕｎｅ，ＬＬＣ（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）から市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，７７９，１０８号または米国特許出願公開第２０１３／００３４５５９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Ｐａｇｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．，２０１４，６５，１８５－２０２、Ｂｒａｈｍｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４，３２，５ｓ（補充、要約８０２１）、及びＭｃＤｅｒｍｏｔｔ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　Ｒｅｖ．，２０１４，４０，１０５６－６４に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第８，７７９，１０８号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を、表２０に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、２２－９６、２２′′－９６′′、２３′－８９′、２３′′′－８９′′′、１

３５′－１９５′、１３５′′′－１９５′′′、１４８－２０４、１４８′′－２０４′′、２１５′－２２４、２１５′′′－２２４′′′、２３０－２３０′′、２３３－２３３′′、２６５－３２５、２６５′′－３２５′′、３７１－４２９、及び３７１′′－４２９′におけるジスルフィド結合、ならびにＡｓｎ－３０１及びＡｓｎ－３０１′′におけるＮ－グリコシル化部位を含む。

【２７２９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１７８によって与えられる重鎖及び配列番号１７９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１７８及び配列番号１７９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２７３０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号１８０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号１８１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８０及び配列番号１８１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２７３１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８２、配列番号１８３、及び配列番号１８４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１８５、配列番号１８６、及び配列番号１８７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２７３２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、デュルバルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１０

０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、デュルバルマブである。

【２７３３】

【表３１】

表２０．デュルバルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１７８ デュルバルマブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 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
配列番号１７９ デュルバルマブ軽鎖	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
配列番号１８０ デュルバルマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
配列番号１８１ デュルバルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108
配列番号１８２ デュルバルマブ重鎖ＣＤＲ１	RYWMS	5
配列番号１８３ デュルバルマブ重鎖ＣＤＲ２	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
配列番号１８４ デュルバルマブ重鎖ＣＤＲ３	EGGWFGELAF DY	12
配列番号１８５ デュルバルマブ軽鎖ＣＤＲ１	RASQRVSSSY LA	12
配列番号１８６ デュルバルマブ軽鎖ＣＤＲ２	DASSRAT	7
配列番号１８７ デュルバルマブ軽鎖ＣＤＲ３	QQYGSLPWT	9

【２７３４】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＳＢ００１０７１８Ｃ（ＭｅｒｃｋＫＧａＡ／ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏから市販されている）としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を、表２１に示す。アベルマブは、２２～９６、１４７～２０３、２６４～３２４、３７０～４２８、２２’’～９６’’、１４７’’～２０３’’、２６４’’～３２４’’、及び３７０’’～４２における重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３～Ｃ１０４）、２２’～９０’、１３８’～１９７’、２２’’’～９０’’’、及び１３８’’’～１９７’’’における軽鎖内ジスルフィド結合（Ｃ～Ｃ１０４）、２２３～２１５’及び２２３’’～２１５’’における重鎖－軽鎖間ジスルフィド結合（ｈ５～ＣＬ１２６）、２２９～２２９’’及び２３２～２３２’’における重鎖－重鎖間ジスルフィド結合（ｈ１１、ｈ１４）、３００、３００’’におけるＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．４）、フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン、及び４５０及び４５０’におけるＨ　ＣＨＳ　Ｋ２　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【２７３５】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１８８によって示される重鎖及び配列番号１８９によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２７３６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１９０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１９１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２７３７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９２、配列番号１９３、及び配列番号１９４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９５、配列番号１９６、及び配列番号１９７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び

ＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２７３８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アベルマブである。

【２７３９】

【表３２】

表２１．アベルマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１８８ アベルマブ 重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 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
配列番号１８９ アベルマブ 軽鎖	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
配列番号１９０ アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号１９１ アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
配列番号１９２ アベルマブ 重鎖ＣＤＲ１	SYIMM	5
配列番号１９３ アベルマブ 重鎖ＣＤＲ２	SIYPSGGITF YADTVKG	17
配列番号１９４ アベルマブ 重鎖ＣＤＲ３	IKLGTVTTVD Y	11
配列番号１９５ アベルマブ 軽鎖ＣＤＲ１	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号１９６ アベルマブ 軽鎖ＣＤＲ２	DVSNRPS	7
配列番号１９７ アベルマブ 軽鎖ＣＤＲ３	SSYTSSSTRV	10

【２７４０】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＭＰＤＬ３２８０ＡまたはＲＧ７４４６としても知られるアテゾリズマブ（Ｒｏｃｈｅ　Ｈｏｌｄｉｎｇ　ＡＧ（Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）の子会社であるＧｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．からＴＥＣＥＮＴＲＩＱとして市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許第８，２１７，１４９号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第２０１０／０２０３０５６Ａ１号、同第２０１３／００４５２００Ａ１号、同第２０１３／００４５２０１Ａ１号、同第２０１３／００４５２０２Ａ１号、または同第２０１４／００６５１３５Ａ１号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第８，２１７，１４９号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を、表２２に示す。アテゾリズマブは、２２～９６、１４５～２０１、２６２～３２２、３６８～４２６、２２’’～９６’’、１４５’’～２０１’’、２６２’’～３２２’’、及び３６～４２６’’に重鎖内ジスルフィド結合（Ｃ２３～Ｃ１０４）、２３’～８８’、１３４’～１９４’、２３’’’～８８’’’、及び１３４’’’～１９４’’’に軽鎖内ジスルフィド結合（ＣＣ１０４）、２２１～２１４’及び２２１’’～２１４’’’に重鎖－軽鎖間ジスルフィド結合

（ｈ５～ＣＬ１２６）、２２７～２２７’’及び２３０～２３０’’に重鎖－重鎖間ジスルフィド結合（ｈ１１、ｈ１４）、及び２９８及び２９８’にＮ－グリコシル化部位（Ｈ　ＣＨ２　Ｎ８４．４＞Ａ）を有する。

【２７４１】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１９８によって示される重鎖及び配列番号１９９によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９８及び配列番号１９９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２７４２】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２００に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２０１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２００及び配列番号２０１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２７４３】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号２０２、配列番号２０３、及び配列番号２０４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２０５、配列番号２０６、及び配列番号２０７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２７４４】

いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後

修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＰＤ－Ｌ１抗体であり、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、アテゾリズマブである。

【２７４５】

【表３３】

表２２．アテゾリズマブに関連するＰＤ－Ｌ１阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号１９８ アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 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
配列番号１９９ アテゾリズマブ 軽鎖	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
配列番号２００ アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA	60 118
配列番号２０１ アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号２０２ アテゾリズマブ 重鎖ＣＤＲ１	GFTFSDSWIH	10
配列番号２０３ アテゾリズマブ 重鎖ＣＤＲ２	AWISPYGGST YYADSVKG	18
配列番号２０４ アテゾリズマブ 重鎖ＣＤＲ３	RHWPGGFDY	9
配列番号２０５ アテゾリズマブ 軽鎖ＣＤＲ１	RASQDVSTAV A	11
配列番号２０６ アテゾリズマブ 軽鎖ＣＤＲ２	SASFLYS	7
配列番号２０７アテゾリズマブ軽鎖ＣＤＲ３	QQYLYHPAT	9

【２７４６】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４／０３４１９１７Ａ１号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、ＰＤ－Ｌ１への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＢＭＳ－

９３５５５９としても知られるＭＤＸ－１１０５であり、これは米国特許第ＵＳ７，９４３，７４３号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第ＵＳ７，９４３，７４３号に開示されている抗ＰＤ－Ｌ１抗体から選択される。

【２７４７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、ＩＮＶＩＶＯＭＡＢ抗ｍ－ＰＤ－Ｌ１クローン１０Ｆ．９Ｇ２（カタログ番号ＢＥ０１０１、Ｂｉｏ Ｘ Ｃｅｌｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｅｓｔ Ｌｅｂａｎｏｎ，ＮＨ，ＵＳＡ）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ＡＦＦＹＭＥＴＲＩＸ ＥＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ（ＭＩＨ１）などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、当業者に知られている。

【２７４８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ２阻害剤は、ＢＩＯＬＥＧＥＮＤ ２４Ｆ．１０Ｃ１２マウスＩｇＧ２ａ、カッパアイソタイプ（カタログ番号３２９６０２ Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、ＳＩＧＭＡ抗ＰＤ－Ｌ２抗体（カタログ番号ＳＡＢ３５００３９５，Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、または当業者に知られている他の市販のＰＤ－Ｌ２抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【２７４９】

３．ＣＴＬＡ－４阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるＴＩＬ療法は、治療的ＴＩＬ集団を単独で、または本明細書に開示されるＩＬ－１５Ｒアゴニストとの併用による治療を含んでもよく、ＴＩＬ、ＩＬ－１５Ｒアゴニスト、ならびに１つ以上のＣＴＬＡ－４阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【２７５０】

細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーＴ細胞の表面で発現する。ＣＴＬＡ－４は、ＣＤ２８依存性Ｔ細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。Ｔ細胞共刺激タンパク質ＣＤ２８と同様に、ＣＴＬＡ－４結合抗原は、細胞上でＣＤ８０及びＣＤ８６を提示する。ＣＴＬＡ－４は抑制シグナルをＴ細胞に伝達し、ＣＤ２８は刺激シグナルを伝達する。ヒトＣＴＬＡ－４に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（ＷＯ０１／１４４２４及びＷＯ００／３７５０４）。イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０）及びトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトＣＴＬＡ－４モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が、臨床試験で研究されている。

【２７５１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、当技術分野で知られている任意のＣＴＬＡ－４阻害剤またはＣＴＬＡ－４遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるＣＴＬＡ－４阻害剤または遮断剤のうちの１つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、ＣＴＬＡ－４阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリアント、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、ＣＴＬＡ－４阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【２７５２】

本発明の方法で使用するための好適なＣＴＬＡ－４阻害剤には、抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒト抗ＣＴＬＡ－４抗体、マウス抗ＣＴＬＡ－４抗体、哺乳動物抗ＣＴＬＡ－４抗体、ヒ

ト化抗ＣＴＬＡ－４抗体、モノクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、ポリクローナル抗ＣＴＬＡ－４抗体、キメラ抗ＣＴＬＡ－４抗体、ＭＤＸ－０１０（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗ＣＤ２８抗体、抗ＣＴＬＡ－４アドネクチン、抗ＣＴＬＡ－４ドメイン抗体、一本鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、重鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、軽鎖抗ＣＴＬＡ－４断片、共刺激経路を刺激するＣＴＬＡ－４の阻害剤、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００１／０１４４２４号に開示される抗体、ＰＣＴ公開第ＷＯ２００４／０３５６０７号に開示される抗体、米国特許出願公開第２００５／０２０１９９４号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第ＥＰ１２１２４２２Ｂ１号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号に記載されており、これらの各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で使用することができる他の抗ＣＴＬＡ－４抗体には、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５（１７）：１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２２（１４５）：Ａｂｓｔｒａｃｔ Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、Ｍｏｋｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５８：５３０１－５３０４（１９９８）、ならびに米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【２７５３】

さらなるＣＴＬＡ－４阻害剤には、ＣＤ２８抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、ＣＴＬＡ－４がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してＴ細胞応答を増強すること、Ｂ７がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、Ｂ７が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８０がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８０が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、ＣＤ８６がＣＤ２８及び／またはＣＴＬＡ－４と結合する能力を破壊すること、ＣＤ８６が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーの中でもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーの中でもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向する抗体、共刺激経路の他のメンバーの中でもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーの中でもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４に指向するアドネクチン、他のＣＴＬＡ－４阻害剤の中でも、共刺激経路の他のメンバーの中でもＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＴＬＡ－４のＲＮＡｉ阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）が必ず含まれる。

【２７５４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、約10^{-6}Ｍ以下、約10^{-7}Ｍ以下、約10^{-8}Ｍ以下、約10^{-9}Ｍ以下、約10^{-10}Ｍ以下、約10^{-11}Ｍ以下、約10^{-12}Ｍ以下の、例えば、約10^{-13}Ｍ～10^{-16}Ｍの間、またはエンドポイントとして前述の値のうちの任意の２つを有する任意の範囲内の、K_dでＣＴＬＡ－４に結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのK_dの１０倍以下のK_dでＣＴＬＡ－４に結合する。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低いか、または最大１００倍低い）のK_dでＣＴＬＡ－４と結合する。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを

使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介阻害より１０倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、ＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のＣＴＬＡ－４阻害剤による阻害のＩＣ５０値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれＣＤ８０またはＣＤ８６とのＣＴＬＡ－４結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大１０倍低い、または最大１００倍低い）である。

【２７５５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％、例えば、５０％～７５％、７５％～９０％、または９０％～１００％の間でＣＴＬＡ－４のＣＤ８０、ＣＤ８６、またはその両方との結合を減少させることにより、ＣＴＬＡ－４の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。関心対象の薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、関心対象の薬剤、例えば、ＣＴＬＡ－４経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（またはわずかな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的システム（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的システムは、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的システムは、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

【２７５６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｃｏ．からＹｅｒｖｏｙとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトＩｇＧ　１κ抗体である、抗ＣＴＬＡ－４抗体を指す。イピリムマブは、そのＣＡＳ登録番号４７７２０２－００－９及びＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号で参照することもでき、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体１０ＤＩとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号２１１を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号２１０を含む重鎖可変領域を有する）を含む。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び１つ以上の希釈剤、ビヒクル、または賦形剤を含有するすべての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、国際特許出願公開第ＷＯ２００７／６７９５９号に記載されている。イピリムマブは、静脈内（ＩＶ）投与され得る。

【２７５７】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２０８によって与えられる重鎖及び配列番号２０９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各

々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２０８及び配列番号２０９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２７５８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２１０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２１１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１０及び配列番号２１１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【２７５９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１２、配列番号２１３、及び配列番号２１４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２１５、配列番号２１６、及び配列番号２１７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２７６０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を、表２３に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、イピリムマブである。

【２７６１】

【表３４】

表２３．イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号２０８ イピリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
配列番号２０９ イピリムマブ軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
配列番号２１０ イピリムマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号２１１ イピリムマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号２１２ イピリムマブ重鎖 ＣＤＲ１	GFTFSSYT 8
配列番号２１３ イピリムマブ重鎖 ＣＤＲ２	TFISYDGNNK 10
配列番号２１４ イピリムマブ重鎖 ＣＤＲ３	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号２１５ イピリムマブ軽鎖 ＣＤＲ１	QSVGSSY 7
配列番号２１６ イピリムマブ軽鎖 ＣＤＲ２	GAF 3
配列番号２１７ イピリムマブ軽鎖 ＣＤＲ３	QQYGSSPWT 9

【２７６２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、

約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６５】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、３週間毎に約　ｍｇ／ｋｇで最大４用量投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６６】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、３週間毎に約１０ｍｇ／ｋｇで４回投与され、その後１２週間毎に１０ｍｇ／ｋｇで最大３年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６７】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約１ｍｇ／ｋｇで投与され、すぐ後に続いて同じ日にニボルマブ３ｍｇ／ｋｇを３週間に４回投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与され得る。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６８】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌を治療するために、３０分間にわたって約１ｍｇ／ｋｇを静脈内投与され、すぐ後に続いて同じ日に３０分間にわたってニボルマブ約３ｍｇ／ｋｇを３週間に４回投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（ＭＳＩ－Ｈ）またはミスマッチ修復機能欠損（ｄＭＭＲ）転移性結腸直腸癌の標準的な投薬レジメンに従って推奨されるように、ニボルマブを単剤として投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、

イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７６９】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、３０分間にわたって約３ｍｇ／ｋｇを静脈内投与され、すぐ後に続いて同じ日に３０分間にわたってニボルマブ約１ｍｇ／ｋｇを３週間に４回投与される。いくつかの実施形態では、４用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って、ニボルマブを単剤として投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７７０】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、２週間毎に３ｍｇ／ｋｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブ及び２サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７７１】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、６週間毎に約１ｍｇ／ｋｇで、３週間毎に３６０ｍｇのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７７２】

トレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６としても知られる）は、完全ヒトＩｇＧ２モノクローナル抗体であり、ＣＡＳ番号７４５０１３－５９－６を有する。トレメリムマブは、米国特許第６，６８２，７３６号（参照により本明細書に組み込まれる）において抗体１１．２．１として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ表２１８及び２１９に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、０．０１及び１５ｍｇ／ｋｇの用量範囲で４週間または１２週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり５～２００ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり１０～１５０ｍｇ／用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約１０、２５、３７．５、４０、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、または２００ｍｇ／用量である。

【２７７３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２１８によって示される重鎖及び配列番号２１９によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列を有する重

鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２１８及び配列番号２１９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２７７４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２２０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２２１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２０及び配列番号２２１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２７７５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２２、配列番号２２３、及び配列番号２２４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２２５、配列番号２２６、及び配列番号２２７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２７７６】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を、表２４に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認

可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、トレメリムマブである。

【２７７７】

【表３５】

表２４．トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号２１８ トレメリムマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号２１９ トレメリムマブ軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号２２０ トレメリムマブ可変重鎖	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH	60 120 167
配列番号２２１ トレメリムマブ可変軽鎖	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKV	60 120 139
配列番号２２２ トレメリムマブ重鎖ＣＤＲ１	GFTFSSYGMH	10
配列番号２２３ トレメリムマブ重鎖ＣＤＲ２	VIWYDGSNKY YADSV	15
配列番号２２４ トレメリムマブ重鎖ＣＤＲ３	DPRGATLYYY YYGMDV	16
配列番号２２５ トレメリムマブ軽鎖ＣＤＲ１	RASQSINSYL D	11
配列番号２２６ トレメリムマブ軽鎖ＣＤＲ２	AASSLQS	7
配列番号２２７ トレメリムマブ軽鎖ＣＤＲ３	QQYYSTPFT	9

【２７７８】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約０．５ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約３．５ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、約４．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約５．５ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約６．５ｍｇ／ｋｇ、約７ｍｇ／ｋｇ、約７．５ｍｇ／ｋｇ、約８ｍｇ／

ｋｇ、約８．５ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約９．５ｍｇ／ｋｇ、または約１０ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７７９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ～約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約２００ｍｇ、約２２０ｍｇ、約２４０ｍｇ、約２６０ｍｇ、約２８０ｍｇ、約３００ｍｇ、約３２０ｍｇ、約３４０ｍｇ、約３６０ｍｇ、約３８０ｍｇ、約４００ｍｇ、約４２０ｍｇ、約４４０ｍｇ、約４６０ｍｇ、約４８０ｍｇ、または約５００ｍｇの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７８０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、２週間毎、３週間毎、４週間毎、５週間毎、または６週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、３、４、または５週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前１、２、または３週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【２７８１】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、Ａｇｅｎｕｓからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリアントである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ（ＣＡＳ）登録番号２１４８３２１－６９－９が割り当てられており、ＡＧＥＮ１８８４としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第１０，１４４，７７９号及び米国特許出願公開第ＵＳ２０２０／００２４３５０Ａ１号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【２７８２】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、配列番号２２８によって示される重鎖及び配列番号２２９によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリアント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２２８及び配列番号２２９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２７８３】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤重鎖可変領域（V_H）は、配列番号２３０に示される配列を含み、ＣＴＬＡ－４阻害剤軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号２３１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号２３０及び配列番号２３１に示される配列と少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【２７８４】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、それぞれ、配列番号２３１、配列番号２３３、及び配列番号２３４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号２３５、配列番号２３６、及び配列番号２３７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＣＴＬＡ－４上の同じエピトープに結合する。

【２７８５】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認されたＣＴＬＡ－４バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的生成物のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＣＴＬＡ－４抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を、表２５に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗ＣＴＬＡ－４抗体であり、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、参照医薬品または参照生物学的生成物の配合物とは異なる配合物で提供され、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。抗ＣＴＬＡ－４抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的生成物に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照生物学的生成物は、ザリフレリマブである。

【２７８６】

【表３６】

表２５．ザリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号２２８ ザリフレリマブ重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号２２９ ザリフレリマブ軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号２３０ ザリフレリマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
配列番号２３１ ザリフレリマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
配列番号２３２ ザリフレリマブ重鎖ＣＤＲ１	GFTFSSYS 8
配列番号２３３ ザリフレリマブ重鎖ＣＤＲ２	ISSSSSYI 8
配列番号２３４ ザリフレリマブ重鎖ＣＤＲ３	ARVGLMGPFD I 11
配列番号２３５ ザリフレリマブ軽鎖ＣＤＲ１	QSVSRY 6
配列番号２３６ ザリフレリマブ軽鎖ＣＤＲ２	GAS 3
配列番号２３７ ザリフレリマブ軽鎖ＣＤＲ３	QQYGSSPWT 9

【２７８７】

さらなる抗ＣＴＬＡ－４抗体の例には、ＡＧＥＮ１１８１、ＢＭＳ－９８６２１８、ＢＣＤ－１４５、ＯＮＣ－３９２、ＣＳ１００２、ＲＥＧＮ４６５９、及びＡＤＧ１１６が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【２７８８】

いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、以下の特許公開のうちのいずれかに開示される抗ＣＴＬＡ－４抗体である：ＵＳ２０１９／００４８０９６Ａ１、ＵＳ２０２０／０２２３９０７、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２０１９／０２０１３３４、ＵＳ２００５／０２０１９９４、ＥＰ１２１２４２２Ｂ１、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２０１８／２０４７６０、ＷＯ２００１／０１４４２４、ＷＯ２００４／０３５６０７、ＷＯ２００３／０８６４５９、ＷＯ２０１２／１２０１２５、ＷＯ２０００／０３７５０４、ＷＯ２００９／１００１４０、ＷＯ２００６／０９６４９、ＷＯ２００５０９２３８０、ＷＯ２００７／１２３７３７、ＷＯ２００６／０２９２１９、ＷＯ２０１０／０９７９５９７、ＷＯ２００６／１２１６８、及びＷＯ１９９７０２０５７４（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。さらなるＣＴＬＡ－４抗体は、米国特許第５，８１１，０９７号、同第５，８５５，８８７号、同第６，０５１，２２７号、及び同第６，９８４，７２０号、ＰＣＴ公開第ＷＯ０１／１４４２４号及び同第ＷＯ００／３７

５０４号、ならびに米国公開第２００２／００３９５８１号及び同第２００２／０８６０１４号、及び／または米国特許第５，９７７，３１８号、同第６，６８２，７３６号、同第７，１０９，００３号、及び同第７，１３２，２８１号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、例えば、ＷＯ９８／４２７５２、米国特許第６，６８２，７３６号及び同第６，２０７，１５６号、Ｈｕｒｗｉｔｚ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９９８，９５，１００６７－１００７１（１９９８）、Ｃａｍａｃｈｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２００４，２２，１４５（Ａｂｓｔｒａｃｔ　Ｎｏ．２５０５（２００４）（抗体ＣＰ－６７５２０６）、またはＭｏｋｙｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，１９９８，５８，５３０１－５３０４（１９９８）に開示されているものであり、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

【２７８９】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＷＯ１９９６／０４０９１５（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるＣＴＬＡ－４リガンドである。

【２７９０】

いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＣＴＬＡ－４発現の核酸阻害剤である。例えば、抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、ＰＣＴ公開第ＷＯ１９９９／０３２６１９号及び同第ＷＯ２００１／０２９０５８号、米国公開第２００３／００５１２６３号、同第２００３／００５５０２０号、同第２００３／００５６２３５号、同第２００４／２６５８３９号、同第２００５／０１００９１３号、同第２００６／００２４７９８号、同第２００８／００５０３４２号、同第２００８／００８１３７３号、同第２００８／０２４８５７６号、及び同第２００８／０５５４４３号、及び／または米国特許第６，５０６，５５９号、同第７，２８２，５６４号、同第７，５３８，０９５号、及び同第７，５６０，４３８号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、欧州特許第ＥＰ１３０９７２６号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、米国特許第７，０５６，７０４号及び同第７，０７８，１９６号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される二本鎖ＲＮＡｉ分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、ＣＴＬＡ－４阻害剤は、国際特許出願公開第ＷＯ２００４／０８１０２１号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるアプタマーである。

【２７９１】

他の実施形態では、本発明の抗ＣＴＬＡ－４　ＲＮＡｉ分子は、米国特許第５，８９８，０３１号、同第６，１０７，０９４号、同第７，４３２，２４９号、及び同第７，４３２，２５０号、ならびに欧州出願第ＥＰ０９２８２９０号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるＲＮＡ分子である。

【２７９２】

４．患者のリンパ球枯渇前処置

いくつかの実施形態では、本発明は、ＴＩＬ集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのＴＩＬ集団を含む。いくつかの実施形態では、ＴＩＬ集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日で２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）、ならびにフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日で５日間（ＴＩＬ注入の２７日前～２３日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで８時間毎に７２０，０００ＩＵ／ｋｇで静脈内的にＩＬ－２（ＰＲＯＬＥＵＫＩＮとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。特定の実施形態では、ＴＩＬ集団は、ＩＬ－２と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、ＩＬ－２は、ＴＩＬ集団の後に投与される。

【２７９３】
いくつかの実施形態では、患者は、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受ける。いくつかの実施形態では、低減された強度の骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、約２５０～７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でシクロホスファミドの投与を含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約２５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約５００ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、約７５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、３または４日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの投与に続いて、３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量でフルダラビンの投与が行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、３、４、または５日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、患者は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを受けない。

【２７９４】
実験的発見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性Ｔ細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のＴＩＬを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

【２７９５】
一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Ｇａｓｓｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１１，６０，７５－８５、Ｍｕｒａｎｓｋｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｌｉｎ．Ｐｒａｃｔ．Ｏｎｃｏｌ．，２００６，３，６６８－６８１、Ｄｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８，２６，５２３３－５２３９、及びＤｕｄｌｅｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００５，２３，２３４６－２３５７に記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【２７９６】
いくつかの実施形態では、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、１０ｍｇ／ｋｇ／日、１５ｍｇ／ｋｇ／日、２０ｍｇ／ｋｇ／日、２５ｍｇ／ｋｇ／日、３０ｍｇ／ｋｇ／日、３５ｍｇ／ｋｇ／日、４０ｍｇ／ｋｇ／日、または４５ｍｇ／ｋｇ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間投与される。

【２７９７】
いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、１μｇ／ｍＬの濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、１日、２日、３日、４日、５日、６日、または７日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^2／日、１５０ｍｇ／ｍ^2／日、１７５ｍｇ／ｍ^2／日、２００ｍｇ／ｍ^2／日、２２５ｍｇ／ｍ^2／日、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、２７５ｍｇ／ｍ^2／日、または３００ｍｇ／ｍ^2／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すな

わち、ｉ．ｖ．）に投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４～５日間静脈内に投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間静脈内に投与される。

【２７９８】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドを一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、２５ｍｇ／ｍ^2／日で静脈内に投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^2／日で４日間にわたって静脈内に投与される。

【２７９９】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われる。

【２８００】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２８０１】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２８０２】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約５０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２８０３】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約２０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２８０４】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約４０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、フルダラビンを約１５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の２日間に投与され、リンパ球枯渇は合計５日間で行われる。

【２８０５】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与することによって行われる。

【２８０６】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、１５ｍｇ／ｋｇで投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約２時間にわたってシクロホスファミドを注入することができ（－５日目及び／または－４日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する２４時間にわたって残りの２２時間で３ｍｇ／ｋｇ／時間の速度で注入することができる。

【２８０７】
いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与した翌日から開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【２８０８】
いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第３のＴＩＬ集団を患者に投与したのと同じ日に開始するＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。
【２８０９】
いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、５日間の前処置治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、－５日から－１日、または０日から４日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－４日目（すなわち、０日目及び１日目）に６０ｍｇ／ｋｇの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、－５日目及び－１日目（すなわち、０～４日目）に２５ｍｇ／ｍ^{2}の静脈内フルダラビンをさらに含む。
【２８１０】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。
【２８１１】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間投与するステップを含む。
【２８１２】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【２８１３】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【２８１４】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で１日間投与するステップを含む。
【２８１５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【２８１６】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で、フルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間投与し、続いてフルダラビンを２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で３日間投与するステップを含む。
【２８１７】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２６に従って投与される。

【２８１８】

【表３７】

表２６．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２８１９】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２７に従って投与される。

【２８２０】

【表３８】

表２７．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【２８２１】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２８に従って投与される。

【２８２２】

【表３９】

表２８．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【２８２３】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表２９に従って投与される。

【２８２４】

【表４０】

表２９．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【２８２５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３０に従って投与される。
【２８２６】
【表４１】

表３０．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２８２７】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３１に従って投与される。
【２８２８】
【表４２】

表３１．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【２８２９】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３２に従って投与される。
【２８３０】

【表４３】

表３２．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 30mg/m^2/日	X	X	X					
TIL 注入				X				

【２８３１】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３に従って投与される。
【２８３２】
【表４４】

表３３．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m^2/日			X	X	X					
TIL 注入						X				

【２８３３】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３Ａに従って投与される。
【２８３４】
【表４５】

表３３Ａ．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m^2/日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【２８３５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３Ｂに従って投与される。
【２８３６】

【表４６】

表３３Ｂ．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X										
メスナ(必要に応じて)	X	X										
フルダラビン 25mg/m^2/日			X	X	X	X	X					
TIL 注入								X				

【２８３７】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３Ｃに従って投与される。
【２８３８】
【表４７】

表３３Ｃ．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 750mg/sq.m			X	X	X	X						
メスナ(必要に応じて)			X	X	X	X						
フルダラビン 30mg/m^2/日			X	X	X	X						
TIL 注入								X				

【２８３９】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３Ｄに従って投与される。
【２８４０】
【表４８】

表３３Ｄ．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 750mg/sq.m			X	X	X	X						
メスナ(必要に応じて)			X	X	X	X						
フルダラビン 30mg/m^2/日			X	X	X	X	X					
TIL 注入								X				

【２８４１】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表３３Ｅに従って投与される。
【２８４２】

【表４９】

表３３Ｅ．例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 750mg/sq.m				X	X	X						
メスナ(必要に応じて)				X	X	X						
フルダラビン 30mg/m^2/日				X	X	X	X					
TIL 注入								X				

【２８４３】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また本明細書に記載されるようなＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤など）の投与であり得る。
【２８４４】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入日の１日前、２日前、または３日前の経過にわたって１００ｍｇ／ｍ^{2}の総用量まで投与されるメルファランを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入日の１日前、２日前、または３日前の経過にわたって２００ｍｇ／ｍ^{2}の総用量まで投与されるメルファランを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入日の１日前、２日前、または３日前の経過にわたって１００ｍｇ／ｍ^{2}の総用量まで投与されるメルファラン、及び３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与されるフルダラビンを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入日の１日前、２日前、または３日前の経過にわたって２００ｍｇ／ｍ^{2}の総用量まで投与されるメルファラン、及び３０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で投与されるフルダラビンを含む。
【２８４５】
いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、抗ＣＤ４５抗体の投与を含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、抗ＣＤ４５抗体－薬物複合体の投与を含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、抗ＣＤ４５抗体－放射性同位体複合体の投与を含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、アパミスタマブ－^{131}Ｉの投与を含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入の２～９日前の間に２５ｍＣｉ、５０ｍＣｉ、７５ｍＣｉ、１００ｍＣｉ、１５０ｍＣｉ、または２００ｍＣｉの用量で投与されるアパミスタマブ－^{131}Ｉを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入の２～９日前の間に２５ｍＣｉ～２００ｍＣｉの用量で投与されるアパミスタマブ－^{131}Ｉを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入の４～８日前の間に５０ｍＣｉ～１５０ｍＣｉの用量で投与されるアパミスタマブ－^{131}Ｉを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入の約６日前に約７５ｍＣｉの用量で投与されるアパミスタマブ－^{131}Ｉを含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、ＴＩＬ注入の約７日前に約１００ｍＣｉの用量で投与されるアパミスタマブ－^{131}Ｉを含む。
【２８４６】
いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載のＣＣＲを発現するように遺伝子修飾されたＴＩＬ産物を含む、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であり得、また、ＴＩＬ注入の代わりに

ＭＩＬ及びＰＢＬの注入、ならびに抗ＣＤ５２抗体アレムツズマブ、またはそのバリアント、断片、抗体－薬物複合体、もしくはバイオシミラーを含む代替リンパ球枯渇レジメンの追加を含み得る。

【２８４７】

いくつかの実施形態では、スーパーアゴニストを含むＩＬ－１５Ｒアゴニストは、上記の本明細書に記載される骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメン及び／または骨髄性リンパ枯渇レジメンのいずれかと組み合わせて投与され得る。

【２８４８】

５．ＩＬ－２レジメン

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、高用量ＩＬ－２レジメンを含み、高用量ＩＬ－２レジメンは、治療的ＴＩＬ集団の治療有効分量を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントは、許容範囲まで８時間に最大１４用量にわたって、０．０３７ｍｇ／ｋｇまたは０．０４４ｍｇ／ｋｇ　ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で１５分のボーラス静脈内注入を使用して投与される。９日間の休止後、このスケジュールは、さらに１４用量、合計最大２８用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、１、２、３、４、５、または６用量で投与される。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。

【２８４９】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンを含む。デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、Ｏ’Ｄａｙ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１９９９，１７，２７５２－６１、及びＥｔｏｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　２０００，８８，１７０３－９に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、６時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}アルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアント、続いて１２時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて２４時間にわたって静脈内投与される１８×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}、続いて７２時間にわたって静脈内投与される４．５×１０^{6}ＩＵ／ｍ^{2}を含む。この治療サイクルは、２８日毎に最大４サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^{2}、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【２８５０】

いくつかの実施形態では、低減された用量のＩＬ－２レジメンは、許容範囲まで８時間毎に１５分間のボーラス静脈内注入として投与される、低減された数、例えば、１、２、３、４、もしくは５つの用量の６００，０００もしくは７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを含む。

【２８５１】

いくつかの実施形態では、患者は、ＩＬ－２レジメンを受けない。

【２８５２】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、低用量ＩＬ－２レジメンを含む。Ｄｏｍｉｎｇｕｅｚ－Ｖｉｌｌａｒ　ａｎｄ　Ｈａｆｌｅｒ，Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０００，１９，６６５－６７３、Ｈａｒｔｅｍａｎｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ　Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．２０１３，１，２９５－３０５、及びＲｏｓｅｎｚｗａｉｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．２０１９，７８，２０９－２１７（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量ＩＬ－２レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量ＩＬ－２レジメンを使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量ＩＬ－２レジメンは、２４時間当たりｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリアントを５日間の連続的注入として、その後ＩＬ－２療法なしで２～６日間、そ

の後任意選択でアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリアントを静脈内にさらに５日間、２４時間当たりｍ^{2}当たり１８×１０^{6}ＩＵの連続的注入として、その後任意選択でＩＬ－２療法なしで３週間投与することを含み、その後追加のサイクルが投与され得る。

【２８５３】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２は、最大６用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量ＩＬ－２レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に６００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に４００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に５００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に３００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に２００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大６用量まで、８～１２時間毎に１００，０００国際単位（ＩＵ）／ｋｇのアルデスロイキンの用量が使用される。

【２８５４】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４または２１日毎に、ベンペガルデスロイキン、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２８５５】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、ＴＨＯＲ－７０７、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２８５６】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＴＩＬの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーの投与を含む。ある特定の実施形態では、患者にネムバロイキンを１日、２日、４日、６日、７日、１４日または２１日毎に、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で投与される。

【２８５７】

いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、抗体骨格に移植されたＩＬ－２断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、ＩＬ－２低親和性受容体と結合する抗体－サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３を含む、重鎖可変領域（V_H）と、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３を含む軽鎖可変領域（V_L）と、V_HまたはV_LのＣＤＲに移植されたＩＬ－２分子またはその断片と、を含み、ＩＬ－２分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性Ｔ細胞よりもＴエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４、または２１日毎に、配列番号２９及び配列番号３８からなる群から選択される重鎖と、配列番号３７及び配列番号３９からな

る群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリアント、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【２８５８】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン（Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標））または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型ＩＬ－２分子よりも長い血清半減期を有する。

【２８５９】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるＴＩＬ注入は、本明細書に記載の任意のＴＩＬ組成物であってもよく、また、ＴＩＬ注入の代わりにＭＩＬ及びＰＢＬの注入、ならびに本明細書に記載のＩＬ－２レジメンの追加及び併用療法（ＰＤ－１及び／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤及び／またはＣＴＬＡ－４阻害剤など）の投与も含み得る。

【実施例】

【２８６０】

本明細書に包含される実施形態は、ここで以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【２８６１】

実施例１：ＲＥＰ前プロセス及びＲＥＰプロセスのための培地の調製

この実施例は、様々な固体腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製手順を説明する。この培地を、本出願及び実施例に記載のＴＩＬのうちのいずれかの調製に使用することができる。

【２８６２】

ＣＭ１の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、３７℃の水浴（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭ　Ｌ－グルタミン）中で温めた。濾過される容量に適した０．２μｍフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表３４に従ってＣＭ１培地を調製した。４℃で保存する。

【２８６３】

【表５０】

表３４．ＣＭ１の調製

成分	最終濃度	最終体積 500mL	最終体積 IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
ヒト AB 血清、熱不活性化 10%	50 mL	100 mL	
200mM L-グルタミン	2 mM	5 mL	10 mL
55mM BME	55 μM	0.5 mL	1 mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50 μg/mL	0.5 mL	1 mL

【２８６４】

使用日に、３７℃の水浴中で必要量のＣＭ１を事前に温め、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を添加した。

【２８６５】

表３５に従って、必要に応じて追加の補充を行ってもよい。

【２８６６】

【表５１】

表３５．必要に応じたＣＭ１の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200 mM	1:100	2 mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000μg/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100μg/mL ストレプトマイシン
アンホテリシンB	250 μg/mL	1:100	2.5 μg/mL

【２８６７】

ＣＭ２の調製

調製したＣＭ１を冷蔵庫から取り出すか、新鮮なＣＭ１を調製する。ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したＣＭ１を滅菌培地ボトル内で等体積のＡＩＭ－Ｖ（登録商標）と混合することによって、必要な量のＣＭ２を調製した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２をＣＭ２培地に追加した。使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む十分な量のＣＭ２を作製した。ＣＭ２培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、２週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要になるまで４℃で保存した。

【２８６８】

ＣＭ３の調製

使用が必要になった日にＣＭ３を調製した。ＣＭ３は、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地と同じであり、使用日に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した。ＩＬ－２ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ３を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに追加した直後に「３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２」とラベル付けする。過剰なＣＭ３が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限（調製後７日）でラベル付けしたボトル内で４℃で保存した。４℃で７日間保存した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。

【２８６９】

ＣＭ４の調製

ＣＭ４は、ＣＭ３と同じであり、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（最終濃度）を追加で補充した。１ＬのＣＭ３毎に、１０ｍＬの２００ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）を添加する。ＩＬ－２ストック溶液及びＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）ストック溶液をＡＩＭ－Ｖのボトルまたはバッグに直接添加することによって、実験のニーズに十分な量のＣＭ４を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、ＡＩＭ－Ｖに添加した直後に「３０００　ＩＬ／ｍＬ　ＩＬ－２及びＧｌｕｔａＭＡＸ」とラベル付けした。過剰なＣＭ４が存在する場合、培地名、「ＧｌｕｔａＭＡＸ」、及びその有効期限（調製後７日）をラベル付けしたボトル内で４℃で保存した。４℃で７日間より長く保存した後、ＩＬ－２を補充した培地を廃棄した。

【２８７０】

実施例２：ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用

この実施例は、本明細書の実施例のいずれかのＴＩＬプロセスと組み合わせた、追加のＴ細胞成長因子として機能するＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１サイトカインの使

用を説明する。
【２８７１】
本明細書に記載のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の組み合わせから成長させることができる。ＲＥＰ前の完了時に、培養物を、拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）、及びにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の場所及びＳａｎｔｅｇｏｅｔｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．，２０１３，１１，３７に記載されている。
【２８７２】
結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１処理条件でのＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して増強したＴＩＬ拡張（＞２０％）が観察できることを示し得る。ＩＬ－２単独培養物と比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理した培養物から取得されたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主にＣＤ８$^+$集団への歪みがあった。ＩＦＮ－γ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２のみで処理されたＴＩＬと比較して、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１で処理されたＴＩＬで上昇した。
【２８７３】
実施例３：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する
この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（ＰＢＭＣ、単核細胞またはＭＮＣとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。
【２８７４】
照射された各ＭＮＣフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体及びインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下でＲＥＰ内のＴＩＬを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。
【２８７５】
ＴＩＬのＲＥＰには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたＭＮＣフィーダー細胞が必要である。フィーダーＭＮＣの膜受容体は、抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＲＥＰフラスコ内のＴＩＬに架橋し、ＴＩＬを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス生成物を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ上で遠心分離し、洗浄し、照射し、ＧＭＰ条件下で凍結保存した。
【２８７６】
ＴＩＬ療法を受けた患者には、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖ＤＮＡ切断が起こり、ＭＮＣ細胞の細胞生存性が喪失する。
【２８７７】
フィーダーロットを、２つの基準：（１）共培養でＴＩＬを１００倍超拡張する能力、及び（２）複製不全で評価した。
【２８７８】
フィーダーロットを、直立したＴ２５組織培養フラスコ内で成長した２つの主要なＲＥＰ前　ＴＩＬ株を利用して、ｍｉｎｉ－ＲＥＰ形式で試験した。各ＴＩＬ株は、ＲＥＰでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの照射されたＭＮＣフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。
【２８７９】

１回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、すべての条件及びすべてのフィーダーロットを試験するために、同じＲＥＰ前　ＴＩＬ株の十分なストックが利用可能であった。

【２８８０】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計６つのＴ２５フラスコがあった：ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃１（２フラスコ）、ＲＥＰ前ＴＩＬ株＃２（２フラスコ）、及びフィーダー対照（２フラスコ）。ＴＩＬ株番号１及び番号２を含むフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【２８８１】

Ａ．実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍。ＣＭ２培地を調製し、ＣＭ２を３７℃の水浴中で温める。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４０ｍＬのＣＭ２を調製する。使用まで保温する。ＩＬ－２を含まない２０ｍＬの予熱したＣＭ２を、使用したＴＩＬ株の名前がラベル付けされた２本の５０ｍＬコニカルチューブの各々に入れる。ＬＮ２ストレージから２つの指定されたＲＥＰ前　ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、３７℃の水浴内の密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【２８８２】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブ中の２０ｍＬのＣＭ２に直ちに移した。細胞を洗浄し、４００×ＣＦで５分間遠心分離するために、ＩＬ－２なしのＣＭ２を使用して４０ｍＬにＱＳ。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された５ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。

【２８８３】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート（２０μＬ）を重複して取り出した。計数を記録した。計数しながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した３７℃、５％　CO_2インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、ＴＩＬを、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＣＭ２中で１×１０^{6}細胞／ｍＬに希釈した。

【２８８４】

ｍｉｎｉ－ＲＥＰの０日目まで、加湿した３７℃のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、２４ウェル組織培養プレートの１ウェル当たり２ｍＬで培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の２４ウェル組織培養プレートで異なるＴＩＬ株を培養した。

【２８８５】

０日目、Ｍｉｎｉ－ＲＥＰを開始する。試験されるフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した（例えば、一度に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製したＣＭ２の一部を等分し、細胞培養のために３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験するために、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で５００ｍＬのＣＭ２培地を調製する）。

【２８８６】

相互汚染を防ぐために各ＴＩＬ株を別々に操作し、ＴＩＬ培養物を入れた２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【２８８７】

無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、約１ｍＬの培地を、使用されるＴＩＬの各ウェルから取り出し、２４ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【２８８８】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは１００～１０００μＬピペッター及びチップ

を使用して、残りの培地をウェル内のＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、ＴＩＬロット名のラベルが付いた５０ｍＬコニカルチューブに移し、容量を記録した。

【２８８９】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ５０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を４００×ＣＦで回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ２培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、１．３×10^6細胞／ｍＬを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【２８９０】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数しながら、ＴＩＬ細胞を含む５０ｍＬのコニカルチューブを、加湿した５％　CO_2、３７℃インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

【２８９１】

ＴＩＬ細胞を含有する５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２で補充された温かいＣＭ２中、１．３×10^6細胞／ｍＬの濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、５０ｍＬのコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【２８９２】

第２のＴＩＬ株について、上記のステップを繰り返した。

【２８９３】

ＴＩＬを実験用のＴ２５フラスコに入れる直前に、ＴＩＬを、以下の通り１：１０に希釈して１．３×10^5細胞／ｍＬの最終濃度にした。

【２８９４】

ＭＡＣＳ　ＧＭＰ　ＣＤ３ピュア（ＯＫＴ３）作用溶液を調製する。ＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍＬ）を４℃の冷蔵庫から取り出し、ＢＳＣに入れた。ｍｉｎｉ－ＲＥＰの培地では、最終濃度３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３を使用した。

【２８９５】

実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬに対して６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であり、これは、２０ｍＬ毎に６０μＬの１０μｇ／ｍＬ溶液、または各フィーダーロットについて試験した６つのフラスコすべてで３６０μＬに相当する。

【２８９６】

試験した各フィーダーロットについて、４００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３を、１０μｇ／ｍＬの作業濃度で作製した（例えば、４つのフィーダーロットを一度に試験する場合、１６００μＬの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３：１６μＬの１ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３＋３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１．５８４ｍＬのＣＭ２培地を作製する）。

【２８９７】

Ｔ２５フラスコを調製する。フィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿した５％　CO_2インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内のＣＭ２に成分が添加される。

【２８９８】

さらなる情報を、表３６に提供する。

【２８９９】

【表５２】

表３６．溶液情報。

成分	共培養フラスコ内の容量	対照(フィーダーのみ)フラスコ内の容量
CM2+3000IU/mL の IL-2	18 mL	19 mL
MNC:CM2+3000IU の IL-2 中 1.3×10^7/mL (最終濃度 1.3×10^7/フラスコ)	1 mL	1 mL
OKT3:CM2 中 10μL/mL=3000IU IL-2	60 μL	60 μL
TIL:3000IU の IL-2 を含む CM2 中の 1.3×10^5/mL (最終濃度 1.3×10^5/フラスコ)	1 mL	0

【２９００】
フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり７８×１０^{6}フィーダー細胞の最小値が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍＬバイアルは、凍結時に１００×１０^{6}個の生細胞を有していた。液体Ｎ$_2$ストレージからの解凍時の５０％の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも２つの１ｍＬバイアルのフィーダー細胞を解凍して、各ＲＥＰに推定１００×１０^{6}個の生細胞を与えることが推奨された。代替的に、１．８ｍＬバイアルで供給された場合、１つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。
【２９０１】
フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットにＩＬ－２を含まないおよそ５０ｍＬのＣＭ２を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルをＬＮ２ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーバッグから取り出し、７０％　ＥｔＯＨでスプレーまたはワイプし、ＢＳＣに移した。
【２９０２】
トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、５０ｍＬのコニカルチューブ中の３０ｍＬの温かいＣＭ２に直ちに移した。バイアルを少量のＣＭ２で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、４００×ＣＦで５分間遠心分離した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた４ｍＬの温かいＣＭ２に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、２００μＬを取り出した。計数を記録した。
【２９０３】
３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加えた温かいＣＭ２中、１．３×１０^{7}細胞／ｍＬで細胞を再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。
【２９０４】
共培養物を準備する。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍＬから１．３×１０^{5}細胞／ｍＬに希釈した。４．５ｍＬのＣＭ２培地を１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬの血清ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０^{6}細胞／ｍＬのＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬのコニカルチューブ中の４．５ｍＬの培地に添加した。ＴＩＬストックバイア

ルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第２のＴＩＬ株に対して繰り返した。

【２９０５】

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬのピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに１ｍＬ（１．３×10^7細胞）を移した。６０μＬのＯＫＴ３作用ストック（１０μｇ／ｍＬ）を各フラスコに追加した。２つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【２９０６】

各ＴＩＬロットの１ｍＬ（１．３×10^5）を、対応するラベルの付いたＴ２５フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。５日目まで乱さなかった。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２９０７】

５日目、培地変更。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２でＣＭ２を調製した。各フラスコには１０ｍＬが必要である。１０ｍＬピペットを使用して、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１０ｍＬの温かいＣＭ２を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、７日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【２９０８】

７日目、採取。インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍＬの培地を取り出し、対照フラスコの各々から１５ｍＬの培地を取り出した。

【２９０９】

１０ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、ＴＩＬを計数した。７日目に計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２９１０】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、ＴＩＬを含むフラスコは、０日目からの倍率拡張について評価した。

【２９１１】

７日目、フィーダー対照フラスコの１４日目までの継続。フィーダー対照フラスコの７日目の計数を完了した後、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５ｍＬの新鮮なＣＭ２培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。

【２９１２】

１４日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖。インキュベーターからフラスコを取り出し、ＢＳＣに移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ１７ｍＬの培地を取り出した。５ｍＬの血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【２９１３】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために２００μＬを取り出した。ＴＩＬは、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【２９１４】

Ｂ．結果及び承認基準プロトコル

結果。ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また０日目と比較して、ＲＥＰ培養の７日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。すべてのフィーダーロットは、ＲＥＰ培養の７日目までのＴＩＬ成長の１００倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの１４日目の計数は、７日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【２９１５】

承認基準。フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製ＴＩＬ株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表３７に示すように、２倍であった。

【２９１６】

【表５３】

表３７．承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNC の照射及び複製不全	7 日目及び 14 日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各 TIL の少なくとも 100 倍の拡張(最低 1.3×10^7 個の生細胞)

【２９１７】

３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養した場合に、ＭＮＣフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、ＲＥＰの７日目及び１４日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（ＴＶＣ）によって評価した。

【２９１８】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、ＲＥＰの０日目に培養された最初の生細胞数から７日目及び１４日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【２９１９】

フィーダー細胞がＴＩＬ拡張をサポートする能力を評価した。ＴＩＬ成長は、ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、７日目に、ＴＩＬ培養物は最低１００倍の拡張を達成した（すなわち、ＲＥＰの０日目に培養された生ＴＩＬ細胞の総数の１００倍超）。

【２９２０】

承認基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットの偶発性試験。ＭＮＣフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。

【２９２１】

ロットの衛星試験バイアルが２つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが１つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。

【２９２２】

適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。

【２９２３】

実施例４：ＩＬ－２ストック溶液の調製

この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン－２を、ｒｈＩＬ－２の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。

【２９２４】
手順。０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬの滅菌水を、５０ｍＬのコニカルチューブに移した。５０ｍＬのコニカルチューブに１ｍＬの１Ｎ酢酸を添加した。チューブを２～３回反転させながら十分に混合した。Ｓｔｅｒｉｆｌｉｐフィルターを使用した濾過によってＨＡｃ溶液を滅菌した。
【２９２５】
ＰＢＳ中の１％　ＨＳＡを調製する。４ｍＬの２５％ＨＳＡストック溶液を、１５０ｍＬの滅菌フィルターユニット内の９６ｍＬのＰＢＳに添加した。溶液を濾過した。４℃で保存した。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、フォームに記入する。
【２９２６】
ｒｈＩＬ－２ストック溶液を調製した（最終濃度６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）。ｒｈＩＬ－２の各ロットは異なり、１）１バイアル当たりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）、及び３）推奨される０．２％ＨＡｃ再構成体積（ｍＬ）などの製造業者の分析証明書（ＣＯＡ）に見られる情報を必要とした。
【２９２７】
以下の等式を使用して、ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％ＨＳＡの体積を計算した。
【２９２８】
【数２】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量}(mg)\ x\ \text{生物学的活性}\ (\frac{IU}{mg})}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - \text{ＨＡｃの体積}(mL) = 1\%\ \text{ＨＡｃの体積}(mL)$$

【２９２９】
例えば、ｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１（Ｃｅｌｌｇｅｎｉｘ）のＣＯＡによると、１ｍｇバイアルの比活性は、２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。ｒｈＩＬ－２を２ｍＬの０．２％ＨＡｃ中で再構成することが推奨される。
【２９３０】
【数３】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\ \frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【２９３１】
ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。３ｍＬシリンジに取り付けた１６Ｇ針を使用して、推奨体積の０．２％ＨＡｃをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを３回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算した体積の１％ＨＳＡをバイアルに追加した。
【２９３２】
ｒｈＩＬ－２溶液の保存。短期保存（７２時間未満）の場合、４℃でバイアルを保存した。長期保存（７２時間超）の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで－２０℃でクライオバイアル内で保存した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から６カ月後に有効期限が切れた。Ｒｈ－ＩＬ－２ラベルに、ベンダー及びカタログ

番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体積を含めた。

【２９３３】

実施例５：凍結保存プロセス

この実施例では、ＣｒｙｏＭｅｄ制御速度冷凍庫、モデル７４５４（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して、本明細書に記載の手順で調製したＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。

【２９３４】

使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック（ＣＳ７５０フリーザーバッグに対応）、７５０ｍＬバッグ用凍結保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグ用リボンタイプ）、及びＣｒｙｏＳｔｏｒｅ ＣＳ７５０冷凍バッグ（ＯｒｉＧｅｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）。

【２９３５】

凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度、及び－８０℃の終了温度まで毎分１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ１－４℃で待つ、ステップ２：－４℃まで１．０℃／分（試料温度）、ステップ３：－４５℃まで２０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ４：－１０．０℃まで１０．０℃／分（チャンバ温度）、ステップ５：－２０℃まで０．５℃／分（チャンバ温度）、及びステップ６：－８０℃まで１．０℃／分（試料温度）。

【２９３６】

実施例６：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス

上記で開示されるプロセスは、ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、合成培地（例えば、ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ＳＦＭ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、例えば、ＤＭ１及びＤＭ２を含む）で置き換えることによって行われ得る。

【２９３７】

実施例７：凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的Ｇｅｎ２生成

この実施例は、Ｉｏｖａｎｃｅ Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．のｃＧＭＰ製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、Ｇ－ＲＥＸフラスコ内のＴＩＬ細胞療法プロセスの例示的なｃＧＭＰ製造を説明する。

【２９３８】

【表５４】

表３８．プロセス拡張の例示的な計画。

推定日(播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積(mL)
0	腫瘍解剖	≦50 個の望ましい腫瘍断片/G-REX-100MCS	G-REX-100MCS 1 フラスコ	≦1000
11	REP 播種	5~200×10^6 個の生細胞/G-REX-500MCS	G-REX-500MCS 1 フラスコ	≦5000
16	REP 分割	1×10^9 個の生細胞/G-REX-500MCS	G-REX-500MCS≦5 フラスコ	≦25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≦530

【２９３９】

【表５５】

表３９．フラスコ容積。

フラスコタイプ	作業 容積/フラスコ
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【２９４０】
０日目のＣＭ１培地の調製。ＢＳＣ内で、試薬をＲＰＭＩ１６４０培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒトＡＢ血清（１００．０ｍＬ）、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（１０．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（１．０ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（１．０ｍＬ）を加熱する
【２９４１】
ＢＳＣから不要な材料を取り出した。ＢＳＣから培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及びＨＢＳＳをＢＳＣの中に残した。
【２９４２】
ＩＬ－２アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２アリコート（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。ＩＬ－２：ロット番号及び有効期限を記録した。
【２９４３】
ＩＬ－２ストック溶液を培地に移した。ＢＳＣ内で、１．０ｍＬのＩＬ－２ストック溶液を、調製されたＣＭ１の０日目培地ボトルに移した。ＣＭ１の０日目培地１ボトル及びＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）１．０ｍＬを追加した。
【２９４４】
Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをＢＳＣの中に通過させた。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ（Ｗ３０１３１３０）をＢＳＣの中に通過させた。
【２９４５】
すべての完全なＣＭ１の０日目培地をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形またはＧＲｅｘ１００ＭＣＳ。
【２９４６】
０日目の腫瘍洗浄培地の調製。ＢＳＣ内で、５．０ｍＬのゲンタマイシン（Ｗ３００９８３２またはＷ３０１２７３５）を１本の５００ｍＬのＨＢＳＳ培地（Ｗ３０１３１２８）ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：ＨＢＳＳ（５００．０ｍＬ）、硫酸ゲンタマイシン、５０ｍｇ／ｍＬ（５．０ｍＬ）。１Ｌの０．２２ミクロンフィルターユニット（Ｗ１２１８８１０）を通して調製されたゲンタマイシンを含有するＨＢＳＳを濾過した。
【２９４７】
０日目の腫瘍処理。腫瘍検体を取得し、即時に処理のために２～８℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄１は、８インチ鉗子（Ｗ３００９７７１）を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄１」皿に移す。この後、腫瘍洗浄２及び腫瘍洗浄３が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の３０％未満が壊死及び／または脂肪組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の３０％未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片（最大６つの中間断片）に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍

断片を、およそ３×３×３ｍｍのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」６ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大５０片のために液滴を充填した。

【２９４８】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を５０ｍＬのコニカルチューブに移した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのためのＢＳＣを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。無菌的にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコをＢＳＣの中に通過させた。腫瘍断片をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【２９４９】

以下のパラメータにおいてＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳをインキュベートした：Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベートした：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。計算：培養の時間、下限＝培養の時間＋２５２時間、上限＝培養の時間＋２７６時間。

【２９５０】

プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、ＩＬ－２のアリコートを解凍した。

【２９５１】

１１日目－培地の調製。インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。

【２９５２】

３本の１０００ｍＬのＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｗ３０１３１１２）ボトル及び３本の１０００ｍＬのＡＩＭ－Ｖ（Ｗ３００９５０１）ボトルを、インキュベーター内で３０分間以上温めた。インキュベーターからＲＰＭＩ１６４０培地を取り出した。ＲＰＭＩ１６４０培地を調製した。培地を濾過した。３つのＩＬ－２の１．１ｍＬのアリコート（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）を解凍した。インキュベーターからＡＩＭ－Ｖ培地を取り出した。ＩＬ－２をＡＩＭ－Ｖに追加した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ及びリピータポンプ移送セットを、ＢＳＣの中に無菌的に移した。

【２９５３】

１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。Ｂａｘａポンプを準備した。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒ培地バッグを準備した。培地を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒにポンプで注入した。Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグからポンプマティックを取り出した。

【２９５４】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地を試料採取した。２０．０ｍＬの培地を取り出し、５０ｍＬのコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。ＢＳＣに、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。試薬をＢＳＣから２～８℃に移した。１Ｌ移送パックを準備した。（プロセス注記５．１１に従って）ＢＳＣ溶接の外側で、「完全なＣＭ２の１１日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの１Ｌ移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全なＣＭ２の１１日目培地をインキュベートした。

【２９５５】

１１日目－ＴＩＬ採取。前処理表。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳを取り出した。３００ｍＬ移送パックを準備した。移送パックをＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに溶接した。

【２９５６】

ＴＩＬ採取及びＴＩＬ採取の開始のためにフラスコを準備する。ＴＩＬが採取された。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を３００ｍＬの移送パ

ックに移した。付着した細胞について膜を点検した。

【２９５７】

フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。ＴＩＬ及び「上清」移送パックを熱融着した。ＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。試料採取のために上清移送パックを準備した。

【２９５８】

Ｂａｃ－Ｔ試料を引き出した。ＢＳＣ内で、１Ｌ「上清」移送パックからおよそ２０．０ｍＬの上清を引き上げ、無菌５０ｍＬコニカルチューブに分注する。

【２９５９】

試料計画に従ってＢａｃＴを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製されたＢａｃＴとラベル付けされた５０ｍＬコニカルから１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

【２９６０】

ＴＩＬをインキュベートした。必要とされるまで、ＴＩＬ移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率÷２。生細胞濃度÷２。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均×０．９。上限：生細胞濃度の平均×１．１。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。

【２９６１】

ＴＩＬ懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算する。総ＴＩＬ細胞体積（Ａ）。取り出された細胞計数試料の体積（４．０ｍＬ）（Ｂ）調整された総ＴＩＬ細胞体積Ｃ＝Ａ－Ｂ。

【２９６２】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。平均生細胞濃度＊：総体積、総生細胞：Ｃ＝Ａ×Ｂ。

【２９６３】

フローサイトメトリーのための計算：総生ＴＩＬ細胞数が、４．０×１０^{7}以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために１．０×１０^{7}細胞を取得するための体積を計算した。

【２９６４】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞：１．０×１０^{7}個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を１．０×１０^{7}個の細胞Ａで割ったもの。

【２９６５】

２．０×１０^{8}個の生細胞に等しいＴＩＬ懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出すＴＩＬ細胞の過剰体積を計算し、過剰なＴＩＬを取り出し、必要に応じてＴＩＬをインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰ＴＩＬを計算した。

【２９６６】

凍結のための標的細胞濃度が１．０×１０^{8}細胞／ｍＬである過剰なＴＩＬ細胞に追加するＣＳ－１０培地の量を計算した。必要に応じて、過剰なＴＩＬを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０を追加した。

【２９６７】

バイアルを充填した。１．０ｍＬの細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が≦０．５ｍＬである場合、体積が０．５ｍＬになるまでＣＳ１０をバイアルに追加する。

【２９６８】

凍結保存のための１×１０^{7}細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。

【２９６９】

試料の凍結保存。コニカルチューブを観察し、ＣＳ－１０をゆっくりと追加し、追加された０．５ｍＬのＣＳ１０の体積を記録した。

【２９７０】
１１日目－フィーダー細胞。フィーダー細胞を取得した。ＬＮ２冷凍庫から少なくとも２つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の３つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保存した。水浴またはｃｒｙｏｔｈｅｒｍを準備した。３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍにおいて約３～５分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。
【２９７１】
移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。
【２９７２】
フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第４のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、３７．０±２．０℃の水浴またはｃｙｔｏｔｈｅｒｍ内で約３～５分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した（Ｂ）。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。
【２９７３】
必要に応じて希釈液を調製し、４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を４本の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の３ｍＬシリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。４．０ｍＬを差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。５×10^9個の生フィーダー細胞を取得するために必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。
【２９７４】
１．０ｍＬシリンジ及び１６Ｇ針を使用して、０．１５ｍＬのＯＫＴ３を引き上げ、ＯＫＴ３を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。
【２９７５】
１１日目　Ｇ－ＲＥＸ充填及びシード設定Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ。「完全なＣＭ２の１１日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに溶接した。フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。ＴＩＬ懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。ＴＩＬをＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳに追加した。熱融着した。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを３７．０±２．０℃でインキュベートした、ＣＯ２パーセンテージ：５．０±１．５％ＣＯ２。
【２９７６】
インキュベーション時間帯を計算した。１６日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５

００ＭＣＳを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間＋１０８時間。上限：インキュベーションの時間＋１３２時間。

【２９７７】

１１日目　過剰ＴＩＬ凍結保存。該当：過剰ＴＩＬバイアルを凍結させた。冷凍前にＣＲＦが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保存場所に移した。冷凍の完了時に、バイアルをＣＲＦから適切な保存容器に移した。バイアルを適切な保存場所に移した。ＬＮ２における保存場所を記録した。

【２９７８】

１６日目　培地の調製。ＡＩＭ－Ｖ培地を事前に温めた。培地バッグ１、２、及び３について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが１２～２４時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグのメス型ポートのうちの１つに取り付けた。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定し、ラベル付けした。上清用の１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを設定した。ＢＳＣから取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行われ得るＴＩＬ採取中に使用された。

【２９７９】

ＩＬ－２を解凍した。すべての氷が融解するまで、ＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地の１バッグ当たりＩＬ－２（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）（ＢＲ７１４２４）の５×１．１ｍＬアリコートを解凍した。１００．０ｍＬのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を等分した。ＩＬ－２をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）に追加した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。配合用のＣＴＳ　ＡＩＭ　Ｖ培地バッグを準備した。ステージＢａｘａポンプ。培地を配合することを準備した。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）＋ＩＬ－２をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％　CO_2。完全なＣＭ４の１６日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【２９８０】

１６日目のＲＥＰ分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。１Ｌの移送パックを準備し、ＴＩＬ懸濁液としてラベル付けし、１Ｌの重量を量った。

【２９８１】

Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳの減容。約４．５Ｌの培養上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒに移した。

【２９８２】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。

【２９８３】

ＴＩＬ採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。

【２９８４】

ＴＩＬ採取。ＴＩＬ懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、細胞懸濁液をＴＩＬ懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じた。ＴＩＬを含む移送パックを熱融着した。上清を含む１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒを熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

【２９８５】

無菌性及びＢａｃＴ試験サンプリング。調製したＢａｃＴラベル付けされた１５ｍＬの

コニカルから１．０ｍＬの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。ＢＳＣ内で、各試料に別個の３ｍＬシリンジを使用して、「ＴＩＬ懸濁液」移送パックから４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【２９８６】

マイコプラズマ試料を取り出した。３ｍＬシリンジを使用して、ＴＩＬ懸濁液移送パックから１．０ｍＬを取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた１５ｍＬコニカルチューブに入れた。

【２９８７】

播種用の移送パックを準備した。ＴＩＬをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をＢＳＣから取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた４つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。ＴＩＬ懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のＴＩＬ懸濁液の調整された体積を計算した。５．０ｍＬを差し引いた総ＴＩＬ細胞体積が試験のために取り出された。

【２９８８】

総生ＴＩＬ細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種するＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコの最大数は５であった。播種するフラスコの計算された数が５つを超えた場合、５つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。

【２９８９】

二次培養用のフラスコの数を計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数を計算した。計算されたように必要とされる２つのＧ－ＲＥＸ－５００Ｍフラスコ毎に「ＣＭ４の１６日目培地」の１つの１０Ｌバッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第１のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。Ｇ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを充填した。培地をポンプで注入するように準備し、４．５Ｌの培地をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳにポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しいＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに追加するＴＩＬ懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が５つを超える場合、５つのみが細胞懸濁液の体積全体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出した。ポンプで注入するためのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターからＴＩＬを取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。（プロセス注記５．１１に従って）「ＴＩＬ懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。ＴＩＬ懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【２９９０】

フラスコにＴＩＬ懸濁液を播種した。計算されたＴＩＬ懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【２９９１】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度ＬＥＤディスプレイ：３７．０±２．０℃、CO_2パーセンテージ：５．０±１．５％CO_2。フラスコをインキュベートした。

【２９９２】

２２日目にインキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳを取り出す時間範囲を決定した。

【２９９３】

２２日目　洗浄緩衝液の調製。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣ内で、ルアー接続を介して４インチ血漿移送セットを１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグ

に取り付けた。１０ＬのＬａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。ＢＳＣから外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される２つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコ毎に、１つの１０Ｌ　Ｌａｂｔａｉｎｅｒバッグを準備した。Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅを３０００ｍＬバッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、３０００ｍＬのＯｒｉｇｅｎバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン２５％を３０００ｍＬのバッグに追加した。１２０．０ｍＬの最終体積のヒトアルブミン２５％を取得する。

【２９９４】

ＩＬ－２希釈液を調製した。１０ｍＬシリンジを使用して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、５．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を取り出した。ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を５０ｍＬのコニカルチューブに分注した。

【２９９５】

等分されたＣＲＦブランクバッグＬＯＶＯ洗浄緩衝液。１００ｍＬのシリンジを使用して、無針注入ポートから７０．０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を引き上げた。

【２９９６】

すべての氷が融解するまで、１つの１．１ｍＬのＩＬ－２（６×１０６ＩＵ／ｍＬ）を解凍した。５０μＬのＩＬ－２ストック（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ）を「ＩＬ－２希釈液」とラベル付けされた５０ｍＬのコニカルチューブに追加した。

【２９９７】

凍結保存調製。５つのクライオカセットを２～８℃に置き、最終産物の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【２９９８】

細胞計数希釈液を調製した。ＢＳＣ内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地を、４本の別個の１５ｍＬコニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。４つのクライオバイアルをバイアル番号（１～４）でラベル付けした。使用されるＢＳＣの下でバイアルを保存した。

【２９９９】

２２日目　ＴＩＬ採取。インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度ＬＥＤディスプレイ：３７±２．０℃、ＣＯ２パーセンテージ：５％±１．５％．インキュベーターからＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコを取り外した。ＴＩＬ収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約４．５Ｌの上清をＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳから上清バッグに移した。

【３０００】

ＴＩＬ採取用のフラスコを準備した。ＴＩＬの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。ＴＩＬの収集を開始した。ＴＩＬ懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。ＴＩＬ採取。ＧａｔｈｅＲｅｘを使用して、ＴＩＬ懸濁液を３０００ｍＬの収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。Ｇ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳ上のクランプを閉じ、すべてのクランプが閉じていることを確実にした。細胞懸濁液をＬＯＶＯソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。４×１．０ｍＬの細胞計数試料を取り出した。

【３００１】

細胞計数を行った。ＮＣ－２００及びプロセス注記５．１４を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、０．５ｍＬの細胞懸濁液を調製された４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖ培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、１：１０希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。ＬＯＶＯソースバッグの重量を量った。総生ＴＩＬ細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【３００２】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して１つの上清バッグから１０．０ｍＬを取り出し、１５ｍＬコニカルに入れた。

【３００３】

「ＴＩＬ　Ｇ－ＲＥＸ採取」プロトコルを行い、最終産物の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅを取り付けた。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが取り付けられていることを検証し、ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。ＰｌａｓｍａＬｙｔｅが動いていることを確認した。

【３００４】

最終配合物及び充填。標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのＣＳ－１０及びＬＯＶＯ洗浄緩衝液の体積を計算した。ＣＲＦブランクを調製した。

【３００５】

最終産物に追加するＩＬ－２の体積を計算した。所望される最終ＩＬ－２濃度（ＩＵ／ｍＬ）－３００ＩＵ／ｍＬ。ＩＬ－２作業ストック：６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ。接続装置を組み立てた。４Ｓ－４Ｍ６０をＣＣ２細胞接続に滅菌溶接した。ＣＳ７５０クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。ＣＳ－１０バッグを４Ｓ－４Ｍ６０のスパイクに溶接した。ＩＬ－２とともにＴＩＬ調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「ＩＬ－２　６×１０^{4}」アリコートから決定されたＩＬ－２の量を取り出した。配合されたＴＩＬバッグをラベル付けした。配合されたＴＩＬバッグを装置に追加した。ＣＳ１０を追加した。シリンジを交換した。約１０ｍＬの空気を１００ｍＬのシリンジに引き込み、装置上の６０ｍＬシリンジを交換した。ＣＳ１０を追加した。ＣＳ－７５０バッグを準備した。細胞を分注した。

【３００６】

最終産物バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終産物バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。１０ｍＬの空気を新しい１００ｍＬシリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を５０ｍＬコニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【３００７】

目視検査を含み、凍結保存のための最終産物を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または２～８℃で保持した。

【３００８】

細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、２．０ｍＬの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように１５ｍＬコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：１つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。ＩＦＮ－γを計算した。最終産物バッグを熱融着した。

【３００９】

以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。

【３０１０】

【表５６】

表４０．試料計画。

試料	容器の数	各々に追加する試料体積	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0 mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0 mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
IFN-γ	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0 mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5 mL	2mL クライオバイアル

【３０１１】
無菌性及びＢａｃＴ試験。試験試料採取。ＢＳＣ内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から１．０ｍＬの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。
【３０１２】
最終産物の凍結保存。制御速度冷凍庫（ＣＲＦ）を準備した。ＣＲＦが設定されていることを検証した。ＣＲＦプローブを設定した。最終産物及び試料をＣＲＦに入れた。４℃±１．５℃に達し、ＣＲＦ実行を進めるために必要な時間を決定した。ＣＲＦを完了し、保存した。実行の完了後にＣＲＦを停止させた。カセット及びバイアルをＣＲＦから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相ＬＮ２に移した。保存場所を記録した。
【３０１３】
最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（２２日目）フローサイトメトリーによる２２日目ＲＥＰのＣＤ３＋細胞の決定、（２２日目）グラム染色法（ＧＭＰ）、（２２日目）ゲルクロットＬＡＬアッセイ（ＧＭＰ）による細菌内毒素試験、（１６日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）、（１６日目）ＴＤ－ＰＣＲによるマイコプラズマＤＮＡ検出（ＧＭＰ）、許容される外観属性、（２２日目）ＢａｃＴ滅菌アッセイ（ＧＭＰ）（２２日目）、（２２日目）ＩＦＮ－ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、ＴＩＬ産物を分析するために用いられる。
【３０１４】
実施例８：Ｇｅｎ３拡張プラットフォームの例示的な実施形態
０日目
腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。５ｍＬのゲンタマイシン（５０ｍｇ／ｍＬ）を５００ｍＬボトルのＨＢＳＳに添加した。５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、ＯＫＴ３希釈に使用する１５ｍＬのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで３７℃で保存するか、または凍結させた。３７℃の場合、フィーダー細胞を計数した。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞を計数した。
【３０１５】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が１×１０^{9}細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、１×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに添加した。

【３０１６】

ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬの腫瘍洗浄培地をＯＫＴ３アリコート（１００μＬ）に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、第２のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積２Ｌに調整した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【３０１７】

ＯＫＴ３配合物の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬのアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬのバイアル当たり約１０倍のアリコート。－８０℃で保存した。０日目：１５μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中３０ｎｇ／ｍＬ～６０μＬ最大約１アリコート。

【３０１８】

５ｍＬの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした６ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地をさらなる使用のために利用可能にした。５０ｍＬの腫瘍洗浄培地を、各１００ｍｍペトリ皿に追加した。

【３０１９】

解剖皿の蓋の下の定規を参照として使用して、腫瘍を２７ｍｍ^{3}断片（３×３×３ｍｍ）に解剖した。６０個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを調製した（一般に、１フラスコ当たり６０個の断片）。

【３０２０】

断片チューブ１～断片チューブ４とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を計算した。

【３０２１】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳを播種する。Ｄ０（０日目）とラベル付けする。

【３０２２】

Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ中の培養物への腫瘍断片の追加。滅菌条件下で、腫瘍断片培養物（Ｄ０）１とラベル付けしたＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ及び断片チューブとラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ１を回転させ、同時にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳのキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、回転している間にＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに追加した。Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに移送された断片の数を記録した。

【３０２３】

断片がＧＲＥＸフラスコの底に配置された時点で、７ｍＬの培地を吸引し、７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。拡張された特徴付け用の５つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで－２０℃で保存した。

【３０２４】

１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコ毎に繰り返す。

【３０２５】

７日目～８日目
フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に３７℃の水浴中で３～５分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の最適範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について０．５ｍＬの細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。
【３０２６】
総生フィーダー細胞数が２×１０^{9}細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第１のフィーダー細胞バッグから取り出して、２×１０^{9}細胞を第２のフィーダー細胞バッグに追加した。
【３０２７】
ｐ１０００マイクロピペットを使用して、９００μＬのＨＢＳＳを１００μＬのＯＫＴ３アリコートに移す。上下に３回ピペッティングして混合する。２つのアリコートを調製した。
【３０２８】
ＯＫＴ３配合物の詳細：ＯＫＴ３は、１００μＬのアリコート中のバイアル（１ｍｇ／ｍＬ）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。１ｍＬのバイアル当たり約１０倍のアリコート。－８０℃で保存した。７日目／８日目：３０μｇ／フラスコ、すなわち５００ｍＬ中６０ｎｇ／ｍＬ～１２０μｌ最大約２アリコート。
【３０２９】
シリンジ及び滅菌技法を使用して、０．６ｍＬのＯＫＴ３を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべて添加されたことを確認した。培地量を合計２Ｌに調整した。第２のＯＫＴ３アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。
【３０３０】
フィーダー細胞懸濁液を含むＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコの準備。０日目に生成されたＧ－ＲＥＸフラスコの数に従って処理するためにＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコの数を記録した。Ｇ－ＲＥＸフラスコをインキュベーターから取り出し、第２のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。
【３０３１】
フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去。１本の１０ｍＬシリンジをＧ－ＲＥＸ１００フラスコに接続し、５ｍＬの培地を引き上げた。５つの１ｍＬアリコート（拡張された特徴付け用に５ｍＬ）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特徴付け用に５つのアリコート（最終断片培養上清）を－２０℃で保存した。各Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコにラベル付けし、繰り返した。
【３０３２】
フラスコの数に応じた、特徴付け用の５～２０×１ｍＬ試料：
●５ｍＬ＝１フラスコ
●１０ｍＬ＝２フラスコ
●１５ｍＬ＝３フラスコ
●２０ｍＬ＝４フラスコ
【３０３３】
フィーダー細胞をＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳに播種し続け、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに重量で５００ｍＬの第２のフィーダー細胞バッグを重力移送し（１ｇ＝１ｍＬと想定）、量を記録した。７日目培養とラベル付けし、Ｇ－ＲＥＸ１００フラスコ毎に繰り返した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。
【３０３４】
１０～１１日目
第１のＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、１０ｍＬ

シリンジを使用して７ｍＬの前処理培養上清を取り出した。７つの１ｍＬアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に５ｍＬ、滅菌試料用に２ｍＬ）。

【３０３５】

フラスコを注意深く混合し、新たな１０ｍＬシリンジを使用して１０ｍＬの上清を取り出し、Ｄ１０／１１マイコプラズマ上清とラベル付けした１５ｍＬのチューブに移す。

【３０３６】

フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。

●１フラスコ＝４０ｍＬ
●２フラスコ＝２０ｍＬ／フラスコ
●３フラスコ＝１３．３ｍＬ／フラスコ
●４フラスコ＝１０ｍＬ／フラスコ

【３０３７】

合計４０ｍＬをすべてのフラスコから取り出し、「１０／１１日目ＱＣ試料」とラベル付けした５０ｍＬのコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保存すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

【３０３８】

必要になるまで－２０℃以下で拡張された特徴付けのために５つのアリコート（前処理培養上清）を保存した。１本の嫌気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトル及び１本の好気性ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔボトルに各々１ｍＬの前処理培養上清を接種した。

【３０３９】

細胞懸濁液をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳ毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの内容物をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、一度に約１００ｍＬの液体移送を監視した。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳの容量が５００ｍＬに低減したとき、移送を停止した。

【３０４０】

移送ステップ中、１０ｍＬシリンジを使用し、Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳからシリンジに１０ｍＬの細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。１つのフラスコのみの場合：２つのシリンジを使用して合計２０ｍＬを取り出した。フラスコが２つの場合：１フラスコ当たり１０ｍＬを取り出した。フラスコが３つの場合：１フラスコ当たり７ｍＬを取り出した。フラスコが４つの場合：１フラスコ当たり５ｍＬを取り出した。細胞懸濁液を１本の一般的な５０ｍＬのコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及びＱＣ試料までインキュベーター内で保存する。ＱＣに必要な細胞の総数は、約２０ｅ６細胞であった：４×０．５ｍＬの細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。

【３０４１】

アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

１．本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、またはＩＦＮ－γもしくはグランザイムＢアッセイのための最小10×10^{6}細胞
２．マイコプラズマのための1×10^{6}細胞
３．ＣＤ３＋／ＣＤ４５＋のためのフローサイトメトリーのための5×10^{6}細胞

【３０４２】

Ｇ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコをインキュベーターに移した。

【３０４３】

ＱＣ試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも15×10^{8}細胞が必要であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ（1×10^{6}細胞／平均生存濃度）、フロー（5×10^{6}細胞／平均生存濃度）及びＩＦＮ－ｇアッセイ（5×10^{6}細胞～　1×10^{6}細胞を含み、８～10×10^{6}細胞が、ＩＦＮ－γアッセイに必要である。

【３０４４】

10×10^{6}細胞／ｍＬで凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイア

ルの数を計算した。
【３０４５】
１６～１７日目
洗浄緩衝液の調製（１％ ＨＳＡ Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ Ａ）。ＨＳＡ及びＰｌａｓｍａｌｙｔｅを５Ｌバッグに移して、ＬＯＶＯ洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積１２５ｍＬの２５％ＨＳＡを５Ｌバッグに移した。１０ｍＬまたは４０ｍＬの洗浄緩衝液を取り出し、「ＩＬ－２ ６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した（ＩＬ－２を事前に調製した場合は１０ｍＬ、ＩＬ－２を新たに調製した場合は４０ｍＬ）。
【３０４６】
Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ＋１％ ＨＳＡに添加する再構成ＩＬ－２の体積を計算した：再構成ＩＬ－２の体積＝（ＩＬ－２の最終濃度×最終体積）／ＩＬ－２の比活性（標準アッセイに基づく）。ＩＬ－２の最終濃度は、６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬであった。最終体積は、４０ｍＬであった。
【３０４７】
再構成ＩＬ－２に必要なＩＬ－２の計算された初期体積を取り出し、「ＩＬ－２の６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」チューブに移した。事前に調製したアリコートから１００μＬのＩＬ－２の６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬを、１０ｍＬのＬＯＶＯ洗浄緩衝液を含有する「ＩＬ－２の６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ」とラベル付けしたチューブに追加した。
【３０４８】
約４５００ｍＬの上清をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべてのＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコで繰り返した。
【３０４９】
６０ｍＬの上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。＋２～８℃で保存した。
【３０５０】
細胞収集。細胞を計数した。４．５ｍＬのＡＩＭ－Ｖを含む４つの１５ｍＬコニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適範囲は、５×１０^{4}～５×１０^{6}細胞／ｍＬである。（１：１０希釈が推奨された）。１：１０希釈の場合、事前に調製した４５００μＬのＡＩＭ Ｖに、５００μＬのＣＦを追加する。希釈倍率を記録した。
【３０５１】
ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前（生＋死）を計算した＝
平均総細胞
濃度（ＴＣ濃度ＬＯＶＯ前）
（生＋死）
Ｘ
ソースバッグの体積
【３０５２】
ＴＶＣ（総生細胞）ＬＯＶＯ前（生）を計算した＝
平均総生細胞
濃度（ＴＶＣ ＬＯＶＯ前）
（生）
Ｘ
ＬＯＶＯソースバッグの体積
【３０５３】
総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}超であった場合、５×１０^{8}細胞を取り出して、ＭＤＡ保持試料として凍結保存する。５×１０^{8}÷平均ＴＣ濃度（ステップ１４．４４）＝取り出す体積。
【３０５４】
総細胞（ＴＣ）数が５×１０^{9}以下であった場合、４×１０^{6}細胞を取り出して、ＭＤ

Ａ保持試料として凍結保存する。４×１０^{6}÷平均ＴＣ濃度＝取り出す体積。
【３０５５】
総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、１５０×１０^{9}生細胞の保持を可能にすべきである。ＴＶＣ　ＬＯＶＯ前５×１０^{8}もしくは４×１０^{6}を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。
【３０５６】
バッグに残っている残りの総細胞を計算した。ＴＣ（総細胞）ＬＯＶＯ前［平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのＴＣ　ＬＯＶＯ前］を計算した。
【３０５７】
残存する細胞の総数に従って、表４１の対応するプロセスを選択する。
【３０５８】
【表５７】

表４１．セルの総数。

総細胞:	保持液(mL)
$0<$総細胞$\leqq 31\times10^{9}$	115
$31\times10^{9}<$総細胞$\leqq 71\times10^{9}$	165
$71\times10^{9}<$総細胞$\leqq 110\times10^{9}$	215
$110\times10^{9}<$総細胞$\leqq 115\times10^{9}$	265

【３０５９】
使用したプロセスに対応して添加するＩＬ－２の体積を選択する。次のように計算された体積：保持体積×２×３００ＩＵ／ｍＬ＝必要とされるＩＬ－２のＩＵ。必要なＩＬ－２のＩＵ／６×１０^{4}ＩＵ／ｍＬ＝ＬＯＶＯ後バッグに追加するＩＬ－２の体積。添加したすべての体積を記録した。さらなる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。
【３０６０】
細胞産物を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。
【３０６１】
取得されたクライオバイアル試料に対して、内毒素、ＩＦＮ－γ、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。
【３０６２】
実施例９：Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３の例示的なプロセス
この実施例は、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスを示す。Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスのＴＩＬは、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスのプライミングによる第１の拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。
【３０６３】
Ｇｅｎ２　ＴＩＬ産物の製造は、２つの相からなる：１）急速拡張前（ＲＥＰ前）及び２）急速拡張プロトコル（ＲＥＰ）。ＲＥＰ前中に、切除腫瘍を、各寸法２～３ｍｍの５０個以下の断片に切断し、血清含有培養培地（１０％ＨｕＳＡＢを補充したＲＰＭＩ１６

４０培地）及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で、１１日間の期間培養した。１１日目にＴＩＬを採取し、大規模二次ＲＥＰ拡張に導入した。ＲＥＰは、５日間の３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を補充した５Ｌ体積のＣＭ２中の１５０μｇのモノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）を装填した５×１０^{9}個の放射線照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の共培養におけるＲＥＰ前由来の２００×１０^{6}個以下の生細胞の活性化からなる。１６日目に、培養物の体積を９０％減少させ、細胞画分を１フラスコ当たり１×１０^{9}個以上の生リンパ球で複数のＧ－ＲＥＸ－５００フラスコに分割し、ＣＭ４で５ＬにＱＳする。ＴＩＬをさらに６日間インキュベートする。ＲＥＰを２２日目に採取し、洗浄し、配合し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【３０６４】

Ｇｅｎ３　ＴＩＬ産物の製造は、３つの相からなる：１）プライミングによる第１の拡張プロトコル、２）急速な第２の拡張プロトコル（急速拡張相またはＲＥＰとも称される）、及び３）継代培養分割。プライミングによる第１の拡張ＴＩＬ増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法２～３ｍｍの１２０個以下の断片に切断した。プライミングによる第１の拡張の０日目に、ＯＫＴ－３を装填したおよそ２．５×１０^{8}個の照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞のフィーダー層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々内のおよそ１００ｃｍ^{2}の表面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が５００ｍＬの血清含有ＣＭ１培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む３つの１００ＭＣＳ容器に分布し、その中で７日間培養した。７日目に、ＯＫＴ－３を装填したおよそ５×１０^{8}個の照射された同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、３つの１００ＭＣＳ容器の各々内の腫瘍断片化培養相に組み込み、５００ｍＬのＣＭ２培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０μｇのＯＫＴ－３で培養することによって、ＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始を、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３を装填したフィーダー細胞の閉鎖系流体移行を使用して、同じ容器内のプライミングによる第１の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移行によってより大きい容器にスケーリングし、移し（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）、追加の４ＬのＣＭ４培地を添加するプロセスステップを含めた。１６日目にＲＥＰ細胞を採取し、洗浄し、配合し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に－１５０℃で発送する。

【３０６５】

全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、よりスケーラブルであり、かつ簡単に修正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。

【３０６６】

【表５８】

表５０．例示的なＧｅｎ２及び例示的なＧｅｎ３製造プロセスの比較。

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前-0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G-REX-100MCS 11 日 1L の CM1 培地 +IL-2(6000IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つのフラスコに均等に分割した。1 つのフラスコ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 7 日 500mL の CM1 培地 +IL-2(6000IU/mL) 2.5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に誘導する、11 日目、 $<200\times10^6$ TIL (1)5L CM2 培地中の G-REX-500MCS IL-2(3000IU/mL) 5×10^9 個のフィーダー細胞 150ug OKT-3	REP に誘導する、7 日目、すべての細胞、同じ G-REX-100MCS 500CM2 培地を添加する IL-2(6000IU/mL) 5×10^8 個のフィーダー細胞/フラスコ 30ug の OKT-3/フラスコ
TIL の増殖またはスケールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つの G-REX-500MCS に分割する 4.5L CM4 培地+IL-2(3000IU/mL) $\geqq1\times10^9$ TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G-REX-500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添加する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する、 LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO 自動細胞洗浄機
最終配合物	凍結保存した生成物 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN_2 中の 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【３０６７】

０日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を３回洗浄し、断片をランダム化し、２つのプールに分けた（プロセス毎に１つのプール）。Ｇｅｎ２プロセスの場合、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を含有する１ＬのＣＭ１培地を含む１つのＧＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を、６，０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を含有する５００ｍＬのＣＭ１を含む１つのＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。Ｇ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳフラスコを９０％減容させたＧｅｎ２プロセスの場合、収集した細胞懸濁液を新たなＧ

－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移して、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）＋５×１０^{9}個のフィーダー細胞及びＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含有するＣＭ２培地中で１１日目にＲＥＰを開始した。細胞が拡張し、プロトコルに従って１６日目にＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を有するＣＭ４培地を含む複数のＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳフラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスの場合、ＲＥＰの開始は７日目に起こり、同じＧ－ＲＥＸ－１００ＭＣＳをＲＥＰの開始に使用した。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）及び５×１０^{8}個のフィーダー細胞を３０ｕｇのＯＫＴ－３とともに含有する５００ｍＬのＣＭ２培地を各フラスコに添加した。９～１１日目に、培養をスケールアップした。Ｇ－ＲＥＸ１００Ｍの全体積（１Ｌ）をＧ－ＲＥＸ－５００ＭＣＳに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含有する４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【３０６８】

比較には、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４及びＬ４０５５）と１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）の３つの異なる腫瘍を含めた。

【３０６９】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、ＣＭ１培地（培養培地１）、ＣＭ２培地（培養培地２）、及びＣＭ４培地（培養培地４）を事前に調製し、４℃で保持した。ＣＭ１培地及びＣＭ２培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。

【３０７０】

Ｌ４０５５腫瘍の場合、ＲＥＰの開始及びスケールアップ時に、培地を事前に３７℃で最大２４時間温めた。

【３０７１】

結果。達成された生細胞の総数について、Ｇｅｎ３の結果はＧｅｎ２の３０％以内であった。Ｇｅｎ３最終産物は、再刺激後により高いＩＦＮ－γ産生を示した。Ｇｅｎ３最終産物は、存在する固有の全ＣＤＲ３配列によって測定される、増加したクローン多様性を示した。Ｇｅｎ３最終産物は、より長い平均テロメア長を示した。

【３０７２】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、２つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総ＲＥＰ前細胞（ＴＶＣ）を採取し、Ｇｅｎ２プロセスの場合は１１日目に、Ｇｅｎ３プロセスの場合は７日目に計数した。２つのＲＥＰ前群を比較するために、細胞数を培養物中に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表５１に示されるように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して、１断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。ＲＥＰ前ＴＶＣを７で割り、その後、１１を掛けて計算した、１１日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【３０７３】

【表５９】

表５１．ＲＥＰ前の細胞数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
REP 前における断片当たりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の REP 前における Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

＊Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【３０７４】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの場合、ＴＶＣをプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、２２日目（Ｇｅｎ２）及び１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣ数を確立した。その後、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割り、１断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡張を、採取したＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算した。表５２に示されるように、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３を比較すると、倍率拡張はＬ４０５４の場合では同様であり、Ｌ４０５５の場合、倍率拡張はＧｅｎ２プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地をＲＥＰ開始日の前に２４温めた。Ｍ１０８５Ｔの場合のＧｅｎ３でもより高い倍率拡張が観察された。ＲＥＰ　ＴＶＣを１６で割り、その後、２２を掛けて計算した、２２日目にＧｅｎ３プロセスで予想されるＴＶＣ数の外挿計算。

【３０７５】

【表６０】

表５２．ＴＩＬ最終産物の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC/断片(採取時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張 採取/REP開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
22日目のREP採取におけるGen3外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

＊Ｌ４０５５、濾過されていない培地。

【３０７６】

表５３：ＴＩＬ最終産物の生存率％：採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ生成物を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【３０７７】

採取時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ生成物を生存率％の放出基準と比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのすべての条件は、７０％の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【３０７８】

【表６１】

表５３．ＲＥＰ（ＴＩＬ最終産物）の生存率％

腫瘍ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【３０７９】

１フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つまたは３つのフラスコに播種するのに

十分な大きさであるという予想に基づいた。

【３０８０】

【表６２】

表５４．Ｇｅｎ３プロセスでのフルスケール２及び３フラスコへの外挿推定細胞数計算。

腫瘍ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3プロセス	2フラスコ	3フラスコ	2フラスコ	3フラスコ	2フラスコ	3フラスコ
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【３０８１】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終産物の表現型マーカー比較。３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５、及びＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡張を受けた。採取時に、ＲＥＰ　ＴＩＬ最終産物をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞パーセンテージは９０％超であった。

【３０８２】

Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから採取したＴＩＬと比較して、より高いＣＤ８及びＣＤ２８発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスは、より高いＣＤ４＋パーセンテージを示した。

【３０８３】

Ｇｅｎ３プロセスから採取したＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセス由来のＴＩＬと比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。

【３０８４】

活性化及び疲弊マーカーを２つの腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５由来のＴＩＬで分析して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３　ＴＩＬ拡張プロセス由来の最終ＴＩＬ産物を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２プロセスとの間で同等であった。

【３０８５】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌。採取日、Ｇｅｎ２の場合は２２日目、Ｇｅｎ３の場合は１６日目に、ＴＩＬは、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の場合、コーティングした抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｍ１０８５Ｔでの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８、及びＣＤ１３７ビーズを使用して行った。すべての条件で再刺激の２４時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析を、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した３つの腫瘍で、Ｇｅｎ３プロセス由来のＩＦＮγのより高い生成が観察された。

【３０８６】

培養培地中のＩＬ－２レベルの測定。Ｇｅｎ２プロセスとの間のＩＬ－２消費量を比較するために、腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５で、ＲＥＰの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、Ｒ＆Ｄの定量ＥＬＩＳＡキットによって測定した。一般的な傾向は、ＩＬ－２濃度が、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスにおいて高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってＧｅｎ３のＲＥＰ開始時のＩＬ－２濃度がより高い（６０００ＩＵ／ｍＬ）ことに起因する可能性がある。

【３０８７】

代謝基質及び代謝物分析。Ｄ－グルコース及びＬ－グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ＡＴＰの形態でエネルギーを生成するためにミトコンドリアに

よって利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が生成される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く生成される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

【３０８８】

Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地を、Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスの両方で、ＲＥＰ開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Ｇｅｎ２の場合は１１日目、１６日目、及び２２日目、Ｇｅｎ３の場合は７日目、１１日目、及び１６日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度についてＣＥＤＥＸバイオアナライザーで分析した。

【３０８９】

Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地配合物に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副生成物が生成される。Ｌ－グルタミンの分解に対抗するために、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を補充した。２つの腫瘍株では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中のＬ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の減少、ならびにＲＥＰ全体でアンモニアの増加を示した。Ｇｅｎ２アームでは、Ｌ－グルタミン及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）の濃度が一定であり、アンモニア生成のわずかな増加が観察された。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

【３０９０】

テロメアは、Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによって繰り返される。Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＬ４０５４及びＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２と同等のテロメア長を示した。

【３０９１】

ＣＤ３分析。各プロセスで生成された細胞産物のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４及びＬ４０５５の採取したＴＩＬ最終産物をサンプリングし、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

【３０９２】

表５５は、採取したＴＩＬ細胞産物のＬ４０５４における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１９９個の配列がＧｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に相当する。

【３０９３】

【表６３】

表５５．Ｌ４０５４のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

# uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4054	8915	4355(48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen3-L4054	-	18130	-	223

【３０９４】

表５６は、採取したＴＩＬ細胞産物のＬ４０５５における共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージに関するＧｅｎ２とＧｅｎ３との比較を示す。１８３３個の配列がＧｅｎ３最終産物とＧｅｎ２最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に相当する。

【３０９５】

【表６４】

表５６．Ｌ４０５５のＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間で共有されるｕＣＤＲ３配列の比較。

# uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen2	Gen3	Gen2	Gen3
Gen2-L4055	12996	6599(50.77%)	1843	1833(99.45%)
Gen3-L4055	-	27246	-	2616

【３０９６】

ＣＭ１及びＣＭ２培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスで使用するまで４℃で保持した。

【３０９７】

Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日に、腫瘍Ｌ４０５５の場合、培地を３７℃で事前に２４時間温めた。

【３０９８】

これらのプロセスで収集した上清中にＬＤＨは測定されなかった。

【３０９９】

Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞計数を、Ｋ２　ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ細胞カウンターを使用して実行した。

【３１００】

腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用のＴＩＬ産物、テロメア長、及びＣＤ３－ＴＣＲｖｂ分析などの試料は入手できなかった。

【３１０１】

結論。この実施例では、３つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡張された表現型特徴付け、ならびにＧｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセス間の培地消費に関して比較する。

【３１０２】

Ｇｅｎ２とＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。

【３１０３】

ＲＥＰ前採取は、７日目ではなく１１日目に起こり、ＲＥＰ採取は、１６日目ではなく２２日目に起こると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＴＶＣの数値が近いことを示し、初期活性化により、ＴＩＬの成長が増強したことを示す。

【３１０４】

Ｇｅｎ３プロセスでの追加フラスコ（２つまたは３つ）の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスの１６日目の採取時にＴＶＣで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培

養物の早期活性化がＴＩＬ処理時間を短縮したことを示す。
【３１０５】
Ｇｅｎ２とＧｅｎ３のＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のＴＶＣ細胞用量は、Ｇｅｎ２（２２日）とＧｅｎ３（１６日）との間で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約４０％であり、Ｇｅｎ２よりも低かった。
【３１０６】
表現型特徴付けに関して、Ｇｅｎ２プロセスと比較してＧｅｎ３プロセスでの３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋及びＣＤ２８＋発現が観察された。
【３１０７】
Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。
【３１０８】
Ｇｅｎ２プロセス及びＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの持続期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。
【３１０９】
ＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）産生は、分析した３つの腫瘍において、Ｇｅｎ２と比較してＧｅｎ３最終産物において３倍高かった。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスがより短いにもかかわらず、Ｇｅｎ２プロセスと比較して高機能でより強力なＴＩＬ産物を生成したことを示し、Ｇｅｎ３でのＣＤ８及びＣＤ２８発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現へのＧｅｎ３の肯定的な傾向を示唆した。
【３１１０】
Ｇｅｎ２とＧｅｎ３との間のＴＩＬ最終産物のテロメア長は同等であった。
【３１１１】
グルコース及び乳酸塩レベルは、Ｇｅｎ２最終産物とＧｅｎ３最終産物との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びＧｅｎ２と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Ｇｅｎ３プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。
【３１１２】
全体として、Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較してほぼ２倍の処理時間の短縮を示し、これにより、Ｇｅｎ３プロセスによって拡張されたＴＩＬ産物の売上原価（ＣＯＧ）の有意な削減がもたらされるであろう。
【３１１３】
ＩＬ－２消費は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費の一般的な傾向を示しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高かった。
【３１１４】
Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。
【３１１５】
Ｇｅｎ３プロセスを使用して、ＲＥＰ前の０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３の追加により、ＴＩＬの初期活性化が可能になり、ＴＩＬ成長が可能になった。
【３１１６】
表５７は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。
【３１１７】

【表６５】

表５７．例示的なＧｅｎ３プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen2 の実施形態	プロセス Gen3 の実施形態
REP 前-0 日目	50 個以下の断片 1X G-REX-100MCS 1L 培地 IL-2(6000IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 個以下のフラスコ 2L 以下の培地(500mL/フラスコ) IL-2(6000IU/mL) 2.5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 15ug の OKT3/フラスコ
REP 開始	REP に誘導した新鮮な TIL 11 日目 $200e^6$ 個以下の生細胞 5×10^9 個のフィーダー細胞 G-REX-500MCS 5L CM2 培地+IL-2(3000IU/mL) 150μg の OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10^8 フィーダー細胞 30μg の OKT3/フラスコ G-REX-100MCS 500mL 培地+IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養またはスケールアップ	5 つ以下の G-REX-500MCS 1×10 個以下の生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	4 つ以下の G-REX-500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L/フラスコ 10~11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終配合物	凍結保存した生成物 LN_2 中の 300IU/mL の IL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN_2 中の 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス時間	22 日	16 日

【３１１８】

実施例１０：例示的なＧｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３．１とも称される）

この実施例は、「ＴＩＬ拡張のためのＧｅｎ２プロセスとＧｅｎ３プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Ｇｅｎ３プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞（ＴＶＣ）出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Ｇｅｎ３実施形態をさらなる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例ではＧｅｎ３．１と称する。

【３１１９】

いくつかの実施形態では、Ｇｅｎ３．１　ＴＩＬ製造プロセスは、以下の４つのオペレ

ーター介入を有する。
１．腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの０日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約３×３ｍｍ（合計で最大２４０個の断片）を生成し、１～４つのＧ－ＲＥＸ１００ＭＣＳフラスコ内で培養した。各フラスコは、最大６０個の断片、６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、１５μｇのＯＫＴ３、及び２．５×10^8個の照射した同種異系単核細胞を補充した５００ｍＬのＣＭ１またはＤＭ１培地を含んだ。培養物を３７℃で６～８日間インキュベートした。
２．ＴＩＬ培養再活性化：７～８日目に、いずれの場合も６，０００ＩＵのｒｈＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ３、及び５×10^8個の照射した同種異系単核細胞を補充したＣＭ２またはＤＭ１培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を３７℃で３～４日間インキュベートした。
３．培養のスケールアップ：１０～１１日目に生じる。培養のスケールアップ中に、Ｇ－ＲＥＸ１００ＭＣＳの全内容物を、いずれの場合も３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した４ＬのＣＭ４またはＤＭ２を含むＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳフラスコに移した。採取するまでフラスコを３７℃で５～６日間インキュベートした。
４．採取／洗浄／配合：１６～１７日目に、フラスコを体積低下させ、プールする。細胞を濃縮し、１％ＨＳＡを含有するＰｌａｓｍａＬｙｔｅ Ａ ｐＨ７．４で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、ＣｒｙｏＳｔｏｒ１０と１：１の比で配合し、３００ＩＵ／ｍＬの最終濃度までｒｈＩＬ－２を補充した。
【３１２０】
ＤＰを制御速度凍結で凍結保存し、気相液体窒素中に貯蔵した。＊完全標準ＴＩＬ培地１、２、または４（ＣＭ１、ＣＭ２、ＣＭ４）は、上記のように、合成培地（ＤＭ１またはＤＭ２）と称されるＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ細胞無血清拡張培地の代用となり得た。
【３１２１】
プロセスの説明。０日目に、腫瘍を３回洗浄し、その後、３×３×３の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、３つのプールに分割した。１つのランダム化断片プールを各群に導入し、３つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。
【３１２２】
全ＴＩＬ拡張プロセスにわたって、腫瘍Ｌ４０６３拡張を標準培地で行い、腫瘍Ｌ４０６４拡張を合成培地（ＣＴＳ ＯｐＴｍｉｚｅｒ）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。
【３１２３】
ＣＭ１完全培地１：２ｍＭ ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、１０％ヒトＡＢ血清、ゲンタマイシン（５０ｕｇ／ｍＬ）、２－メルカプトエタノール（５５ｕＭ）を補充したＲＰＭＩ＋グルタミン。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地配合物。
【３１２４】
ＣＭ２完全培地２：５０％ ＣＭ１培地＋５０％ ＡＩＭ－Ｖ培地。６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地配合物。
【３１２５】
ＣＭ４完全培地４：ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）を補充したＡＩＭ－Ｖ。３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終培地配合物。
【３１２６】
ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）を補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。
【３１２７】
ＤＭ１：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ

Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終配合物。

【３１２８】

ＤＭ２：ＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ（２６ｍＬ／Ｌ）、及びＣＴＳ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｅｌｌ ＳＲ（３％）をＧｌｕｔａＭａｘ（商標）（２ｍＭ）とともに補充したＣＴＳ（商標）ＯｐＴｍｉｚｅｒ（商標）Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｅｘｐａｎｓｉｏｎ Ｂａｓａｌ Ｍｅｄｉｕｍ。３，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を補充した最終配合物。

【３１２９】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち、完全培地（ＣＭ）及び合成培地（ＤＭ）を事前に調製し、使用前日まで４℃で保持し、プロセス日前に事前に最長２４時間にわたってインキュベーター内で３７℃で温めた。

【３１３０】

ＴＩＬ培養再活性化は、両方の腫瘍で７日目に起こった。スケールアップは、Ｌ４０６３では１０日目、Ｌ４０６４では１１日目に起こった。両方の培養物を採取し、１６日目に凍結保存した。

【３１３１】

達成した結果。Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスの細胞数及び生存率％を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

【３１３２】

腫瘍毎に、断片を同数の３つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。３つの異なるプロセスについて、総生細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、７日目の再活性化のＴＶＣ、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップのＴＶＣ、及び１６／１７日目の採取時のＴＶＣとして決定した。

【３１３３】

７日目及び１０／１１日目の細胞数をＦＩＯで測定した。倍率拡張を、１６／１７日目の採取時のＴＶＣを７日目の再活性化日のＴＶＣで割ることによって計算した。３つの群を比較するために、採取日のＴＶＣを、０日目の培養物中に添加した断片の数で割って、１断片当たりの生細胞の平均を計算した。

【３１３４】

Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、細胞数及び生存率アッセイを行った。Ｇｅｎ３．１－試験プロセスは、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０プロセスよりも多くの１断片当たりの細胞数をもたらした。

【３１３５】

総生細胞数及び倍率拡張、プロセス中の生存率％。再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率％を行った。１６／１７日目の採取日に、最終ＴＶＣを生存率％の放出基準と比較した。評価したすべての条件は、７０％の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

【３１３６】

免疫表現型決定－ＴＩＬ最終産物の表現型特徴付け。最終産物をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、すべての条件で、ＴＣＲα／β細胞、ＣＤ４＋細胞、及びＣＤ８＋細胞で一貫していた。

【３１３７】

ＲＥＰ ＴＩＬの拡張表現型分析を行った。ＴＩＬ産物は、両方の腫瘍でＧｅｎ３．０と比較してＧｅｎ３．１条件でより高いＣＤ４＋細胞パーセンテージを示し、両方の条件でＧｅｎ３．１条件と比較してＧｅｎ３．０でより高いＣＤ８＋集団由来のＣＤ２８＋細胞パーセンテージを示した。

【３１３８】
Ｇｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスから採取したＴＩＬは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞でのＣＤ２７及びＣＤ５６発現、ならびにＣＤ４＋ゲート細胞集団での同等のＣＤ２８発現と同等の表現型マーカーを示した。ＴＩＬ最終産物のメモリーマーカーの比較：
【３１３９】
１６日目に採取したＴＩＬの凍結試料を分析のために染色した。ＴＩＬメモリーステータスは、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。ＴＩＬ最終産物の活性化及び疲弊マーカーの比較：
【３１４０】
活性化及び疲弊マーカーは、ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞上でゲートされたＧｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間で同等であった。
【３１４１】
再刺激時のインターフェロンガンマ分泌。採取したＴＩＬは、Ｌ４０６３及びＬ４０６４用のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激を受けた。Ｇｅｎ３．０プロセスと比較して、分析した２つの腫瘍で、より高いＧｅｎ３．１プロセスからのＩＦＮγ産生が観察された。
【３１４２】
培養培地中のＩＬ－２レベルの測定。すべての条件及びプロセス間のＩＬ－２消費レベルを比較するために、細胞上清を、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）／１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。
【３１４３】
全体的なＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のＩＬ－２消費に関して同等であった。Ｌ４０６３及びＬ４０６４用に収集した使用済み培地のＩＬ－２濃度（ｐｇ／ｍＬ）分析。
【３１４４】
代謝物分析。使用済み培地の上清を、Ｌ４０６３及びＬ４０６４について、すべての条件で、７日目の再活性化の開始時、１０日目（Ｌ４０６４）または１１日目（Ｌ４０６３）のスケールアップ時、及び１６／１７日目の採取時に、Ｌ４０６３及びＬ４０６４から収集した。上清をＣＥＤＥＸバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。
【３１４５】
合成培地は、完全培地（２ｇ／Ｌ）と比較してより高いグルコース濃度４．５ｇ／Ｌを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でＧｅｎ３．０プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスにおいて同等であった。
【３１４６】
乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Ｇｅｎ３．０条件とＧｅｎ３．１条件との間、及び再活性化拡張に使用した２つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。
【３１４７】
いくつかの事例では、標準基礎培地は、２ｍＭのＬ－グルタミンを含有し、培養条件下でＬ－グルタミンのＬ－グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）で補充された。
【３１４８】
いくつかの事例では、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にＬ－グルタミンを含有せず、最終濃度が２ｍＭになるまでＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみで補充された。ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）は、Ｌ－アラニンとＬ－グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でＬ－グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分解しない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低い

が十分な濃度のＬ－グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。
【３１４９】
いくつかの事例では、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。Ｌ４０６４の場合、グルタミン濃度及びＧｌｕｔａＭａｘ（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。
【３１５０】
アンモニア濃度は、２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、２ｍＭのグルタミン＋２ｍＭのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。さらに、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。３つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。
【３１５１】
Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨによるテロメア反復。Ｆｌｏｗ－ＦＩＳＨ技術を使用して、Ｇｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセス下でのＬ４０６３及びＬ４０６４のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（ＲＴＬ）の決定を、ＤＡＫＯ製のフローサイトメトリー分析用Ｔｅｌｏｍｅｒｅ　ＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（１３０１白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したＧｅｎ３プロセス及びＧｅｎ３．１プロセスは、同等のテロメア長を示した。
【３１５２】
ＴＣＲ　Ｖβレパートリー分析
各プロセスで生成された細胞産物のクローン多様性を決定するために、ＴＩＬ最終産物をＴ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。
【３１５３】
３つのパラメータを３つの条件間で比較した。
●固有のＣＤＲ３（ｕＣＤＲ３）の多様性指数
●ｕＣＤＲ３共有％
●ｕＣＤＲ３の上位８０％の場合：
○共有されるｕＣＤＲ３コピーの％を比較する
○固有のクロノタイプの頻度を比較する
【３１５４】
対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞産物で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：９７５個の配列がＧｅｎ３試験最終産物とＧｅｎ３．１試験最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８８％に相当する。
【３１５５】
対照及びＧｅｎ３．１試験、ＴＩＬで採取した細胞産物で共有される固有のＣＤＲ３配列パーセンテージ：２１６３個の配列がＧｅｎ３試験最終産物とＧｅｎ３．１試験最終産物との間で共有され、Ｇｅｎ３．１と共有されるＧｅｎ３由来の固有のＣＤＲ３配列の上位８０％の８７％に相当する。
【３１５６】
異なるプロセスについて、１６日目の採取時に収集した1×10^{6}個の細胞から特定された固有のＣＤ３配列の数。Ｇｅｎ３．１試験条件は、試料内の固有のペプチドＣＤＲの数に基づいて、Ｇｅｎ３．０と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。
【３１５７】
シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックであり、両方の腫瘍に対するＧｅｎ３．１条件は、Ｇｅｎ３．０プロセスよりもわずかに高

い多様性を示し、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーがｇｅｎ３．０プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【３１５８】

加えて、Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＣＲ　Ｖβレパートリーは、腫瘍Ｌ４０６３及びＬ４０６４の両方でＧｅｎ３．０プロセスの対応するレパートリーと８７％を超える重複を示した。

【３１５９】

再活性化日のＧｅｎ３．１試験Ｌ４０６４の使用済み培地のＩＬ－２濃度の値は、期待値を下回った（Ｇｅｎ３．１対照及びＧｅｎ３．０条件と同様であった）。

【３１６０】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取できなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。

【３１６１】

結論。０日目のフィーダー及びＯＫＴ－３を含むＧｅｎ３．１試験条件は、Ｇｅｎ３．０及びＧｅｎ３．１対照と比較して、１６日目の採取時の細胞用量のＴＶＣがより高いことを示した。Ｇｅｎ３．１試験条件のＴＶＣ最終産物は、Ｇｅｎ３．０よりも約２．５倍高かった。

【３１６２】

試験した腫瘍試料の両方について、０日目にＯＫＴ－３及びフィーダーを添加したＧｅｎ３．１試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、０日目に最大４つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、８０～１００×10^9ＴＩＬである可能性があった。

【３１６３】

最終ＴＩＬ産物の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Ｇｅｎ３．１試験とＧｅｎ３．０プロセスとの間で維持された。

【３１６４】

最終ＴＩＬ産物のＩＦＮ－γ産生は、分析した２つの腫瘍において、Ｇｅｎ３．０と比較して、０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１で３倍高く、Ｇｅｎ３．１プロセスが強力なＴＩＬ産物を生成したことを示唆する。

【３１６５】

試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Ｇｅｎ３．０プロセスとＧｅｎ３．１プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地へのＧｌｕｔａＭａｘ（商標）のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。

【３１６６】

１１日目及び１０日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Ｇｅｎ３．０最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。

【３１６７】

０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３を添加したＧｅｎ３．１プロセスは、Ｇｅｎ３．０と比較して、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【３１６８】

図３２は、Ｇｅｎ３プロセス（Ｇｅｎ３最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地及びＣＴＳオプティマイザ無血清培地を、Ｇｅｎ３最適化プロセスＴＩＬ拡張に使用することができる。ＣＴＳオプティマイザの場合、培地のＧｌｕｔａＭａｘ（商標）を最終濃度４ｍＭに増加させるために無血清培地が推奨される。

【３１６９】
実施例１１：進行性固形腫瘍患者におけるＩＬ－１５アゴニストと併用した自己腫瘍浸潤リンパ球
この実施例では、ＴＩＬ及びＩＬ－１５アゴニストを用いて患者（すなわち、対象）を治療するための方法について説明する。上記の実施例７または９に記載されるようなＧｅｎ２プロセスを使用して、ＴＩＬ産物を患者の腫瘍試料から拡張する。
【３１７０】
適応症
承認された標準治療の選択肢に失敗した（または、標準治療の選択肢に失敗する前に研究デザインにより適格とされた場合）進行性固形腫瘍を有し、適切な放出基準を用いて製造され放出可能なＴＩＬ生成物を有し、コホートにより定義される、ＴＩＬ細胞療法レジメンの適格性基準を満たす患者は、以下のコホートの基準に従ってＩＬ－２に加えてまたはＩＬ－２の代わりにＩＬ－１５アゴニストと併用してＴＩＬ細胞療法を受けるように登録される。
●コホート１：標準治療の選択肢に失敗した進行性固形腫瘍
●コホート１ａ：ＮＭＡＬＤ　５日間のレジメン：ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－５日目及び－４日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ^2、－５日目～－１日目）で構成される。
あるいは
●コホート１ｂ：ＮＭＡＬＤ　７日間のレジメン：ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－７日目及び－６日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ^2、－５日目～－１日目）で構成される。
ならびに
●ＩＬ－１５アゴニスト：Ｔ細胞活性を支持するための前臨床データに基づく様々な用量及びスケジュール
●前臨床データに基づくＩＬ－２または漸増用量のＩＬ－２なし
●コホート２：標準治療の選択肢に失敗した進行性固形腫瘍
●ＮＭＡＬＤ　４日間のレジメン（１）：低減された用量のＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－５日目、－４日目、－３日目、－２日目、及び４日目のフルダラビンＩＶ（３０ｍｇ／ｍ^2、－４日目～－１日目）のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う４日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（７５０ｍｇ／ｍ^2）で構成される。
●ＮＭＡＬＤ　４日間のレジメン（２）：低減された用量のＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－４日目、－３日目、－２日目、及び－４日目のフルダラビンＩＶ（３０ｍｇ／ｍ^2、－４日目～－１日目）のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う４日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（７５０ｍｇ／ｍ^2）で構成される。
●ＩＬ－１５アゴニスト：Ｔ細胞活性を支持するための前臨床データに基づく様々な用量及びスケジュール
●前臨床データに基づくＩＬ－２または漸増用量のＩＬ－２なし
●コホート３：標準治療の選択肢に失敗していない進行性固形腫瘍
●コホート３ａ：ＮＭＡＬＤ　５日間のレジメン：ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－５日目及び－４日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ^2、－５日目～－１日目）で構成される。
あるいは
●７日間のレジメン：ＮＭＡ　ＬＤレジメンは、－７日目及び－６日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ^2、－５日目～－１日目）で構成される。

●ＩＬ－１５アゴニスト：Ｔ細胞活性を支持するための前臨床データに基づく様々な用量及びスケジュール
●前臨床データに基づくＩＬ－２または漸増用量のＩＬ－２なし
●コホート４：標準治療の選択肢に失敗していない進行性固形腫瘍
●ＮＭＡＬＤ　４日間のレジメン：低減された用量のＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－５日目、－４日目、－３日目、－２日目、及び４日目のフルダラビンＩＶ（３０ｍｇ／ｍ^2、－５日目～－１日目）のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う４日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（７５０ｍｇ／ｍ^2）で構成される。
●ＩＬ－１５アゴニスト：Ｔ細胞活性を支持するための前臨床データに基づく様々な用量及びスケジュール
●前臨床データに基づくＩＬ－２または漸増用量のＩＬ－２なし

【３１７１】
処置：ＩＬ－１５アゴニストと併用した自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）。

【３１７２】
主な目的：
ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１を使用して、治験責任医師が評価した、及び／または独立審査委員会（ＩＲＣ）が評価した客観的奏効率（ＯＲＲ）によって決定した、従来の用量または低減された用量のＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行性固形腫瘍を有する患者に対するＩＬ－１５アゴニストと併用したＴＩＬ処置の有効性を評価すること。

【３１７３】
副次的目的：

【３１７４】
治験責任医師が評価した、従来の用量または低減された用量ＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行性固形腫瘍を有する患者に対するＩＬ－１５アゴニストと併用したＴＩＬ処置の有効性を評価すること（コホート１、２、３、及び４ならびに２のみ）。

【３１７５】
完全奏効率（ＣＲ）；奏効期間（ＤＯＲ）；疾患制御率（ＤＣＲ）；ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１を使用して、ＩＲＣ（コホート１及び２のみ）ならびに治験責任医師（すべてのコホート）によって評価された無増悪生存期間（ＰＦＳ）；ならびに全生存期間（ＯＳ）を使用して、従来の用量または低減された用量のＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行性固形腫瘍を有する患者に対するＩＬ－１５アゴニストと併用したＴＩＬ処置の有効性をさらに評価すること。

【３１７６】
グレード３以上の治療に起因する有害事象（ＴＥＡＥ）の発生率によって測定される、従来の用量または低減された用量のＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行性固形腫瘍を有する患者に対する、ＩＬ－１５アゴニストと併用したＴＩＬ処置の安全性プロファイルを特徴付けること。

【３１７７】
探索的目的：
ＴＩＬ処置の持続性を評価し、反応、転帰、及び毒性変数と相関し得る免疫相関を特定すること。

【３１７８】
それぞれの適応症固有の健康関連生活の質（ＨＲＱｏＬ）パラメータを評価すること。

【３１７９】
一次エンドポイント：
すべてのコホート：治験責任医師及び／またはＩＲＣによって評価されたＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１に従って評価されたＯＲＲ。

【３１８０】
二次エンドポイント：

すべてのコホート：重症度、重篤度、研究治療との関係、ならびに重篤な有害事象（ＳＡＥ）、治療関連有害事象、ならびに早期治療中止または評価期間からの離脱または死亡につながる有害事象を含む、ＴＥＡＥの特徴。

【３１８１】

すべてのコホート：ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１に従って、治験責任医師及び／またはＩＲＣによって評価された、ＣＲ率、ＤＯＲ、ＤＣＲ、及びＰＦＳ。

【３１８２】

すべてのコホート：ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１に従って、治験責任医師及び／またはＩＲＣによって評価された、ＯＲＲ、ＣＲ率、ＤＯＲ、ＤＣＲ、及びＰＦＳ（すべてのコホート）。

【３１８３】

すべてのコホート：ＯＳ

【３１８４】

探索的エンドポイント：

ＴＩＬ産物を含むＴ細胞のインビボ持続性は、経時的に各患者の血液中のＴＩＬ産物特異的Ｔ細胞受容体－ベータ相補性決定領域３（ＣＤＲ３）配列の存在を監視することによって評価される。ディープシーケンシングを使用して特定される産物及び末梢血液試料中に存在するＣＤＲ３配列。

【３１８５】

ＴＩＬ処置の活性の予測及び薬力学的臨床バイオマーカーの同定を目的とした探索的エンドポイント：

●ＴＩＬの表現型及び機能的特徴
●腫瘍組織の免疫プロファイル
●ＴＩＬ産物、腫瘍組織、及び／またはＰＢＭＣの遺伝子発現プロファイル
●腫瘍の変異ランドスケープ
●循環免疫因子
●ＰＢＭＣの免疫組成物

【３１８６】

欧州がん研究治療機関（ＥＯＲＴＣ）の生活の質質問票（ＱＬＱ）Ｃ３０及びＱＬＱ ＬＣ１３によって評価されたＨＲＱｏＬ。

【３１８７】

研究設計

従来の用量または低減された用量のＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行性固形腫瘍を有する患者に対する、ＩＬ－１５アゴニストと併用したＴＩＬ処置による養子細胞療法（ＡＣＴ）を評価する有望な、非盲検、マルチコホート、非ランダム化、多施設第１／２相研究。

【３１８８】

すべての患者は、以下のステップからなるＴＩＬ療法を受ける。

１．ＴＩＬの供給源として機能する自己組織を提供するための採取（研究コホートに応じて、外科的切除またはコア生検）。再処置される患者（コホート４）は、いずれかの採取方法を受けることができる。

２．中央適正製造規範（ＧＭＰ）施設におけるＴＩＬ治験薬（ＩＰ）の製造

３．５日間または７日間または低減された用量の新規の骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）前処置レジメン

４．ＴＩＬ産物の注入（０日目）

５．ＩＬ－２の投与を含まない、６回以下の用量のＩＶインターロイキン－２（ＩＬ－２）の投与。

６．ＩＬ－１５アゴニストの投与（前臨床データに基づいて決定される予定）

【３１８９】

別段の指定がない限り、以下の一般的な連続期間が４つのコホートすべてで発生する。

１．スクリーニング期間：インフォームドコンセントフォーム（ＩＣＦ）の署名から登録まで
２．治療前期間：登録から調製ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始まで。
３．治療期間：調製ＮＭＡ－ＬＤの開始から治療終了（ＥＯＴ）来院まで。これは、ＮＭＡ－ＬＤ（－７日目～－１日目または－５日目～－１日目）、ＴＩＬ注入（０日目）、続いてＩＬ－２投与（０日目または１日目～　３日目または４日目）、またはＩＬ－２＋　ＩＬ－１５アゴニスト投与を含まない、８～９日間の治療（用量及び治療スケジュールの表を参照）で構成される。ＥＯＴは、０日目のおよそ３０日後に起こる。
４．治療後のフォローアップ期間。これは以下で構成されている。
ａ．治療後有効性フォローアップ期間（ＴＥＦＵ）：疾患の進行または新しい抗がん療法の開始のいずれか早い方によって引き起こされる、ＥＯＴ来院から最終有効性評価来院（有効性評価終了［ＥＯＥＡ］来院）まで。
ｂ．長期フォローアップ期間（ＬＴＦＵ）：上記のようなＥＯＥＡから研究完了まで。

【３１９０】
研究参加者（登録患者）は、早期にＬＴＦＵに移行することができる（例えば、同意の部分的撤回、または何らかの理由でＴＩＬ療法を受けないと判断された場合）。研究の早期中止は、同意撤回、死亡、フォローアップ不能、または研究終了のいずれかによって促される。
【３１９１】
用量及び治療スケジュール：ＴＩＬ療法
患者は、０日目に予定されているＴＩＬ注入の前に開始される５日間または７日間のまたは新規の前処置ＮＭＡ－ＬＤレジメンを受ける。
【３１９２】
５日間のレジメン：ＮＭＡ　ＬＤレジメンは、－５日目及び－４日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ２、－５日目～－１日目）で構成される。
【３１９３】
７日間のレジメン：ＮＭＡ　ＬＤレジメンは、－７日目及び－６日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ２、－５日目～－１日目）で構成される。
【３１９４】
低減された用量のＮＭＡ－ＬＤレジメン：低減された用量のＮＭＡ－ＬＤは、－５日目、－４日目、－３日目、－２日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う４日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（７５０ｍｇ／ｓｑ．ｍ）、及び４日目のフルダラビンＩＶ（３０ｍｇ／ｍ^2、－５日目～－１日目）で構成される。
【３１９５】
６００，０００ＩＵ／ｋｇの用量でのＩＬ－２　ＩＶ投与は、０日目のＴＩＬ注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに開始され得る。追加のＩＬ－２用量は、およそ８～１２時間毎に、最大６回の総用量で与えられる。一部の患者は、コホートに応じてＩＬ－２を得ない場合がある。
【３１９６】
すべての患者は、ＩＬ－１５アゴニストを服用する：投与量及びスケジュールは、前臨床データによって決定され、コホートに基づいて決定される
【３１９７】
参加期間。全体として、研究参加期間は、治療から完了まで最大５年となる。
包含基準
【３１９８】

研究に参加する資格を得るためには、患者は、登録前に以下の包含基準をすべて満たしていなければならない。

１．保護された健康情報の使用及び開示について、書面によるインフォームドコンセント及び書面による承認を提供する。

２．同意時に１８歳以上である。

３．組織学的または病理学的に固形腫瘍の確定診断を受けたことがある。

４．ケア療法の標準に失敗した患者、またはコホートに基づいて、一部の患者は、以前に治療され得るが、ケア療法のすべての標準に失敗したわけではない。

ａ．アジュバントまたはネオアジュバント設定における、または決定的な化学放射線療法の一部としての以前の全身療法は、疾患がそのような療法の完了の間または１２カ月以内に進行しなかった場合、治療選択として計数されない。

５．運動耐性が予想される年齢の正常範囲の８５％以上であり、虚血または臨床的に重大な不整脈の兆候または症状はない。

６．米国東海岸がん臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、治験責任医師の意見において、推定平均余命は６カ月超である。

７．すべてのコホート：ＴＩＬ生成のために、直径が最小１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有する。

ａ．患者は、単一のＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１測定可能な病変を有し、外科的採取のために利用可能な追加の病変がないか、またはＴＩＬ生成のために安全に外科的採取を受けることができないが、ＴＩＬ生成のために十分な放射線学的ガイド付きコア生検を介して安全に腫瘍採取を有することができる場合。

ｂ．採取を検討した病変が以前に照射された領域内にある場合、病変は、採取前にＸ線画像による進行を示し、照射は登録の少なくとも３カ月前に完了していなければならない。患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない（セクション５．１８を参照）。

８．ＴＩＬ製造のための腫瘍採取後、すべての患者は、以下の事項を考慮して、ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１によって定義されるように、少なくとも１つの残りの測定可能な病変を有していなければならない。

ａ．以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で進行が示され、照射が登録の少なくとも３カ月前に完了していない限り、標的病変として選択されるべきではない。

ｂ．ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１毎に依然として測定可能なＴＩＬ生成のために外科的に部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができない。

ｃ．ＴＩＬ生成のコア生検に他の病変が利用できない場合、単一のＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１測定可能病変が、コア生検の採取部位及び応答モニタリングの病変の両方として機能し得る。

９．検査室での検査の前に、少なくとも５日間、輸血及び／または血液生成物のサポートとは無関係に、以下の血液学的パラメータを有する：

ａ．絶対好中球数（ＡＮＣ）≧１０００／ｍｍ３

ｂ．ヘモグロビン≧９．０ｇ／ｄＬ

ｃ．血小板数≧１００，０００／ｍｍ３

１０．以下の実験室での値で適正な臓器機能を有する：

ａ．血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、正常上限の≦３倍（≦３倍×ＵＬＮ）、肝転移が≦５倍×ＵＬＮの患者。

ｂ．スクリーニング時にコッククロフト・ゴールト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス（ｅＣｒＣｌ）≧４０ｍＬ／分。

ｃ．総ビリルビン≦２ｍｇ／ｄＬ、ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン≦３ｍｇ／ｄＬを有しなければならない。

１１．＞４５％の左心室駆出率（ＬＶＥＦ）を有し、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）クラス１である。心臓の負荷試験は、すべての患者に必要であり、不可逆的な壁の動きの異常を示さないこと。患者が、治験依頼者の医療モニターの承認を得て、駆出率及び心臓病クリアランスが十分であれば、心臓の負荷試験に異常がある患者を登録し得る。

１２．スクリーニング肺機能検査（ＰＦＴ）は、以下のうちのいずれかを有する患者に必要である。

ａ．２０パック以上／年の喫煙歴

ｂ．過去２年以内に喫煙をやめた、またはまだ喫煙している

ｃ．慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の病歴

ｄ．呼吸機能障害の任意の兆候または症状

●気管支拡張剤後の値：強制呼気量（ＦＥＶ１）／強制肺活量（ＦＶＣ）が７０％超またはＦＥＶ１予測正常値が５０％超であることが、治験参加に必要である。

●患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺活量測定を行うことができない場合は、６分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価され得る。年齢及び性別に対して予測される少なくとも８０％の距離を歩くことができない患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示す患者（ＳｐＯ２＜９０％）は除外される。

１３．登録前に、最低２１日間の以前の全身抗がん療法からのウォッシュアウト期間を有する必要がある。

●緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、すべての放射線関連毒性がグレード１またはベースラインに解決される場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可される。

●手術／事前に計画された手順（複数可）：創傷治癒が起こり、すべての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも１４日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可される。

１４．脱毛症または白斑を除いて、以前のすべての抗がん治療関連有害事象（ＴＲＡＥ）からグレード１以下（有害事象の一般用語基準［ＣＴＣＡＥ］、バージョン５．０による）に回復していなければならない。

●以前の抗がん療法から安定したグレード２以上の毒性を有する患者は、医療モニターと相談した後、ケースバイケースで検討され得る。

１５．妊娠可能性のある患者または妊娠可能性のあるパートナーがいる患者は、治療中及びすべてのプロトコル関連療法を受けてから１２カ月間、承認された非常に効果的な避妊方法を実践しなければならない。承認された避妊方法は、以下の通りである。

ａ．排卵の抑制に関連する併用（エストロゲン及びプロゲステロン含有）ホルモン避妊：経口、膣内、経皮

ｂ．排卵の抑制に関連するプロゲステロンのみのホルモン避妊：経口、注射可能、移植可能

ｃ．子宮内避妊器具（ＩＵＤ）

ｄ．子宮内ホルモン放出システム（ＩＵＳ）

ｅ．卵管両側閉塞

ｆ．精管切除パートナー

ｇ．患者の好ましい通常のライフスタイルに沿った真の絶対的な性的禁欲。定期的な禁欲（例えば、カレンダー排卵、症候性、排卵後の方法）は容認できない。

【３１９９】

除外基準

研究に参加する資格を得るためには、患者は、登録前に以下の基準のうちのいずれも満たさなければならない。

１．過去２０年以内に骨髄非破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けている。ＴＩＬ療法で再治療されている患者は、

以前のＮＭＡ－ＬＤのために除外されない。
２．以下の事項を考慮して、症候性及び／または未治療の脳転移を有する：
ａ．過去に（研究参加に同意する前に）脳転移が根治的に治療された患者は、登録前に患者が２週間以上にわたって臨床的に安定し、スクリーニング磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）による新たな脳病変がなく、患者が継続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、登録が検討される。
ｂ．最近（登録前の２８日以内）に脳転移が根治的に治療された患者は、登録前に転移が無症候性であり、患者が２週間以上にわたって臨床的に安定している場合、医療モニターと話し合った後に登録が検討される。ＮＭＡ－ＬＤの開始前に、以下のことが必要とされる：新たなまたは増加する脳病変がないことを実証する治療後少なくとも４週間の繰り返し脳ＭＲＩ、及び患者が２週間以上にわたって臨床的に安定しており、継続的なステロイド治療を必要としないことの確認。
３．全身ステロイド療法である１０ｍｇ／日超のプレドニゾンまたは他のステロイド当量を必要とする。１０ｍｇ／日以下のプレドニゾンまたは別のステロイド等価用量で副腎皮質不全の代替療法としてステロイドを受けている患者は、除外されない。
４．以下のうちのいずれかの血清学的証拠を有する：
ａ．ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）－１またはＨＩＶ－２。
ｂ．活動性または慢性Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）またはＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）感染の血清学的証拠。急性または慢性肝炎感染症の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によるウイルス負荷が活性治療の有無にかかわらず検出できない場合に登録することができる。
ｃ．梅毒（迅速血漿試薬［ＲＰＲ］試験または性病研究室［ＶＤＲＬ］）試験）。
ｄ．サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）抗体及びウイルス負荷ＰＣＲ；ならびに活動性感染を示すエプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）ＩｇＭ及びウイルス負荷ＰＣＲ。
ｅ．単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）－１及びＨＳＶ－２　ＩｇＭ血清学及びウイルス負荷ＰＣＲ。
５．妊娠中または授乳中である。
６．治験責任医師の意見では、研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば、全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする他の感染症）、凝固障害、心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患、または残存する肺障害を伴うＣＯＶＩＤ－１９感染症の病歴があり得る。
７．ＮＭＡ　ＬＤ開始前の２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けている。
８．何らかの形態の原発性免疫不全症（例えば、重症複合免疫不全症［ＳＣＩＤ］または後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］）を有する。
９．治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する。ＴＩＬ療法は、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、自己ＴＩＬ産物の配合物のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されるべきではない。
ａ．ＮＭＡ－ＬＤ（シクロホスファミド、メスナ、及びフルダラビン）
ｂ．Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標）、アルデスロイキン、ＩＬ－２、またはＩＬ－１５アゴニスト
ｃ．アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン［ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く］）。
ｄ．ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、ＩＬ－２、またはデキストラン４０を含むＴＩＬ産物の配合物の任意の成分。
１０．過去３年以内に別の原発性悪性腫瘍があった（治療を必要としない、または１年超前に治癒的に治療された腫瘍を除き、治験責任医師の判断では、非黒色腫皮膚癌、上皮内導管癌（ＤＣＩＳ）、上皮内小葉癌（ＬＣＩＳ）、６以下の前立腺癌グリーソンスコア、または表在性膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさない

）。
１１．治療開始から２１日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。
【３２００】
有効性評価
従来の用量または低減された用量のＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行固形腫瘍を有する患者に対する、ＩＬ－１５と併用したＴＩＬ療法の以下の有効性パラメータを各コホートで調査する：ＯＲＲ、ＣＲ率、ＤＯＲ、ＤＣＲ、ＰＦＳ、及びＯＳ。
【３２０１】
安全性評価
すべての研究参加者について、ＡＥ／ＳＡＥは、以下の研究期間中にＣＴＣＡＥ　ｖ５．０に従って収集され、格付けされる。スクリーニング、治療前、治療、及び治療後フォローアップ期間（該当する場合）。解析にはすべての研究期間が含まれ、各コホート毎に別々に行われる。
【３２０２】
実施例１２：ＩＬ－１５Ｒアゴニストを使用した凍結保存ＴＩＬ細胞療法の例示的修飾ＧＥＮ２産生
この実施例は、例示的な修飾Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスを示す。実施例９と同様に、修飾Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＴＩＬは、一般に、腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エクスビボで拡張された自己ＴＩＬで構成されている。Ｇｅｎ３プロセスのプライミングによる第１の拡張ステップは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養であり、照射された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共受容体ＣＤ３を標的とする。臨床投与のためのＩＬ－１５Ｒアゴニストの例示的な使用は、概して、Ｃｏｎｌｏｎ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．（２０２１）．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｆｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ，９（１１）、及びＷｒａｎｇｌｅ，Ｊ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．（２０１８）．Ｔｈｅ　Ｌａｎｃｅｔ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，１９（５），６９４－７０４に記載されており、それらの開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【３２０３】
Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのＲＥＰ前及びＲＥＰ拡張は、上記の手順に従う（例えば、実施例７及び９を参照）。
【３２０４】
上記のプロセスを使用して、ＴＩＬは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてＩＬ－２の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではＩＬ－２と、ＮＩＺ９８５、ＡＬＴ－８０３、ＸｍＡｂ３０６、ＮＫＴＲ－２５５、ＢＪ－００１、及びＣＹＰ０１５０から選択される任意の１つ以上のＩＬ－１５Ｒアゴニストとの組み合わせから成長させることができる。ＲＥＰ前の完了時に、培養物を、上記のように、拡張、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）、ならびにＴＣＲ　Ｖβレパートリーについて評価する。
【３２０５】
この処理の結果として、ＩＬ－２のみの条件と比較して、ＩＬ－２／ＩＬ－１５Ｒアゴニスト処理条件では、ＣＤ４$^{+}$細胞及びＣＤ８$^{+}$細胞の両方で、ＴＩＬ拡張が増強され得る。これは、ＩＬ－２単独で処理した培養物と比較して、ＩＬ－２／ＩＬ－１５Ｒアゴニストで処理した培養物から得られたＴＩＬには、歪んだＴＣＲ　Ｖβレパートリーを伴う主にＣＤ８$^{+}$集団への歪みを含み得る。Ｓｔｅｌｌａｓ　Ｄ，ｅｔ　ａｌ．（２０１９）Ｉｎ：Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ａｎｎｕａｌ　Ｍｅｅｔｉｎｇ　２０１９；２０１９　Ｍａｒ　２９－Ａｐｒ　３；Ａｔｌａｎｔａ，ＧＡ．Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ（ＰＡ）：ＡＡＣＲ；Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２０１９；７９（１３　Ｓｕｐｐｌ）：Ａｂｓｔｒａｃｔ　ｎｒ　３２５９を参照されたい。したがって、ＩＦＮ－γ及びＣＤ１０７ａなどの機能的マーカーは、ＩＬ－２単独で処理した培養物と比較して、ＩＬ－２／ＩＬ－１５Ｒアゴニストで処理した培養物を上昇させ得る。

【３２０６】
上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。
【３２０７】
実施例１３：転移性非小細胞肺癌を有する患者における自己腫瘍浸潤リンパ球＋Ｎ－８０３の研究
この実施例は、自己ＴＩＬ及びＩＬ－１５スーパーアゴニスト（Ｎ－８０３、ＩｍｍｕｎｉｔｙＢｉｏ）を有する転移性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者を治療するための第Ｉ相臨床試験を記載する。上記の実施例７または９に記載されるようなＧｅｎ２プロセスを使用して、ＴＩＬ産物を患者の腫瘍試料から拡張する。
【３２０８】
適応症
免疫チェックポイント阻害剤（ＣＰＩ）及び化学療法による全身療法中またはそれに続く疾患進行を有する作用可能なドライバー変異がない転移性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者。
【３２０９】
主な目的：
免疫チェックポイント阻害薬（ＣＰＩ）及び化学療法による全身療法中またはそれに続く疾患進行を有する作用可能なドライバー変異がない転移性ＮＳＣＬＣを有する患者におけるＴＩＬ及びＮ－８０３の組み合わせの安全性を評価すること。
【３２１０】
副次的目的：
ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１を使用して、ＯＲＲによって決定される、ＴＩＬ及びＮ－８０３の併用の有効性を評価すること。
【３２１１】
完全奏効率（ＣＲ）；奏効期間（ＤＯＲ）；疾患制御率（ＤＣＲ）；ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１を使用して、無増悪生存期間（ＰＦＳ）ならびに全生存期間（ＯＳ）を使用して、ＴＩＬ及びＮ－８０３の有効性の組み合わせをさらに評価すること。
【３２１２】
Ｎ－８０３のＰＫ。
【３２１３】
ＴＣＲの観点から適応性転移ＴＩＬの持続性を評価する。
【３２１４】
ＴＩＬ及びＮ－８０３の組み合わせで治療された患者において、ＴＩＬの適応的移行の持続性を評価し、反応、転帰、及び毒性に関連する免疫相関を探索することを特定する。
【３２１５】
研究設計
ＴＩＬとＮ－８０３の組み合わせによる養子細胞療法（ＡＣＴ）を評価する有望な、非盲検、非ランダム化、パイロット研究。
【３２１６】
これは、治療前、進行または転移性非小細胞肺癌を有する患者におけるＴＩＬと併用したＮ－８０３の第Ｉｂ相非盲検用量漸増研究である。この研究は、Ｎ－８０３とＴＩＬの組み合わせのＲＰ２Ｄを決定する。３つの用量レベルを、評価する。ＭＴＤ／ＲＰ２Ｄを決定すると、追加の患者が、用量拡張コホートに登録される。用量漸増コホート及び拡張コホートの両方について、合計２１人の患者を有する。この研究は、適正臨床規範（ＧＣＰ）に準拠して実施される。臨床試験スキーマを、図４１に示す。

【３２１７】
すべての患者は、以下のステップからなるＴＩＬ及びＮ－８０３療法を受ける。
１．ＴＩＬの供給源として機能する自己組織を提供するための採取（外科的切除）。組織の画分は、新規抗原反応性ＴＩＬの後の特徴付けのために消化され、冷凍されるであろう。
２．中央適正製造規範（ＧＭＰ）施設におけるＴＩＬ治験薬（ＩＰ）の製造
３．５日間の骨髄非破壊的リンパ球枯渇（ＮＭＡ－ＬＤ）前処置レジメン
４．ＴＩＬ産物の注入（０日目）
５．ＩＶインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）Ｎ－８０３　Ｑの５日間×３週間の投与。

【３２１８】
別段の指定がない限り、以下の一般的な連続期間がすべての患者で発生する。
１．スクリーニング期間：インフォームドコンセントフォーム（ＩＣＦ）の署名から登録まで
２．治療前期間：登録から調製ＮＭＡ－ＬＤレジメンの開始まで。
３．治療期間：調製ＮＭＡ－ＬＤの開始から、ＮＭＡ－ＬＤ（－５日目～－１日目）、ＴＩＬ注入（０日目）、続いてＩＬ－１５投与を含む、治療終了（ＥＯＴ）来院まで。ＥＯＴは、０日目のおよそ６５日後に起こる。
４．治療後のフォローアップ期間。これは以下で構成されている。
ａ．治療後有効性フォローアップ期間（ＴＥＦＵ）：疾患の進行時または新しい抗がん療法の開始のいずれか早い方によって引き起こされる来院として定義される、ＥＯＴ来院から最後の有効性評価訪問（有効性評価終了［ＥＯＥＡ］来院）まで。
ｂ．長期フォローアップ期間（ＬＴＦＵ）：上記のようなＥＯＥＡから研究完了まで。

【３２１９】
研究参加者（登録患者）は、早期にＬＴＦＵに移行することができる（例えば、同意の部分的撤回、または何らかの理由でＴＩＬとＮ－８０３の併用療法を受けないと判断された場合）。研究の早期中止は、同意撤回、死亡、フォローアップ不能、または研究終了のいずれかによって促される。

【３２２０】
用量及び治療スケジュール：ＴＩＬとＮ－８０３の併用療法
患者は、０日目（すなわち、－５日目～－１日目）にＴＩＬ及びＮ－８０３注入の予定された組み合わせの前に開始される５日間の前処置ＮＭＡ－ＬＤレジメンを受ける。ＮＭＡ－ＬＤレジメンは、－５日目及び－４日目のメスナ（現場の標準治療またはＵＳＰＩ／ＳｍＰＣ毎）を伴う２日間の静脈内（ＩＶ）シクロホスファミド（６０ｍｇ／ｋｇ）、及び５日間のフルダラビンＩＶ（２５ｍｇ／ｍ２、－５日目～－１日目）で構成される。Ｎ－８０３は、０日目のＴＩＬ注入の完了の３時間後、ただし２４時間後までに皮下に開始され得る。追加のＮ－８０３用量は、５日毎に、最大３回の総用量で与えられる。

【３２２１】

【表６６】

	-5	-4	-3	-2	-1	0	5	10
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ	X	X						
フルダラビン 25mg/m^2	X	X	X	X	X			
TIL 注入						X		
N-803 20μg/kg 皮下						X	X	X

【３２２２】
参加期間
全体として、研究参加期間は、治療から完了まで最大５年となる。
【３２２３】
包含基準
研究に参加する資格を得るためには、患者は、登録前に以下の包含基準をすべて満たしていなければならない。
１．保護された健康情報の使用及び開示について、書面によるインフォームドコンセント及び書面による承認を提供する。
２．同意時に１８歳以上である。
３．ＮＳＣＬＣ（扁平上皮、非扁平上皮、腺癌、大細胞、または混合組織型）の組織学的または病理学的に確定された診断を受けており、受けたＣＰＩ治療の前に腫瘍割合スコア（ＴＰＳ）によって決定されたＰＤ－Ｌ１発現状態が記録されていなければならない。
４．ＣＰＩ及び化学療法を含む全身療法を受けており、放射線疾患の進行が記録されている。
アジュバントまたはネオアジュバント設定における、または決定的な化学放射線療法の一部としての以前の全身療法は、疾患がそのような療法の完了の間または１２カ月以内に進行しなかった場合、治療選択として計数されない。
５．虚血または臨床的に重大な不整脈の徴候または症状はないことが文書化されている。
６．米国東海岸がん臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ、ＥＣＯＧ）のパフォーマンスステータスは０または１であり、推定平均余命は６カ月超である。
７．ＴＩＬ生成のために、直径が最小１．５ｃｍの切除可能な病変（または凝集病変）を少なくとも１つ有する。
採取を検討した病変が以前に照射された領域内にある場合、病変は、採取前にＸ線画像による進行を示し、照射は登録の少なくとも３カ月前に完了していなければならない。患者は、プロトコルが必要とする検査に適正な組織病理標本を有していなければならない。
８．ＴＩＬ製造のための腫瘍採取後、すべての患者は、以下の事項を考慮して、ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１によって定義されるように、少なくとも１つの残りの測定可能な病変を有していなければならない。
ａ．以前に照射された領域内の病変は、それらの病変で進行が示され、照射が登録の少なくとも３カ月前に完了していない限り、標的病変として選択されるべきではない。
ｂ．ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１毎に依然として測定可能なＴＩＬ生成のために外科的に部分的に切除された病変を、非標的病変として選択することができるが、応答評価の標的病変としては機能することができない。

９．検査室での検査の前に、少なくとも５日間、輸血及び／または血液生成物のサポートとは無関係に、以下の血液学的パラメータを有する：
ａ．絶対好中球数（ＡＮＣ）≧１０００／ｍｍ^3
ｂ．ヘモグロビン≧９．０ｇ／ｄＬ
ｃ．血小板数≧１００，０００／ｍｍ^3
１０．以下の実験室での値で適正な臓器機能を有する：
ａ．血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）、正常上限の≦３倍（≦３倍×ＵＬＮ）、肝転移が≦５倍×ＵＬＮの患者。
ｂ．スクリーニング時にコッククロフト・ゴールト式を使用して推定されたクレアチニンクリアランス（ｅＣｒＣｌ）≧４０ｍＬ／分。
ｃ．総ビリルビン≦２ｍｇ／ｄＬ、ジルベール症候群の患者は、総ビリルビン≦３ｍｇ／ｄＬを有しなければならない。
１１．＞４５％の左心室駆出率（ＬＶＥＦ）を有し、ニューヨーク心臓協会（ＮＹＨＡ）クラス１である。心臓の負荷試験は、すべての患者に必要であり、不可逆的な壁の動きの異常を示さないこと。駆出率及び心臓病クリアランスが十分であれば、心臓ストレス試験に異常がある患者を登録し得る。
１２．スクリーニング肺機能検査（ＰＦＴ）は、以下のうちのいずれかを有する患者に必要である。
ａ．２０パック以上／年の喫煙歴
ｂ．過去２年以内に喫煙をやめた、またはまだ喫煙している
ｃ．慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の病歴
ｄ．呼吸機能障害の任意の兆候または症状
気管支拡張剤後の値：強制呼気量（ＦＥＶ１）／強制肺活量（ＦＶＣ）が７０％超またはＦＥＶ１予測正常値が５０％超であることが、治験参加に必要である。
患者が上気道の解剖学的構造の異常（すなわち、気管切開）のために信頼できる肺活量測定を行うことができない場合は、６分間の歩行試験を使用して呼吸機能を評価され得る。年齢及び性別に対して予測される少なくとも８０％の距離を歩くことができない患者、または試験中の任意の時点で低酸素症の証拠を示す患者（SpO_2＜９０％）は除外される。
１３．登録前に、最低２１日間の以前の全身抗がん療法からのウォッシュアウト期間を有する必要がある。
緩和的放射線療法：脱毛症、皮膚色素沈着の変化、または他の臨床的に重要でない事象、例えば小領域放射線皮膚炎または直腸もしくは尿意切迫感を除いて、すべての放射線関連毒性がグレード１またはベースラインに解決される場合、以前の外部ビーム放射線療法が許可される。
手術／事前に計画された手順（複数可）：創傷治癒が起こり、すべての合併症が解消され、腫瘍切除の前に少なくとも１４日が経過している場合（主要な手術手順の場合）、以前の外科的手順（複数可）が許可される。
１４．脱毛症または白斑を除いて、以前のすべての抗がん治療関連有害事象（ＴＲＡＥ）からグレード１以下（有害事象の一般用語基準［ＣＴＣＡＥ］、バージョン５．０による）に回復していなければならない。
以前の抗がん療法から安定したグレード２以上の毒性を有する患者は、ケースバイケースで検討され得る。
１５．妊娠可能性のある患者または妊娠可能性のあるパートナーがいる患者は、治療中及びすべてのプロトコル関連療法を受けてから１２カ月間、承認された非常に効果的な避妊方法を実践しなければならない。承認された避妊方法は、以下の通りである。
ａ．排卵の抑制に関連する併用（エストロゲン及びプロゲステロン含有）ホルモン避妊：経口、膣内、経皮
ｂ．排卵の抑制に関連するプロゲステロンのみのホルモン避妊：経口、注射可能、移

植可能
ｃ．子宮内避妊器具（ＩＵＤ）
ｄ．子宮内ホルモン放出システム（ＩＵＳ）
ｅ．卵管両側閉塞
ｆ．精管切除パートナー
ｇ．患者の好ましい通常のライフスタイルに沿った真の絶対的な性的禁欲。定期的な禁欲（例えば、カレンダー排卵、症候性、排卵後の方法）は容認できない。
【３２２４】
除外基準
研究に参加する資格を得るためには、患者は、登録前に以下の基準のうちのいずれも満たさなければならない。
１．過去２０年以内に骨髄非破壊的または骨髄破壊的化学療法レジメンを含む、臓器同種移植または以前の細胞移植療法を受けている。
２．標的療法に感受性のあるがん遺伝子ドライバー変異（例えば、ＥＧＦＲ、ＡＬＫ、ＲＯＳ）を有する。
３．以下の事項を考慮して、症候性及び／または未治療の脳転移を有する：
ａ．過去（研究参加に同意する前）に脳転移が根治的に治療された患者は、登録前に患者が２週間以上にわたって臨床的に安定し、スクリーニング磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）による新たな脳病変がなく、患者が継続的なコルチコステロイド治療を必要としない場合、登録が検討される。
ｂ．最近（登録前の２８日以内）に脳転移が根治的に治療された患者は、登録前に転移が無症候性であり、患者が２週間以上にわたって臨床的に安定している場合、登録が検討される。ＮＭＡ－ＬＤの開始前に、以下のことが必要とされる：新たなまたは増加する脳病変がないことを実証する治療後少なくとも４週間の繰り返し脳ＭＲＩ、及び患者が２週間以上にわたって臨床的に安定しており、継続的なステロイド治療を必要としないことの確認。
４．全身ステロイド療法である１０ｍｇ／日超のプレドニゾンまたは他のステロイド当量を必要とする。１０ｍｇ／日以下のプレドニゾンまたは別のステロイド等価用量で副腎皮質不全の代替療法としてステロイドを受けている患者は、除外されない。
５．転移性ＮＳＣＬＣの診断以来、体重減少が１０％超である。
６．以下のうちのいずれかの血清学的証拠を有する：
ａ．ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）－１またはＨＩＶ－２
ｂ．活動性または慢性Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）またはＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）感染の血清学的証拠。急性または慢性肝炎感染症の患者は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によるウイルス負荷が活性治療の有無にかかわらず検出できない場合に登録することができる。
ｃ．梅毒（迅速血漿試薬［ＲＰＲ］試験または性病研究室［ＶＤＲＬ］）試験）。
ｄ．サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）免疫グロブリンＭ（ＩｇＭ）抗体及びウイルス負荷ＰＣＲ；ならびに活動性感染を示すエプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）ＩｇＭ及びウイルス負荷ＰＣＲ。
ｅ．単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）－１及びＨＳＶ－２　ＩｇＭ血清学及びウイルス負荷ＰＣＲ。
７．妊娠中または授乳中である。
８．研究参加のリスクが高い、活動性の医学的疾患（複数可）、例えば、全身性感染症（例えば、梅毒もしくは抗生物質を必要とする任意の他の感染症）、凝固障害、心臓血管系、呼吸器系、もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾患、または残存する肺障害を伴うＣＯＶＩＤ－１９感染症の任意の病歴があり得る。
９．ＮＭＡ－ＬＤ開始前の２８日以内に生ワクチン接種または弱毒化ワクチン接種を受けている。
１０．何らかの形態の原発性免疫不全症（例えば、重症複合免疫不全症［ＳＣＩＤ］ま

たは後天性免疫不全症候群［ＡＩＤＳ］）を有する。
１１．治験薬のいずれかの成分に対する過敏症の病歴を有する。ＴＩＬ及びＮ－８０３の組み合わせは、以下のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、自己ＴＩＬ産物の配合物のいずれかの成分に対する既知の過敏症を有する患者には投与されるべきではない。
ａ．ＮＭＡ－ＬＤ（シクロホスファミド、メスナ、及びフルダラビン）
ｂ．Ｎ－８０３
ｃ．アミノグリコシド系抗生物質（すなわち、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン［ゲンタマイシン過敏症の皮膚検査陰性者を除く］）。
ｄ．ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、またはデキストラン－４０を含むＴＩＬ産物の配合物の任意の成分。
１２．過去３年以内に別の原発性悪性腫瘍があった（治療を必要としない、または１年超前に治癒的に治療された腫瘍を除き、非黒色腫皮膚癌、上皮内導管癌（ＤＣＩＳ）、上皮内小葉癌（ＬＣＩＳ）、６以下の前立腺癌グリーソンスコア、または表在性膀胱癌を含むが、これらに限定されない重大な再発リスクをもたらさない）。
１３．治療開始から２１日以内に治験薬を用いた別の臨床試験への参加。
【３２２５】
有効性評価
従来の用量または減量のＮＭＡ－ＬＤによるＴＩＬ細胞療法を受けている進行固形腫瘍患者に対するＩＬ－１５と組み合わせたＴＩＬ療法の以下の有効性パラメータを各コホートで調査する：ＯＲＲ、ＣＲ率、ＤＯＲ、ＤＣＲ、ＰＦＳ、及びＯＳ。
【３２２６】
安全性評価
すべての研究参加者について、ＡＥ／ＳＡＥは、以下の研究期間中にＣＴＣＡＥ　ｖ５．０に従って収集され、格付けされる。スクリーニング、治療前、治療、及び治療後フォローアップ期間（該当する場合）。解析にはすべての研究期間が含まれ、各コホート毎に別々に行われる。
【３２２７】
すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。
【３２２８】
本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【３２２９】
当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

【図面】

【図１】

プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日

１．ステップＡ

患者の腫瘍試料を取得する

２．ステップＢ

断片化及び第１の拡張

３日～１４日

３．ステップＣ

第１の拡張から第２の拡張へと移行

保管及び閉鎖系なし

４．ステップＤ

第２の拡張

ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞

閉鎖系

５．ステップＥ

ステップＤからのＴＩＬを採取する

６．ステップＦ

最終製剤及び／または注入バッグへの移行

（任意選択で凍結保存）

【図２Ａ】

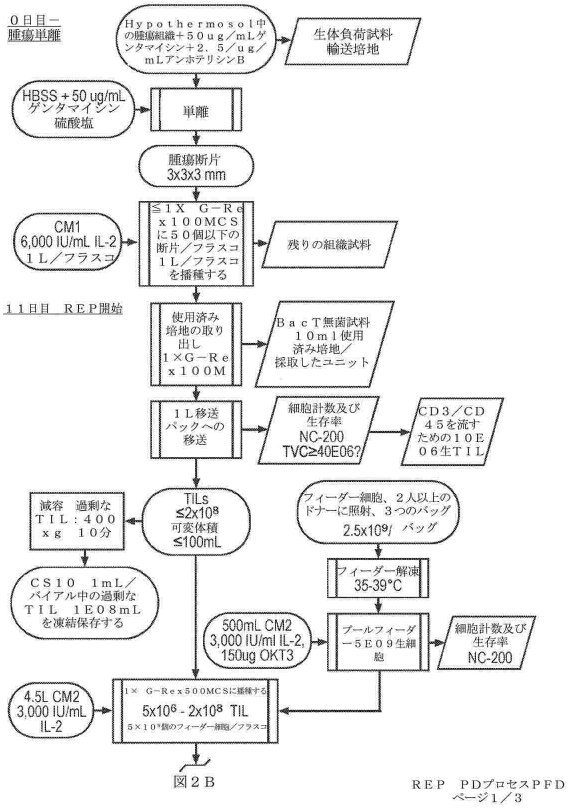
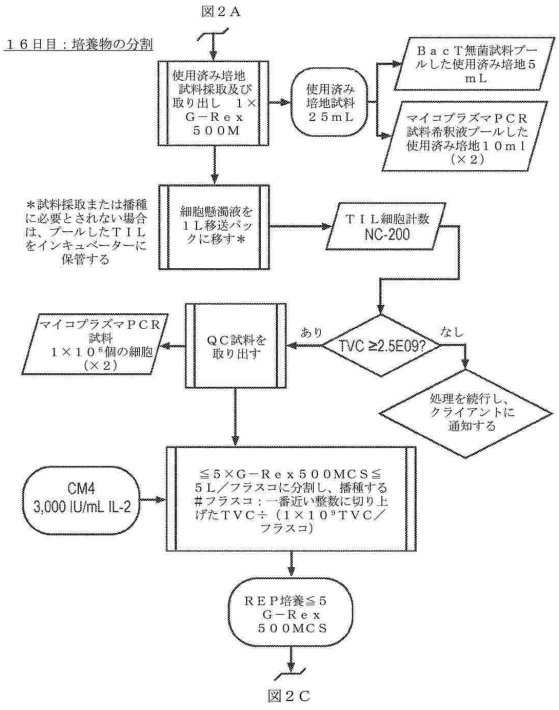


図２Ｂ

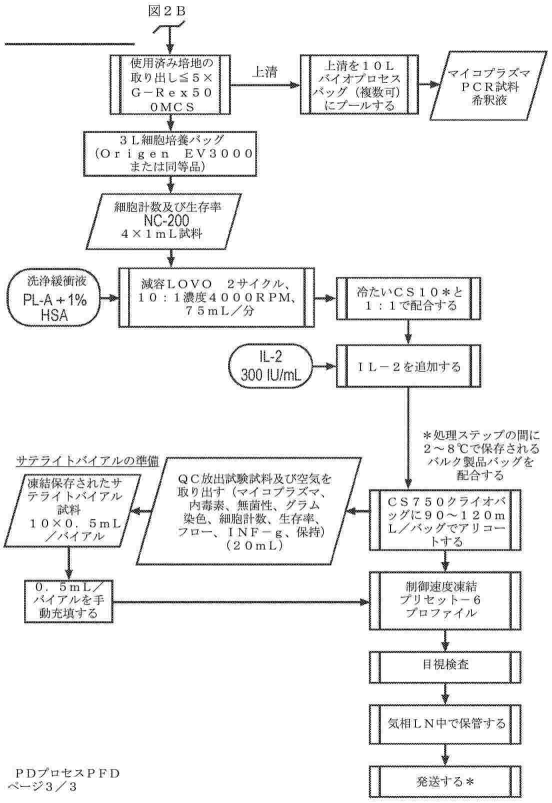
ＲＥＰ ＰＤプロセスＰＦＤ
ページ１／３

【図２Ｂ】



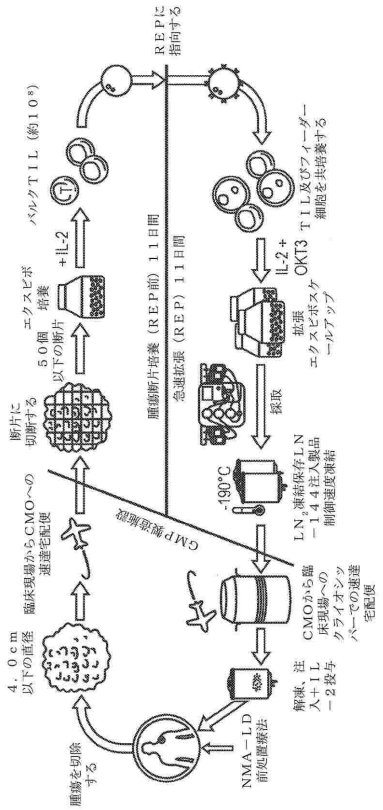
REP PDプロセスPFD
ページ2／3

【図２Ｃ】

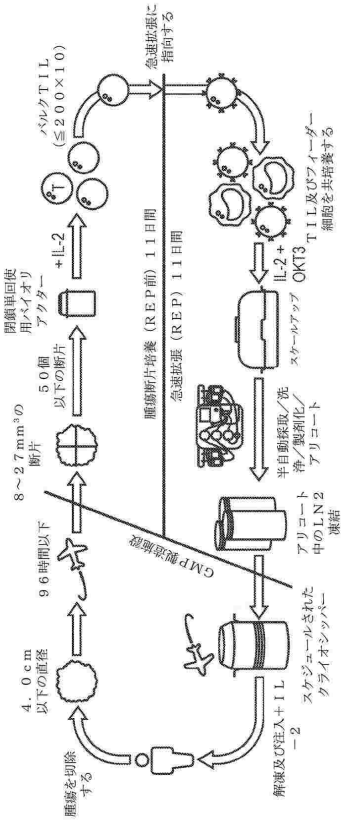


REP PDプロセスPFD
ページ3／3

【図３】



【図４】



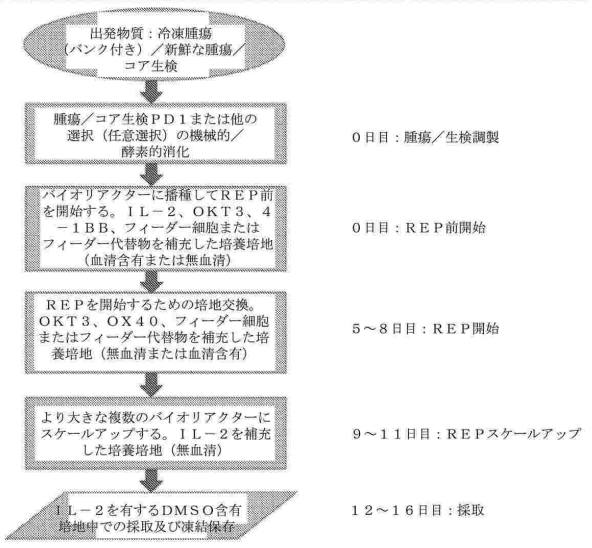
【図５】

プロセス１Ｃ：ステップＡ～Ｅについて４３～５５日	プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日
１．ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する	１．ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する
２．ステップＢ 断片化及び第１の拡張 １１日～２１日	２．ステップＢ 断片化及び第１の拡張 ３日～１４日
３．ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張へと移行 選択までの任意選択のストレージ	３．ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張へと移行 ストレージ及び閉鎖系なし
４．ステップＤ 第２の拡張 ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示 フィーダー細胞 任意選択で１回以上繰り返す	４．ステップＤ 第２の拡張 ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示 フィーダー細胞 閉鎖系
５．ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	５．ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する 閉鎖系
６．ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの 移行	６．ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す （任意選択で凍結保存する）

【図６】

プロセス ステップ	プロセス１Ｃ実施形態	プロセス２Ａ 実施形態	利点
ＲＥＰ前	•１０個のＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコ当たり４個の断片 •１１～２１日間	•１つのＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコ当たり４０個の断片 •１１日間	•フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 •培養時間の短縮 •ステップ数の削減 •閉鎖系に適している
ＲＥＰ前からＲＥＰへの移行	•ＲＥＰ前ＴＩＬを、選択のために表現型決定されるまで凍結し、次いで解凍してＲＥＰに進む（約３０日目） •ＲＥＰは、＞４０×１０^{6}ＴＩＬを必要とする	•ＲＥＰ前ＴＩＬは、１１日目に直接ＲＥＰに移動する •ＲＥＰは、２５～２００×１０^{6}ＴＩＬを必要とする	•ＲＥＰ前からＲＥＰプロセスの短縮 •ステップ数の削減 •表現型決定選択の排除 •閉鎖系に適している
ＲＥＰ	•ＲＥＰ　０日目に６つのＧＲＥＸ－１００Ｍフラスコ •ＲＥＰ　０日目に５×１０^{8}ＴＩＬ及び５×１０^{8}ＰＢＭＣフィーダー／フラスコ •ＲＥＰ　７日目に１８～３６個のフラスコに分割する •１４日間	•１１日目に１つのＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコ •１１日目に２５～２００×１０^{6}ＴＩＬ及び５×１０^{9}ＰＢＭＣフィーダー •１６日目に６つ以下のＧＲＥＸ－５００Ｍフラスコに分割する •１１日間	•ステップ数の削減 •ＲＥＰ期間の短縮 •フラスコ間のＴＩＬの閉鎖系移送 •閉鎖系培地交換
採取	•遠心分離によって採取したＴＩＬ	•ＬＯＶＯ自動細胞洗浄系を介して採取したＴＩＬ	•ステップ数の削減 •自動細胞洗浄 •閉鎖系 •洗浄中の製品損失の低減
最終製剤化	•Ｈｙｐｏｔｈｅｒｍｏｓｏｌ中の新鮮な製品 •単回注入バッグ •限定された発送安定性	•ＬＮ$_{2}$中で保管されたＰｌａｓｍａＬｙｔｅ－Ａ＋１％　ＨＳＡ及びＣＳ１０中の凍結保存製品 •複数のアリコート •より長い発送安定性	•発送の柔軟性 •柔軟な患者スケジューリング •よりタイムリーな放出試験
全体の推定プロセス時間	•　４３～５５日	•　２２日	•　患者へのより速い転向

【図７】



【図８Ａ】

プロセス２Ａ：ステップＡ～Ｅから約２２日	プロセスＧＥＮ３：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日
ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）	ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する （任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）
ステップＢ 第１の拡張 （ＩＬ－２を含む培地による約３日～１４日間成長させた容器当たり少なくとも４０個の断片への物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張 （ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～７日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）
ステップＣ 第１の拡張から第２の拡張への移行 （ステップＢのＴＩＬは、１１日目にステップＤ、任意選択でステップＢに直接移動）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行 （ステップＢのＴＩＬは、７日目にステップＤに直接移動）
ステップＤ 第２の拡張 （密閉容器内にＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ）	ステップＤ 急速な第２の拡張 （ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加）
ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する（閉鎖系を介して採取されたＴＩＬ）	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する
ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行 （任意選択で凍結保存）

【図８Ｂ】

プロセスＧＥＮ３：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する
（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）

ステップＢ
プライミングによる第１の拡張
（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～７日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）

ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行
（ステップＢのＴＩＬは、７日目にステップＤに直接移動）

ステップＤ
急速な第２の拡張
（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行

【図８Ｃ】

実施形態ＧＥＮ　３．０：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日	実施形態ＧＥＮ　３．１対照：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日	実施形態ＧＥＮ　３．１試験／Ｆ：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日
ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）	ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）	ステップＡ 患者の腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に凍結され得る）
ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約１日～７／８日間成長させた容器当たり最大６０個の断片の物理的断片化）
ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７日目／８日目にステップＤに直接移動）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７日目／８日目にステップＤに直接移動）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７日目／８日目にステップＤに直接移動）
ステップＤ 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ；１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加する）	ステップＤ 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ；１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加する）	ステップＤ 急速な第２の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ；１０～１１日目にスケールアップ及びさらなるＩＬ－２を添加する）
ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する
ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行（任意選択で凍結保存）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行（任意選択で凍結保存）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグへの移行（任意選択で凍結保存）

【図８Ｄ】

修正したＧｅｎ２様プロセス：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する
（任意に、ステップＢ前に凍結され得る、　任意に、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

ステップＢ１
初期培養
容器当たり最大６０個の腫瘍断片または最大１０個のコア／小生検の物理的断片化、ＩＬ－２を含む成長培地中で３日間成長したＴＩＬ

ステップＢ２
プライミングによる第１の拡張
ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地中で８日間成長したＴＩＬ）

ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、１１日目にステップＤに直接移動する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（体積を低下させ、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び５０倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地（ｍｅｄｉｕｍ）において成長したＴＩＬ、１６日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を添加する）

ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグへの移行
（任意選択で凍結保存）

【図８Ｅ】

ステップＡ
患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に冷凍され得る）

ステップＢ
第１の拡張（物理的断片化及び／または酵素消化；ＩＬ－２を含む培地中でＴＩＬを約３～９日間培養する）

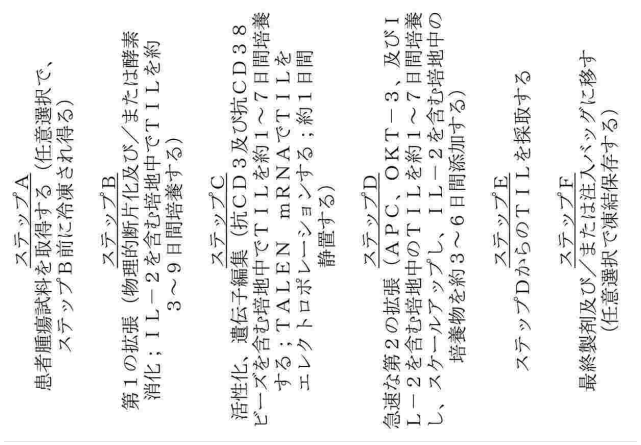
ステップＣ
活性化、遺伝子編集（抗ＣＤ３及び抗ＣＤ３８ビーズを含む培地中でＴＩＬを約１～７日間培養する；ＴＡＬＥＮ　ｍＲＮＡでＴＩＬをエレクトロポレーションする；約１日間静置する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（ＡＰＣ、ＯＫＴ－３、及びＩＬ－２を含む培地中でＴＩＬを約５～１５日間培養する）

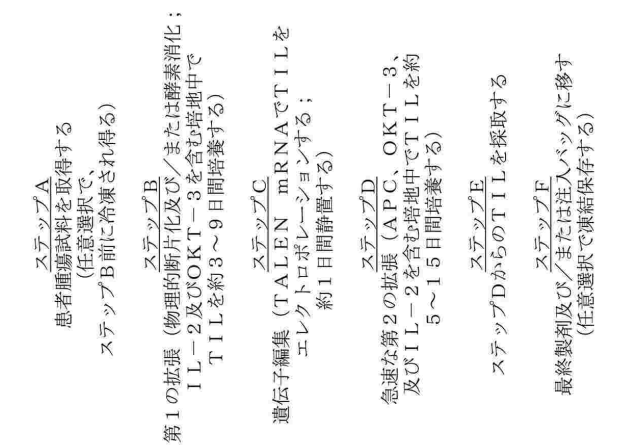
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）

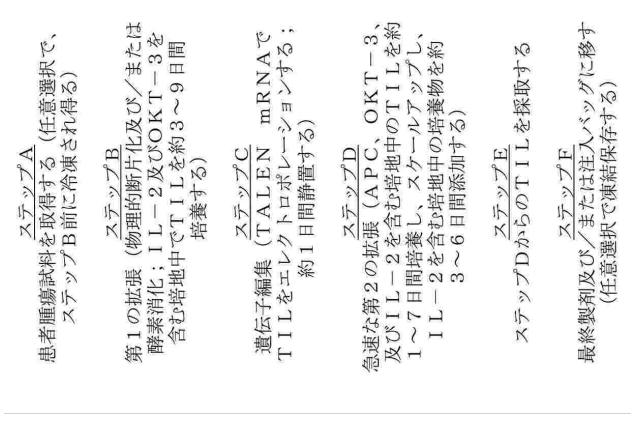
【図８Ｆ】



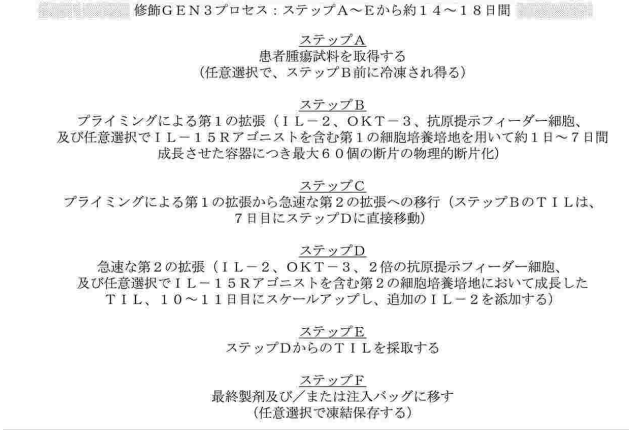
【図８Ｇ】



【図８Ｈ】



【図８Ｉ】



【図８Ｊ】

実施形態ＧＥＮ　３．０：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日	実施形態ＧＥＮ３．１対照：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日	実施形態ＧＥＮ３．１試験／Ｆ：ステップＡ～Ｅから約１４～１８日
ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に冷凍され得る）	ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に冷凍され得る）	ステップＡ 患者腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に冷凍され得る）
ステップＢ プライミングによる第１の拡張（少なくともＩＬ－２、任意選択でＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む第１の培養培地による約１日～７／８日間成長させた容器につき最大６０個の断片の物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（少なくともＩＬ－２、及びＯＫＴ－３、任意選択でＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む第１の培養培地による約１日～７／８日間成長させた容器につき最大６０個の断片の物理的断片化）	ステップＢ プライミングによる第１の拡張（少なくともＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示フィーダー細胞、任意選択で、ＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む第１の培養培地による約１日～７／８日間成長させた容器につき最大６０個の断片の物理的断片化）
ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７／８日目にステップＤに直接移動する）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、７／８日目にステップＤに直接移動する）	ステップＣ プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＭは、７／８日目にステップＤに直接移動する）
ステップＤ 急速な第２の拡張（少なくともＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを含む第２の培養培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を添加する、任意選択で、ＩＬ－１５Ｒアゴニスト）	ステップＤ 急速な第２の拡張（少なくともＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍のＡＰＣを含む第２の培養培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を添加する、任意選択で、１Ｌ－１５Ｒアゴニスト）	ステップＤ 急速な第２の拡張（少なくともＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び２倍のＡＰＣを含む第２の培養培地において成長したＴＩＬ、１０～１１日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を添加する、任意選択で、ＩＬ－１５Ｒアゴニスト）
ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する	ステップＥ ステップＤからのＴＩＬを採取する
ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）	ステップＦ 最終製剤及び／または注入バッグに移す（任意選択で凍結保存する）

【図８Ｋ】

修正したプロセスＧｅｎ２様プロセス：ステップＡ～Ｅから約２２日

ステップＡ
患者の腫瘍試料を取得する（任意選択で、ステップＢ前に冷凍され得、任意選択で、腫瘍試料は、コア／小生検であり得る）

ステップＢ１
初期培養（容器につき最大６０個の断片または最大１０個のコア／小生検の物理的断片化、ＩＬ－２及び任意選択でＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む第１の成長培地中で３日間成長したＴＩＬ）

ステップＢ２
プライミングによる第１の拡張（ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞、及び任意選択でＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む第１の成長培地中で８日間成長したＴＩＬ）

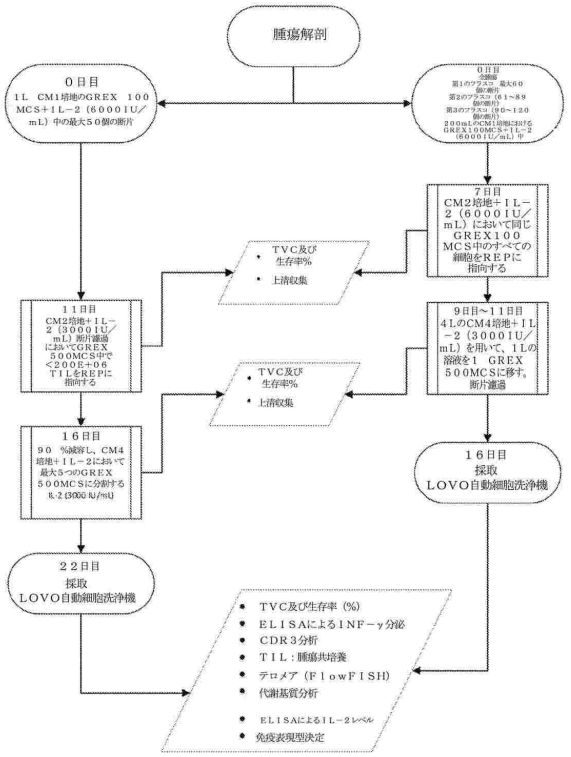
ステップＣ
プライミングによる第１の拡張から急速な第２の拡張への移行（ステップＢのＴＩＬは、１１日目にステップＤに直接移動する）

ステップＤ
急速な第２の拡張（体積を低下させ、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、５０倍の抗原提示フィーダー細胞、及び任意選択でＩＬ－１５Ｒアゴニストを含む第２の成長培地において成長したＴＩＬ、１６日目にスケールアップし、追加のＩＬ－２を添加する）

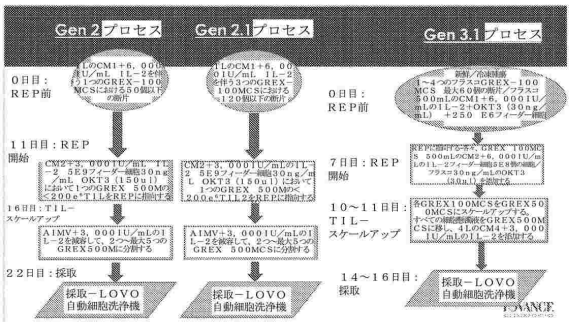
ステップＥ
ステップＤからのＴＩＬを採取する

ステップＦ
最終製剤及び／または注入バッグに移す
（任意選択で凍結保存する）

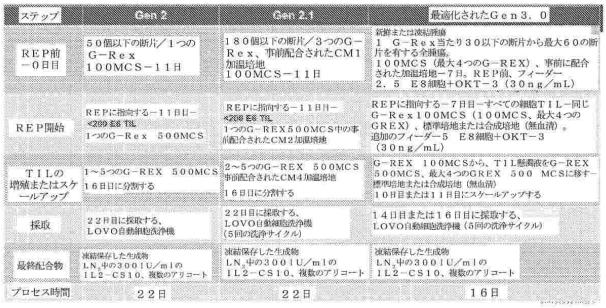
【図９】



【図１０】

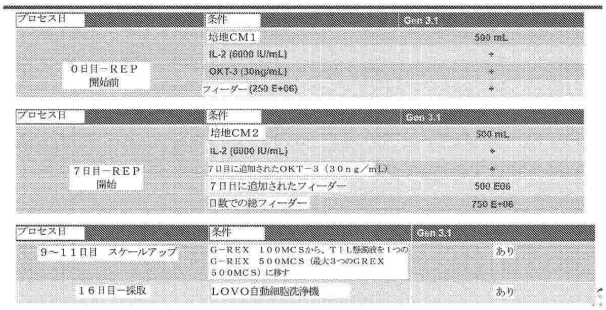


【図１１】



ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたＧｅｎ３．０
ＲＥＰ前－０日目	５０個以下の断片／１つのＧ－Ｒｅｘ １００ＭＣＳ－１１日	１８０個以下の断片／３つのＧ－Ｒｅｘ、事前配合されたＣＭ１加温培地 １００ＭＣＳ－１１日	新鮮または凍結腫瘍 １　Ｇ－Ｒｅｘ当たり３０以下の断片から最大６０の断片を有する全腫瘍。 １００ＭＣＳ（最大４つのＧ－ＲＥＸ）、事前に配合された加温培地－７日、ＲＥＰ前、フィーダー ２．５　Ｅ８細胞＋ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）
ＲＥＰ開始	ＲＥＰに指向する－１１日目－ <200 E6 TIL 1つのＧ－Ｒｅｘ　５００ＭＣＳ	ＲＥＰに指向する－１１日目－ <200 E6 TIL 1つのＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ中の事前配合されたＣＭ２加温培地	ＲＥＰに指向する－７日目－すべての細胞ＴＩＬ－同じＧ－Ｒｅｘ１００ＭＣＳ（１００ＭＣＳ、最大４つのＧＲＥＸ）、標準培地または合成培地（無血清）。 追加のフィーダー－５　Ｅ８細胞＋ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）
ＴＩＬの増殖またはスケールアップ	１～５つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ １６日目に分割する	２～５つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ 事前配合されたＣＭ４加温培地 １６日目に分割する	Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳから、ＴＩＬ懸濁液をＧ－ＲＥＸ ５００ＭＣＳ、最大４つのＧＲＥＸ　５００　ＭＣＳに移す－標準培地または合成培地（無血清） １０日目または１１日目にスケールアップする
採取	２２日目に採取する。 ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機	２２日目に採取する。 ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機 （５回の洗浄サイクル）	１４日目または１６日目に採取する。 ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機（５回の洗浄サイクル）
最終配合物	凍結保存した生成物 LN_2中の３００１Ｕ／ｍｌの ＩＬ２－ＣＳ１０、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN_2中の３００１Ｕ／ｍｌの ＩＬ２－ＣＳ１０、複数のアリコート	凍結保存した生成物 LN_2中の３００１Ｕ／ｍｌの ＩＬ２－ＣＳ１０、複数のアリコート
プロセス時間	２２日	２２日	１６日

【図１２】



プロセス日	条件	Gen 3.1
０日目－ＲＥＰ開始前	培地ＣＭ１	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	フィーダー(250 E+06)	+

プロセス日	条件	Gen 3.1
７日目－ＲＥＰ開始	培地ＣＭ２	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	７日目に追加されたＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）	+
	７日目に追加されたフィーダー	500 E06
	日数での総フィーダー	750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
９～１１日目　スケールアップ	Ｇ－ＲＥＸ　１００ＭＣＳから、ＴＩＬ懸濁液を１つのＧ－ＲＥＸ　５００ＭＣＳ（最大３つのＧＲＥＸ ５００ＭＣＳ）に移す	あり
１６日目－採取	ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機	あり

【図１３】

プロセス比較	主なプロセス変化	利点
Gen 2 : Gen 2.1	• １つのフラスコの代わりに２つのフラスコを用いたプロセスを開始する • ２つのＧ－Ｒｅｘ５００ＭＣＳフラスコ間のＲＥＰ開始のフィーダー層に分割する • 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	• 増加したＴＩＬレパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の倍加の可能性。 • プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1 : Gen 3.1	• 新鮮または凍結腫瘍 • １４～１６日のプロセス（２２日から） • プロセス中の全フィーダー層を低減する • ０日目に存在するフィーダー層及びＯＫＴ３ • 断片で開始したＲＥＰ • １００ＭＣＳスケールから５００ＭＣＳ • 複数のｐｒｅ－ＲＥＰのフラスコを計量する • 標準培地及び合成培地（無血清）	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間 • 低減した試薬試験 • 低下したプロセス変動 • 合成された試薬 • 増加したレパートリー • 純度を低減する（フィーダー） • 同等またはより高い用量。

【図１４】

プロセス比較	主なプロセス変化	所望の改善	成功の判断基準	成果
Gen 2 : Gen 3.0	• １４～１６日 • 最大４つのフラスコの断片を用いてＲＥＰを開始する。 • １００ＭＣＳスケールから５００ＭＣＳ	• 増加した有効性 • 改善された表現型 • 低下したプロセス時間	• ＩＮＦ－ｇにより測定されるように有効性を増加する ✓ • 同等の表現型 ✓ • 同等の用量 ✓ • 同等の純度 ✓（フィーダー細胞） • クローンの多様性を維持する ✓	• Ｇｅｎ２を上回って増加した有効性 • ＣＤ８細胞におけるＣＤ２８の改善した発現 • Ｇｅｎ３．１における１６日目までに達したフラスコの最大容量 • 低減したフィーダー細胞使用 • 増加した多様性

【図１５】

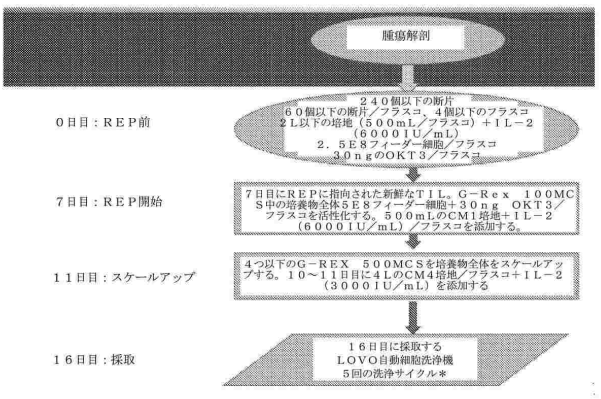
プロセス	Gen 2	Gen 3
L4054	標準培地	標準培地
L4055	標準培地	標準培地
M1085T	標準培地	標準培地

標準培地：
ＲＥＰ前：ＣＭ１
ＲＥＰ開始：ＣＭ２
分割またはスケールアップ：ＣＭ４

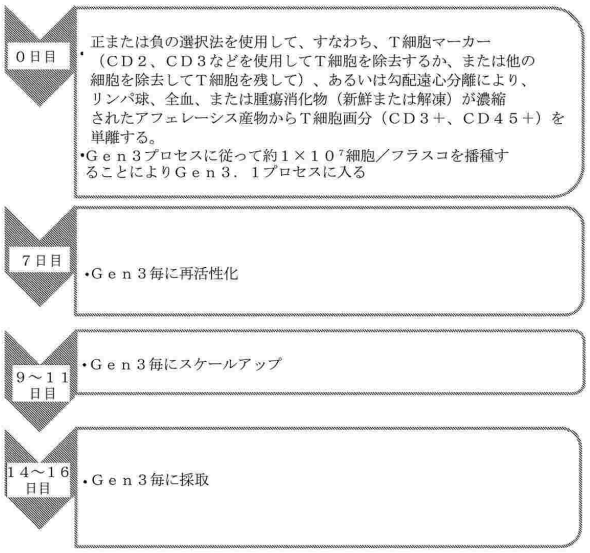
プロセス	Gen 3	Gen 3.1 対照	Gen 3.1
L4063	標準培地	標準培地	標準培地
L4064	合成培地	合成培地	合成培地

合成培地：
プロセスの各日におけるＣＴＳオプティマイザ（無血清培地）

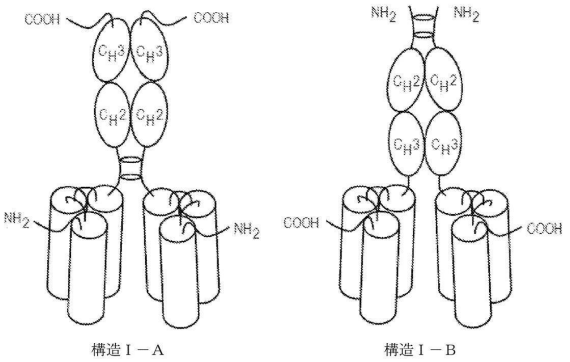
【図１６】



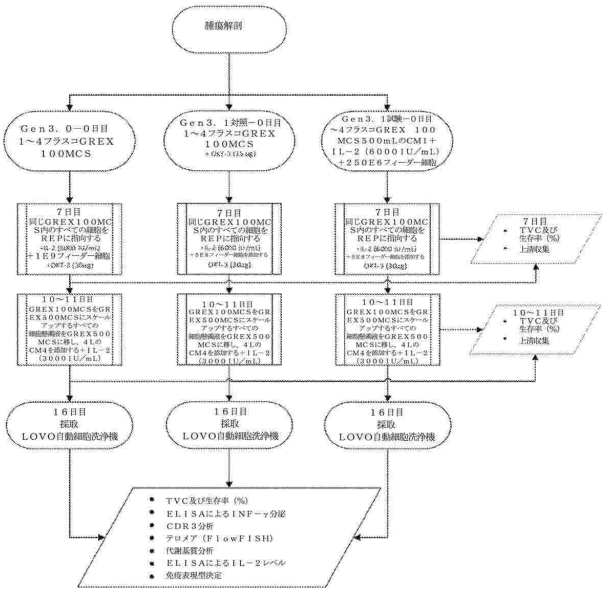
【図１７】



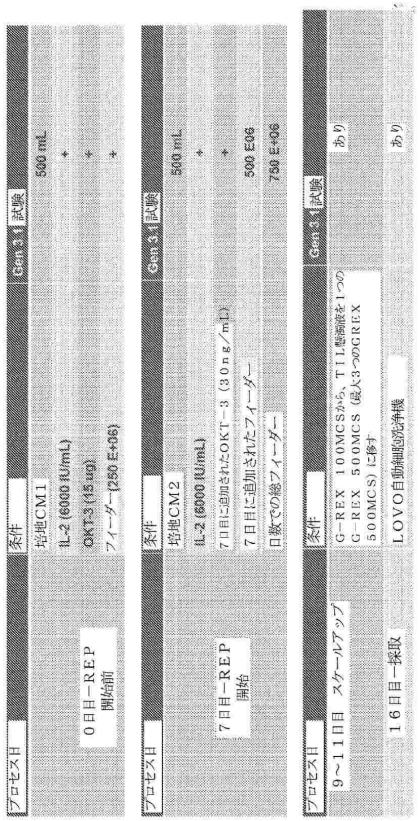
【図１８】



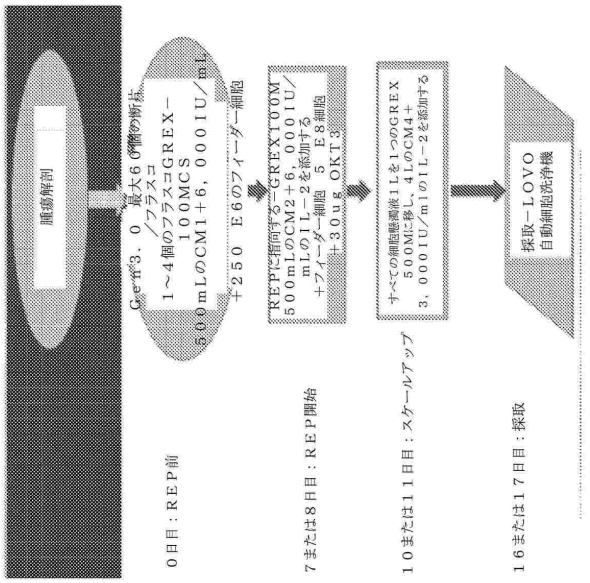
【図１９】



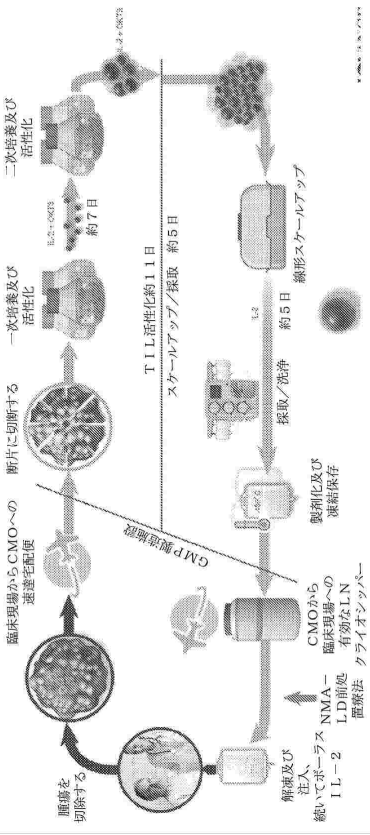
【図２０】



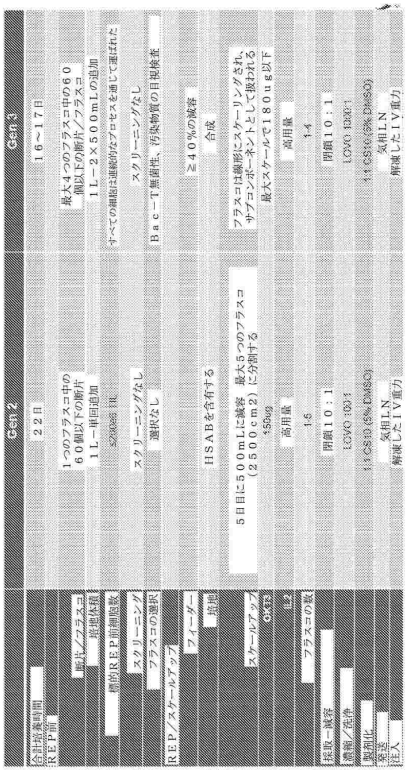
【図２１】



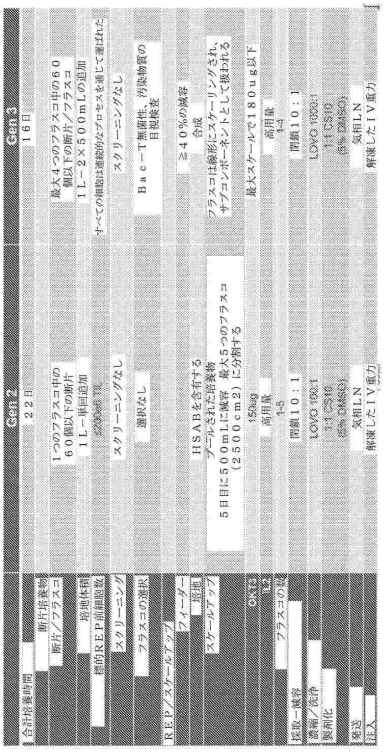
【図２２】



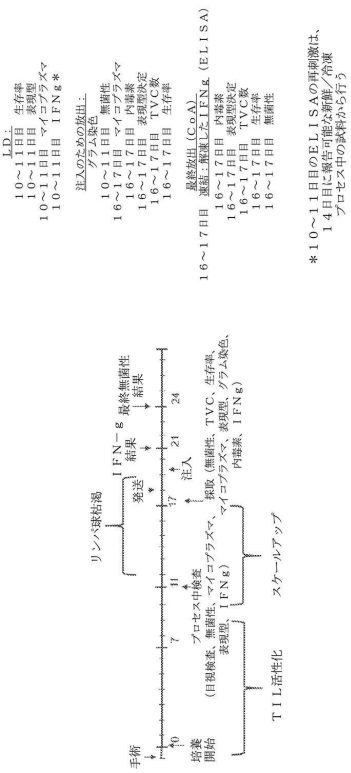
【図２３Ａ】



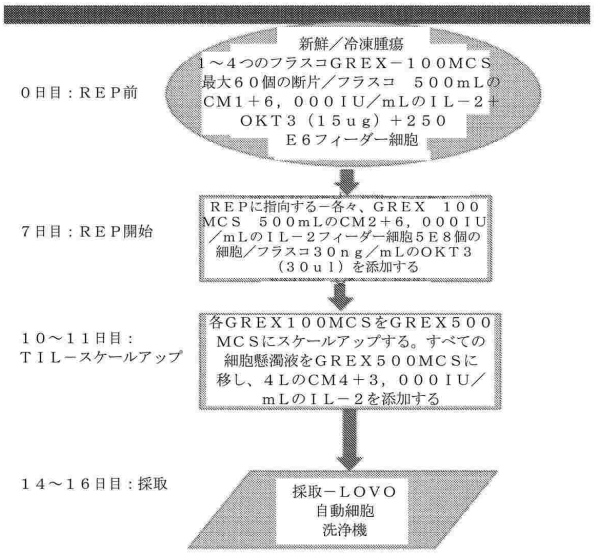
【図２３Ｂ】



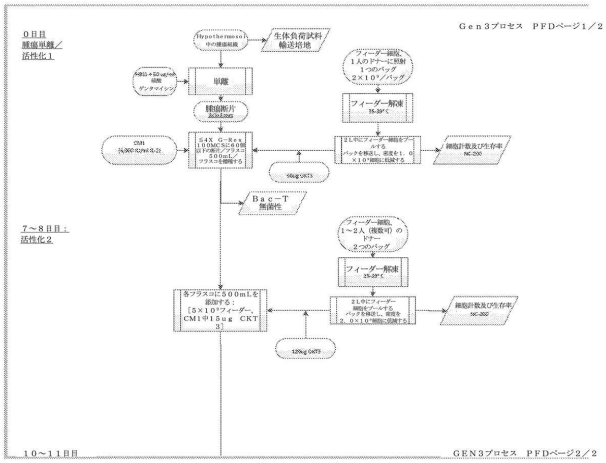
【図２４】



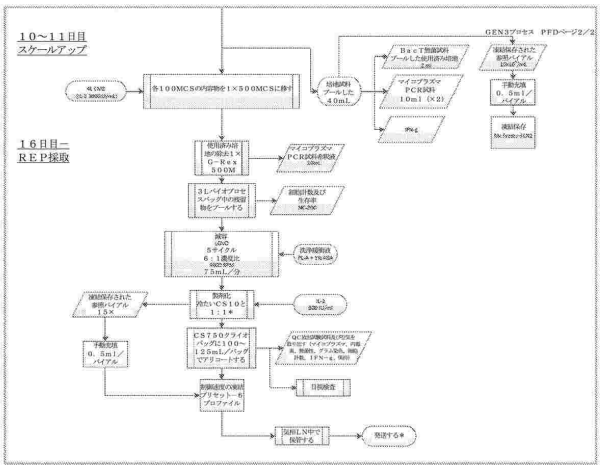
【図２５】



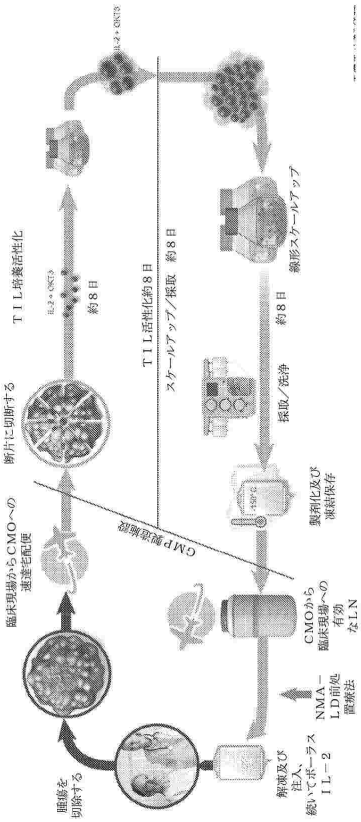
【図２６Ａ】



【図２６Ｂ】



【図２７】



【図２８】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
REP前−0日目	50個以下の断片／1個のG−Rex事前配合されたCM1加細胞 100MCS−11日	180個以下の断片／3つのG−Rex事前配合されたCM1加細胞 100MCS−11日	新鮮または冷凍腫瘍 1 G−Rex当たり30以下の断片から最大600の断片を有する全構成。 100MCS（最大4つのG−REX）、事前に配合された加細胞−7日。REP前、フィーダー250e6細胞+OKT−3（15ug）
REP開始	REPに指向する−11日目− <200e⁶ TIL 1つのG−Rex 500MCS	REPに指向する−11日目− <200e⁶ TIL 1つのG−REX 500MCS中の事前配合されたCM2加細胞	REPに指向する−7日目−すべての細胞TIL−同じG−Rex100MCS（100MCS、最大4つのGREX）標準培地または合成培地（無血清）。フィーダー500e6細胞+OKT−3（30ug）の添加
TILの増殖またはスケールアップ	1−5つのG−REX 500MCS事前配合されたCM4加細胞 16日目に分解する	2−5つのG−REX 500MCS事前配合されたCM4加細胞 16日目に分解する	G−REX 100MCSから、TIL懸濁液をG−REX 500MCS、最大4つのGREX 500MCSに移す−標準培地または合成培地（無血清） 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）	14日目または16日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機（5回の洗浄サイクル）
最終配合物	凍結保存した製品 LN₂中の3001U/m1のIL2−CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN₂中の3001U/m1のIL2−CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN₂中の3001U/m1のIL2−CS10、複数のアリコート
プロセス期間	22日	22日	16日

【図２９】

プロセス比較	プロセス変更	差異
Gen 2：Gen 2.1	・1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する ・2つのG−Rex 500MCSフラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する ・使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	・増加したTILレパートリーを用いた最終細胞計数（用量）の倍加の可能性。 ・プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1：Gen 3.1	・新鮮または冷凍腫瘍 ・14〜16日のプロセス（22日から） ・プロセス中の全フィーダー層を低減する ・0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 ・断片で開始したREP ・100MCSスケールから500MCS ・複数のREP前のフラスコを計量する ・標準培地及び合成培地（無血清）	・増加した有効性 ・改善された表現型 ・低下したプロセス時間 ・低減した試薬試験 ・低下したプロセス変動 ・合成された試薬 ・増加したレパートリー ・純度を低減する（フィーダー） ・同等またはより高い用量。

【図３０】

表2．Gen3最適化条件の説明。

プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
0日目：腫瘍断片の単離及び活性化	培地（*）	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	フィーダー	-	-	2.5E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
7〜8日目：TIL培養再活性化	培地（*）	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2	6000 IU/mL	6000 IU/mL	6000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	フィーダー	≦ E+09	500 E+06	500E+06
	7日目までに添加されたフィーダーの合計	≦ E+09	500 E+06	750E+06
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
10〜11日目：培養のスケールアップ	GREX100から、IL−2（3000IU/mL）を含む4L培地を含有する1つのGREX500に、全TIL懸濁液を移す。			
プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3．1対照	Gen 3．1試験
16〜17日目：採取／洗浄／製剤化	LOVO自動細胞洗浄機及びCS10による凍結保存。			

（*）培地は、標準培地または合成培地であり得る。

【図３１】



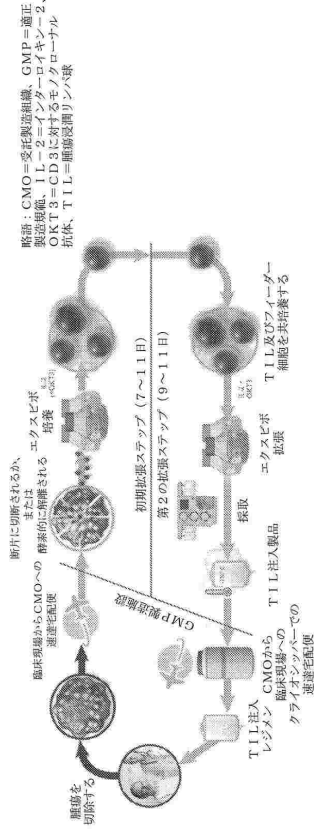
【図３２】

ステップ	Ｇｅｎ３プロセス－最適化
０日目 腫瘍単離及び活性化	２４０個以下の断片 ６０個以下の断片／フラスコ ４つ以下のフラスコ ２Ｌ以下の培地（５００ｍＬ／フラスコ） ＩＬ-２（６０００ＩＵ/ｍＬ） ２．５×１０⁸個のフィーダー細胞／フラスコ １５ｕｇのＯＫＴ３／フラスコ
７～８日目 再活性化	ＲＥＰに指向した新鮮なＴＩＬ 培養物全体を活性化する ５×１０⁸個のフィーダー細胞 ３０ｕｇのＯＫＴ３／フラスコ Ｇ－Ｒｅｘ１００ＭＣＳ ５００ｍＬのＣＭ１培地＋ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）を添加する
１０～１１日目 スケールアップまたは ＴＩＬ 継代培養	４つ以下のＧ－ＲＥＸ５００ＭＣＳ １ＬをＧＲＥＸ１００ＭＣＳからＧＲＥＸ５００ＭＣＳに移して培養物全体を スケールアップし、４Ｌの培地＋ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）／フラスコを 添加する
１６～１７日目 採取	ＬＯＶＯ自動細胞洗浄機 Ｐｌａｓｍａｌｙｔｅ １％ ＨＳＡで凍結保存： ＣＳ１０上で凍結保存

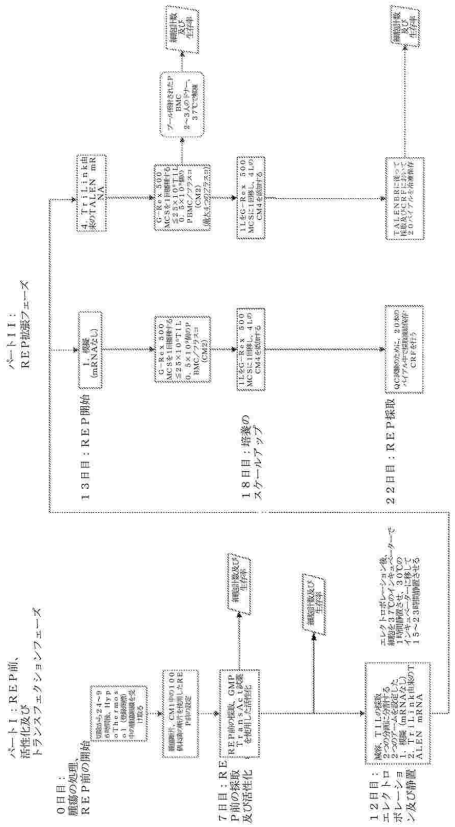
【図３３】

試験	承認基準	Ｇｅｎ３．１試験対 Ｇｅｎ３．０プロセス
細胞計数（ＴＶＣ）	Ｇｅｎ３．１＞３０％から プロセスＧｅｎ３．０	満たした
生存率（％）	≧７０％の生存率	満たした
免疫表現型決定 （％ＣＤ３＋/％ＣＤ４５＋）	Ｇｅｎ３．１とＧｅｎ３．０ プロセスとの間の≦５％の差	満たした
ＩＦＮγ分泌	Ｇｅｎ３．１≧からプロセス Ｇｅｎ３．０	満たした

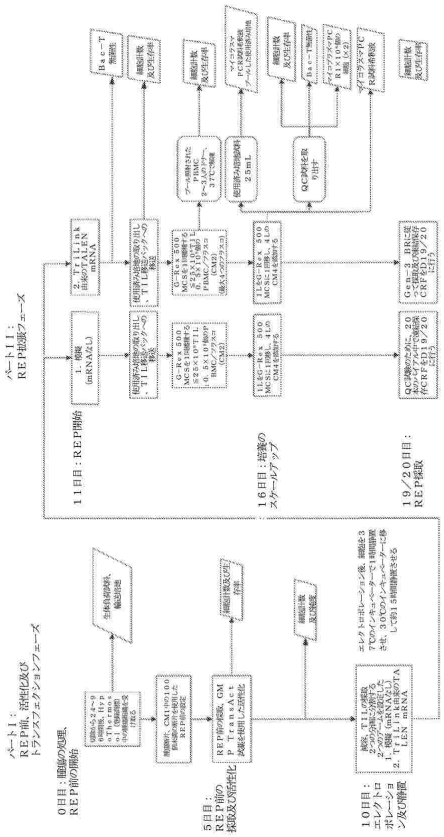
【図３４】



【図３５】



【図３６】



【図３７Ａ】

シグナル配列：MDWTWILFLVAAATRVHS（配列番号 252）
リンカー{Lr1}：SGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGGSLQ（配列番号 246）
アンカー{Ar2}：（ヒトＢ７．１膜貫通細胞内のアミノ酸配列）
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号 239）
フリンＡ－Ｐ２Ａ配列：RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号 251）

テザリングされたＩＬ－１２－Ｌｒｌ－Ａｒ２
MDWTWILFLVAAATRVHSIWFLKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT
ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS
ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML
QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE
DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNAS.SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRC
RERRRNERLRRESVRPV（配列番号 303）

テザリングされたＩＬ－１２－Ｌｒｌ－Ａｒ２
ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGCACTCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGAC
GTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTACCCCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGCCGGA
GGAGGACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTGCTGGGCTCTGGTAAGACCTTAACCATCCAGG
TCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACGTGTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGCCTGCTGCTCC
TGCACAAGAAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGGATATCCTTAAAGACCAGAAGGAGCCCAAGAACAAAACCTTCC
TGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGGCGCTTTACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTT
CTCCGTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTCTGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACCCTGTCGGCTGAGCGC
GTCCGTGGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGA
GTCCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTATAC
GCGACATCATCAAGCCTGACCCCCCTAAAAACCTGCAGCTGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTATC
CTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCAAG
TCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAACGCGAG
CATCTCCGTACGGGCACAGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTTCCGTGTTCTGGAGGA
GGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACCCGGGTATGTTTCCTTGTCTGCACCACTCTCAG
AACTTGCTCCGTGCCGTCTCGAATATGCTGCAGAAGGCCCGCCAGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAGTGAGG
AGATCGATCATGAGGACATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTCTGCCGCTGGAGTTGACAAAGA
ACGAGAGCTGCCTCAATAGCCGCGAGACTTCCTTCATCACCAACGGCTCCTGCCTCGCGAGCCGTAAGACCTCCTT
TATGATGGCGCTGTGCCTGTCAAGTATCTACGAAGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGAACGC
AAAACTCCTGATGGATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGGACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAG
GCCCTGAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGAGGAACCCGACTTTTACAAGACAAAGATCA
AGCTGTGCATCCTGCTACACGCGTTCCGCATTCGGGCCGTGACCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTC
GTCCGGCGGGGGGGGCTCCGGTGGGGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGCGGCTCCGGCGGAGG
TTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTCTGATTTCCGTCAACGGAATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTA
CTGCTTTGCTCCCAGATGTAGAGAGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAGAGCGTGAGGCCTGTG（
配列番号 304）

テザリングされたＩＬ－１８－Ｌｒｌ－Ａｒ２
MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDS
QPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKE
RDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVIC
CLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号 305）

テザリングされたＩＬ－１８－Ｌｒｌ－Ａｒ２
ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCTGCAGCCCACTCGGGTCCACAGCTACTTCGGCAAGCTG
GAGAGTAAACTTTCCGTGATCCGCAACCTCAACGACCAAGTGCTGTTCATTGACCAGGGCAACCGCCCC
CTCTTTGAAGACATGACCGACAGCGATTGTCGTGACAATGCGCCCCGCACCATCTTTATAATTTCCATGT
ACAAGGATAGCCAGCCGCGGGGAATGGCGGTAACGATCTCGGTGAAGTGTGAAAAAATCTCGACCCTG
TCATGCGAGAACAAGATCATTTCCTTCAAAGAGATGAATCCACCCGACAACATCAAGGACACCAAGTCC
GACATCATCTTCTTCCAGCGCAGCGTGCCTGGGCATGACAACAAGATGCAGTTCGAGAGCTCGTCTTAC
GAGGGCTATTTCCTGGCCTGCGAGAAGGAGCGTGACCTGTTCAAGCTTATCCTGAAGAAGGAGGAGCGA
GCTGGGGGACCGCAGCATCATGTTTACAGTGCAGAACGAGGATTCTGGTGGCGGCGGTAGCGGGGGC
GGGGGTTCTGGCGGCGGAGGCTCCGGTGGAGGAGGCTCCGGCGGCGGTTCGTTGCAGCTGCTGCCCA
GTTGGGCCATCACTCTAATCTCCGTCAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCG
AGGTGTAGAGAGCGACGCCGCAACGAGCGCCTCCGCCGTGAGTCCGTGCGCCCTGTT（配列番号
306）

テザリングされたＤＲ－ＩＬ－１８（６－２７バリアント）－Ｌｒ１－Ａｒ２（黄色のハイライト：変異残基）
MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDS
RARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDL
FKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLT
YCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号 307）

テザリングされたＤＲ－ＩＬ－１８（６－２７バリアント）－Ｌｒ１－Ａｒ２
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCGGCAACTCGCGTACATAGCTATTTCGGCAAGCTG
GAGAGCAAACTATCAGTGATCCGCAACCTCAACGACCAGGTCTTGTTTATTGACCAGGGCAACCGCCCC
CTGTTCGAAGACATGACAGACAGCGATTGTCGCGACAATGCTCCTCGCACCATCTTTATCATCTCCAAGT
ACTCCGATTCTCGAGCCAGAGGTCTCGCCGTGACCATCTCCGTGAAGTGCGAGAAGATATCCACTCTTTC
ATGCGAGAACAAGATCATTTCCTTCAAGGAGATGAATCCACCCGACAACATCAAGGACACCAAGTCCGA
CATCATCTTCTTCGCTCGTGTGCCTGGCCACGGCCGCAAGACCCAGTTCGAGAGTTCCAGCTACGAGGG
CTACTTCCTGGCCTGTGAGAAAGAGCGGGACCTTTTCAAATTGATTCTGAAGAAGGAGGACGAGCTGG
GCGACCGTAGCATCATGTTTACGGTGCAGAACGAGGATTCTGGCGGGGGCGGTTCTGGAGGGGGTGG
GTCGGGCGGTGGTGGCTCCGGGGGAGGCGGCTCCGGAGGAGGCTCGCTGCAGCTGCTGCCCAGTTGG
GCCATCACGCTCATTTCTGTCAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCGAGGTG
TAGGGAACGTCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGCGAGTCTGTTCGGCCGGTG（配列番号 308）

【図３７Ｃ】

テザリングされたＩＬ－１２／ＩＬ－１５

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT
ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS
ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNML
QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE
DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRC
RERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISD
LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESG
CKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIF
VICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号 309)

テザリングされたＩＬ－１２／ＩＬ－１５

ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTTTGGTGGCGGCCGCCACCCGCGTCCATTCCATATGGGAATTAAAGAAGGACGTGTACGT
GGTGGAGCTTGACTGGTACCCTGACGCTCCCGGCGAGATGGTGGTCCTGACCTGCGATACCCCCGAGGAGGACGGCATCACC
TGGACCCTGGACCAGAGCTCCGAGGTGCTGGGAAGCGGTAAAACCCTCACCATACAGGTGAAGGAGTTCGGTGATGCTGGCC
AGTACACCTGTCACAAAGGCGGGGAGGTACTTTCCCATTCGCTGCTCCTGCTTCACAAGAAGGAAGACGGCATTTGGTCGACC
GATATTCGTGAAGGACCAGAAGGAACCAAAAAACAAGACCTTTTTGCGTTGCGAGGCCAAGAACTATTCCGGCCGCTTCACCTG
CTGGTGGCTAACGACCATCTCAACCGACCTGACCTTCTCCGTTAAGTCTAGCCGTGGTAGCTCCGACCCTCAGGGGGTAACCTG
CGGGGCTCGCGACGCTGAGTGCGGAGCGGGTACGCGGCGACAACAAGGAGTACGAGTACTCCGTGGAATGTCAGGAGGATA
GTGCCTGCCCAGCGGCCGAGGAGTCCCTGCCCATCGAGGTAATGGTGGACGCGGTCCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACAC
TAGCTCCTTCTTTATTAGAGACATCATCAAGCCCGACCCGCCTAAGAACCTGCAGCTGAAACCTCTCAAAAACTCCCGCCAGGT
TGAAGTGTCGTGGGAGTACCCTGACACCTGGTCTACACCGCACAGCTATTTCTCGCTTACATTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCA
AATCCAAGCGCGAGAAGAAAGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCTCTGCTACAGTGATCTGCCGAAAGAATGCTTCTATCTCC
GTGCGTGCTCAGGACCGCTACTACTCATCAAGCTGGAGTGAGTGGGCCTCCGTGCCATGTTCCGGGGGGGGCGGCGGTGGCT
CCCGCAACCTGCCCGTTCGAACGCCCGACCCGGGTATGTTCCCATGCCTGCACCACTCCCAGAATCTGTTACGTGCTGTAAGCA
ATATGCTTCAGAAGGCTCGCCAGACTCTGGAGTTCTACCCCTGCACTTCGGAGGAGATCGACCACGAAGACATCACCAAGGAC
AAGACATCCACCGTGGAGGCGTGCCTCCCTTTGGAGCTCACAAAGAACGAGTCCTGTCTAAACTCAAGGGAGACTAGCTTCAT
CACTAATGGATCGTGTCTGGCGTCGCGCAAGACCTCTTTCATGATGGCCCTGTGCCTGTCCAGCATCTATGAGGACCTTAAAAT
GTATCAGGTCGAGTTCAAGACTATGAACGCAAAGCTGCTGATGGATCCCAAGCGGCAAATTTTCCTGGACCAGAACATGCTGG
CGGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTCAACTTCAACAGCGAAACTGTTCCTCAGAAGTCCTCCCTGGAGGAGCCGGACTTT
TACAAGACCAAGATCAAGCTATGTATTTTGTTACACGCCTTCCGCATCCGGCGTGTCACTATTGACCGCGTGATGTCTTACCTGA
ACGCATCTAGTGGGGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGGCGGCTCTGGCGGTGGCGGCTCTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGG
TCCCTTCAGCTGCTCCCGTCGTGGGCCATCACACTGATCTCTGTGAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGTCTTACTTACTGCTTTGC
CCCCAGGTGTAGGGAGAGACGCCGCAATGAACGGCTGAGGCGTGAGAGCGTGCGCCCGGTGAGGGCTAAGCGCAGCGGCT
CCGGCGCGACCAACTTTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGGGACGTGGAGGAGAATCCAGGCCCGATGGATTGGACCTGGATCCT
GTTCTTGGTGGCCGCGGCTACTCGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACGTGATCTCCGACTTGAAAAAGATCGAGGATCTGATCC
AGAGCATGCATATCGACGCCACGCTGTACACCGAGAGCGATGTGCACCCCTCTTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTG
CTGGAGCTGCAGGTCATCTCTCTTGAGTCGGGCGATGCATCTATTCATGACACCGTCGAGAACCTAATCATCCTGGCCAACAAC
TCACTGTCTTCAAACGGCAACGTGACGGAGTCTGGGTGCAAGGAATGTGAGGAATTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCC
TGCAGTCCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTTATTAACACGAGTAGTGGCGGAGGTGGCAGCGGAGGCGGCGGCTCCGGCGG
TGGAGGAAGTGGAGGCGGCGGCTCTGGTGGCGGTCCCTACAATTGCTTCCCTCTTGGGCTATCACCCTCATCAGCGTCAACG
GTATCTTCGTCATCTGTTGTCTGACCTACTGCTTTGCCCCTCGATGCCGAGAGCGCCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGGGAGT
CCGTGCGCCCCGTT (配列番号 310)

【図３７Ｄ】

テザリングされたＩＬ－１８／ＩＬ－１５

MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDS
QPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKE
RDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVIC
CLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVH
SNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLS
SNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSW
AITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号 311)

テザリングされたＩＬ－１８／ＩＬ－１５

ATGGATTGGACCTGGATCCTTTTCTTGGTGGCGGCTGCAACCCGGGTTCATAGCTATTTCGGCAAGCTG
GAGTCCAAGCTCTCCGTGATCCGCAACCTCAACGACCAGGTGCTGTTCATCGACCAGGGCAACCGCCCC
CTGTTTGAGGACATGACAGATTCTGATTGCCGCGACAACGCGCCGCGCACCATCTTCATTATCTCTATGT
ACAAGGACTCCCAGCCACGTGGTATGGCCGTCACGATCAGCGTGAAGTGCGAGAAGATTTCTACCCTGT
CCTGCGAGAACAAGATCATCTCGTTCAAGGAGATGAACCCTCCCGACAATATCAAGGACACCAAGTCCG
ACATCATCTTCTTCCAGCGATCAGTGCCAGGCCACGACAACAAGATGCAGTTCGAGAGCAGCAGCTACG
AGGGCTACTTCCTTGCGTGCGAGAAAGAGCGCGATCTGTTCAAACTGATCCTCAAGAAGGAAGACGAG
CTCGGGGACCGCAGCATCATGTTTACCGTACAGAACGAGGACAGCGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGAG
GCGGTAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGGTCGTTCGCAGCTCTTGCCGAG
TTGGGCTATCACTCTTATCTCCGTAAACGGCATCTTCGTGATATGCTGCCTGACGTACTGTTTTGCTCCTA
GGTGTCGCGAGCGCCGCCGGAACGAGAGACTGCGACGGGAATCCGTGCGCCCGGTCCGCGCGAAGCG
TAGTGGCTCCGGTGCTACCAACTTTTCTCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCC
TATGGACTGGACATGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCGGCCACCCGCGTCCACTCAAATTGGGTCAATGT
GATTTCTGACCTGAAGAAAATTGAGGATCTCATCCAGTCCATGCACATTGACGCCACTCTGTACACCGAG
AGCGATGTTCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTCCTGTTGGAGCTGCAGGTCATTTCGC
TCGAGTCTGGCGACGCATCGATCCATGACACCGTGGAGAACCTGATTATCCTGGCCAACAACTCCCTTTC
TTCAAATGGCAACGTGACTGAAAGCGGGTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAAGAAAAGAACATCAAA
GAGTTCCTGCAATCTTTCGTCCACATTGTGCAGATGTTTATTAACACGTCCTCGGGTGGCGGGGGGTCG
GGCGGGGGGTGGTTCCGGCGGAGGCGGGTCCGGAGGAGGGGGCTCTGGTGGGGGATCCCTACAGCTA
CTGCCCTCTTGGGCCATCACCCTTATCTCCGTCAACGGTATCTTCGTGATCTGTTGCCTGACTTACTGCTTT
GCCCCGAGATGTCGTGAGCGTAGGAGGAACGAGCGCCTGCGCCGCGAGAGCGTGCGTCCCGTG (
配列番号 312)

【図３７Ｅ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYT
GDGTNYSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVSSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号 313)

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ＡＰＸ００５Ｍ）

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCGGCTACACGAGTCCACAGCCAGGTCCAGCTCGTG
GAGAGCGGAGGCGGCGTGGTGCAGCCAGGCCGCTCGCTGCGCCTGTCATGCGCAGCGTCCGGTTTCTC
CTTCTCGTCGACCTACGTGTGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGATTGCTTGTAT
TTATACCGGCGACGGCACCAACTACAGCGCAAGTTGGGCCAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAAGGATAG
TAGCAAGAACACGGTATACCTGCAGATGAACTCTCTTCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTATTTCTGTGCC
CGGCCGACATCACTTATGGCTTCGCGATTAACTTTTGGGGCCCTGGAACCCTGGTGACCGTGTCCTCCG
GCGGCGGTGGCTCTGGGGGGGGCGGGTCCGGCGGAGGCGGCAGCGGAGGCGGCGGCTCCGACATCC
AGATGACCCAGTCGCCCAGTTCTTTGTCCGCTTCCGTGGGGGACAGGGTCACCATAAAGTGCCAGGCTT
CTCAGAGCATCTCGTCCCGCCTGGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAGCCCCAAAGCTGCTCATCT
ACCGGGCTTCCACTCTGGCCAGCGGTGTTCCTTCCCGCTTCTCTGGCTCCGGGTCGGGCACTGACTTTAC
ATTGACGATCTCTTCGCTTCAGCCGGAAGATGTAGCTACTTACTACTGTCAATGCACTGGCTACGGCATC
AGTTGGCCCATCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAAAGCGGGGGAGGCGGTTCTGGCGGTGGAG
GGTCTGGCGGGGGTGGCTCCGGGGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGATCCCTACAGCTGCTGCCCTCTTGG
GCCATCACGCTCATTTCAGTTAATGGCATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTG
TAGAGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGTCGCGAGAGCGTGCGCCCGGTG (配列番号 314)

【図３７Ｆ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）

MDWTWILFLVAAATRVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVARVI
PNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGS
GGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号 315)

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ダセツズマブ）

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCGGCTACACGTGTGCACTCCGAGGTGCAGTTGGTG
GAGAGCGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCGGGCGGGAGCCTGCGCCTGTCGTGCGCCGCTTCCGGCTACTC
CTTCACCGGTTATTACATCCACTGGGTGCGACAGGCCCCGGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCGCTCGCGT
AATTCCTAACGCGGGTGGCACCAGCTACAACCAGAAATTTAAGGGCAGATTCACCCTCAGCGTTGACAA
CTCCAAGAACACGGCCTACCTGCAGATGAACTCCCTTCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCT
CGCGAGGGCATCTATTGGTGGGGCCAGGGAACTCTAGTTACCGTGTCCTCCGGCGGCGGCGGCTCGGG
CGGCGGGGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCCGGAGGGGGAGGGTCCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCC
TCTAGTCTGAGCGCATCCGTGGGGGACAGGGTCACCATCACCTGCCGCTCGTCACAATCGCTTGTCCACT
CAAATGGCAACACTTTCCTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCGCCCAAGCTGCTCATCTACA
CCGTGAGCAACCGCTTTTCAGGCGTGCCATCCCGCTTCTCTGGCTCCGGCTCCGGTACAGATTTCACCCTT
ACCATTAGCTCGTTGCAGCCAGAAGACTTTGCCACCTATTTCTGTTCTCAGACGACTCACGTCCCGTGGA
CCTTCGGACAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGCGGCGGAGGTGGGAGTGGAGGCGGCGGGTCCG
GAGGGGGCGGTTCTGGCGGCGGTGGTTCTGGCGGAGGGTCTCTGCAGCTGCTACCCAGTTGGGCCATC
ACTCTCATTTCTGTCAACGGCATCTTCGTCATATGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCTAGGTGTCGTGA
GCGCCGCCGCAACGAGCGGTTGCGGCGTGAATCCGTGCGCCCTGTA (配列番号 316)

【図３７Ｇ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISL
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIRSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号 317)

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（ルカツツズマブ）

ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTCGCAGCGGCCACCCGCGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTG
GAATCCGGGGGGTGGCGTGGTGCAACCAGGCCGTAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCTGCGTCCGGCTTTAC
TTTTTCGTCTTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGCGGTTAT
CAGCTATGAGGAGAGCAACCGCTACCACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCGCGGGACA
ACTCCAAGATAACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGGACTGAAGACACCGCCGTGTACTACTGTGC
CCGCGATGGCGGAATCGCCGCTCCCGGGCCCGACTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTTACCGTCTCCTC
GGGAGGCGGCGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGCGGCGGGGGCTCCGGGGGTGGCGGCTCTGACAT
CGTGATGACGCAGAGCCCTTTGAGCCTAACAGTTACCCCCGGGGAGCCCGCTTCGATTTCATGCCGCTCC
TCCCAGAGCCTGCTGTACTCAAATGGCTACAACTACCTGGACTGGTACCTCCAGAAGCCGGGTCAGTCCC
CTCAGGTGCTCATCTCGTTGGGCAGCAACAGGGCCTCTGGCGTGCCAGACCGCTTCTCCGGATCTGGCA
GCGGAACCGATTTCACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGACGTGGGCGTGTATTACTGTATGC
AGGCCCGACAGACTCCCTTCACCTTCGGCCCCGGGACCAAGGTGGATATCCGCTCGGGAGGCGGCGGC
AGCGGTGGGGGAGGCAGCGGTGGTGGCGGATCCGGGGGGGGCGGCTCTGGTGGCGGATCCCTCCAG
CTGCTGCCGAGTTGGGCTATCACTCTTATTTCCGTAAATGGGATTTTCGTCATCTGCTGCCTTACCTACTG
CTTTGCACCTAGATGTCGCGAGCGTAGGCGCAACGAGCGGCTTCGTCGCGAGTCCGTCCGCCCTGTC
(配列番号 318)

【図３７Ｈ】

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）

MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG
WINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPG
KAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号
319)

テザリングされた抗ＣＤ４０ｓｃＦＶ（セリクレルマブ）

ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCTGCCACCCGTGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGGTG
CAATCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTATCGTGTAAGGCTTCGGGCTACAC
GTTCACCGGCTACTACATGCATTGGGTCCGCCAGGCCCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGA
TTAACCCCGACTCCGGCGGCACCAACTACGCGCAGAAATTTCAGGGGCGAGTGACTATGACAAGGGAC
ACTTCCATCTCCACAGCCTACATGGAGCTCAACCGCCTGCGCAGCGATGACACCGCAGTGTACTATTGTG
CTCGCGACCAGCCTCTAGGTTACTGCACTAATGGCGTATGTAGCTATTTCGACTATTGGGGCCAGGGCAC
CCTGGTCACCGTGTCCAGCGGCGGAGGGGGCTCAGGCGGAGGTGGCTCAGGAGGTGGCGGCTCGGGG
GGCGGTGGGTCCGACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCGGTCTCTGCTTCTGTGGGAGACCGCGTG
ACGATAACCTGCCGTGCCTCCCAGGGCATCTACAGTTGGCTTGCGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAG
GCGCCAAACCTGCTGATTTACACCGCATCCACTCTTCAGTCAGGCGTTCCTTCCCGCTTCAGTGGCTCTGG
TTCTGGCACCGATTTCACGCTGACCATCTCCTCCTTGCAGCCGGAAGACTTTGCCACTTACTACTGCCAAC
AGGCCAACATCTTCCCTCTGACCTTCGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAAATCTGGCGGAGGGGGC
TCGGGCGGGGGGTGGTTCTGGCGGCGGGGGAAGTGGTGGGGGCGGATCTGGTGGTGGTAGCCTGCAG
CTCTTGCCCTCCTGGGCGATCACCCTCATCAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTG
CTTTGCGCCGAGATGTCGAGAGCGCCGGCGCAACGAGCGCCTGCGTCGGGAGTCCGTGCGCCCCGTG
(配列番号 320)

【図３７Ｉ】

CD40L

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号 273)

CD40L

ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTGTACTTGCAC
CGCCGCCTGGACAAAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAG
AGGTGTAACACTGGCGAGCGTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGAGATCAAGAGCCAGTTCGAGGGC
TTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGG
TGATCAGAACCCCCAAATTGCAGCGCATGTGATAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCA
GTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACCTGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGA
CGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACGTTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCT
CTCAGGCTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGAGCGAATCCTGCTCCGCGC
CGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGAGCATCCACCTTGGTGGGGTTTTTGAGCT
GCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGCTTCACC
TCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (配列番号 321)

【図３７Ｊ】

テザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLP
SWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDW
TWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (配列番号 322)

テザリングされたＣＤ４０Ｌ／ＩＬ－１５

ATGATCGAAACTTACAACCAGACGAGCCCGCGCTCCGCCGCCACCGGGCTGCCCATCTCTATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTTCTGATCACCCAGATGATCGGTTCCGCGCTGTTTGCCGTGTACCTGCAC
CGCCGCCTGGACAAGATAGAAGACGAGCGCAACCTGCACGAAGATTTCGTCTTCATGAAGACCATCCAG
CGGTGTAATACCGGCGAGAGGAGCCTGAGCTTGCTCAACTGCGAGGAGATCAAAAGTCAGTTCGAGGG
CTTCGTTAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACCAAGAAGGAGAACTCCTTCGAGATGCAAAAGG
GGGACCAGAACCCTCAGATCGCCGCGCATGTAATTTCCGAGGCCTCATCCAAGACGACTTCTGTCCTACA
GTGGGCAGAGAAGGGCTACTACACCATGTCTAATAACCTGGTCACCCTTGAGAACGGCAAGCAACTGAC
AGTGAAGCGCCAGGGCCTCTACTACATCTACGCGCAGGTGACCTTCTGCAGCAACCGCGAGGCTTCCTC
CCAAGCTCCCTTCATCGCATCTCTGTGCCTGAAAAGCCCTGGCCGCTTCGAGCGGATTCTCCTTCGTGCA
GCAAACACTCACTCGTCCGCCAAGCCCTGTGGACAGCAGAGCATCCACCTGGGCGGCGTGTTCGAGCTG
CAGCCAGGCGCCTCCGTGTTCGTCAATGTGACCGACCCGTCCCAGGTGTCCCATGGCACTGGCTTCACCT
CCTTCGGCCTCCTCAAACTGTCCGGCGGCGGTGGCAGTGGTGGCGGGGGGATCAGGTGGCGGCGGCTCC
GGAGGTGGCGGGTCCGGGGGAGGTTCTCTTCAGCTTCTGCCTAGCTGGGCGATCACCCTGATCTCCGTT
AATGGCATCTTCGTCATTTGTTGTTTGACCTATTGCTTTGCCCCGAGATGTCGAGAGCGTAGACGCAACG
AGCGCCTGCGCCGTGAAAGCGTGCGACCTGTGCGCGCTAAGCGCAGCGGCTCCGGCGCTACCAACTTCT
CATTACTCAAGCAGGCTGGAGATGTAGAGGAGAATCCAGGGCCAATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCC
TGGTGGCCGCCGCGACTCGCGTCCACAGTAATTGGGTCAACGTGATCTCTGACCTGAAAAAGATTGAGG
ACTTGATCCAGAGCATGCACATTGACGCTACCCTGTACACGGAGAGTGACGTGCACCCCTCGTGCAAGG
TGACAGCCATGAAGTGCTTTTTGCTGGAGTTGCAGGTCATCTCTCTAGAGAGCGGTGATGCCTCCATCCA
TGACACCGTGGAGAACCTTATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCGAGCAACGGCAACGTGACCGAGTC
CGGGTGCAAGGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCCTGCAGTCGTTTGTGCACA
TCGTGCAGATGTTTATTAACACCTCTTCTGGCGGTGGGGGATCGGGGGGGGGCGGCTCCGGCGGTGGC
GGTTCTGGAGGCGGTGGTTCTGGCGGGGGATCTTTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCGATCACTCTCATT
TCCGTGAACGGCATTTTCGTCATTTGCTGTTTGACCTACTGCTTTGCTCCGAGGTGTCGCGAGCGTCGCC
GCAACGAGCGCCTACGGCGGGAATCGGTGAGGCCCGTG (配列番号 323)

【図３８Ａ】

シグナル配列：MDWTWILFLVAAATRVHS（配列番号252）
シグナル配列：MYRMQLLSCIALSLALVTNS（配列番号254）
リンカー{Lr1}：SGGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSLQ（配列番号246）
アンカー{Ac2}：(ヒトＢ７．１膜貫通細胞内のアミノ酸配列)
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号239）
フリンＡ－Ｐ２Ａ配列：RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号251）
）

テザリングされたＩＬ－２
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
SGGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号324）

テザリングされたＩＬ－２
ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGTTGAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAATTTCCATCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTGGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGTCGGGCGGTGGGGGCTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTGCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGT
GA（配列番号325）

【図３８Ｂ】

テザリングされたＩＬ－１２
MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS
SDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL
KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL
ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELM
QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS SGGGGSGGGSGGGGSGGGSGGGSLQ
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号326）

テザリングされたＩＬ－１２
ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGTTGAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAATTTCCATCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTGGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGTCGGGCGGTGGGGGCTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTGCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGT
GA（配列番号327）

【図３８Ｃ】

テザリングされたＩＬ－１５
MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQ
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号328）

テザリングされたＩＬ－１５
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCGGCCACCCGTGTACACAGCAACTGGGTCAATGTGATCTCCG
ACCTGAAGAAGATTGAGGACCTCATCCAGTCTATGCACATTGACGCAACACTTTACACCGAGAGCGATGTGCACCC
CTCTTGCAAGGTGACTGCCATGAAATGTTTCTTGCTCGAATTGCAGGTCATCTCTCTGGAGAGTGGGGACGCTTCC
ATACATGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTCTCGTCAAATGGCAACGTGACTGAGAGC
GGGTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCA
GATGTTTATTAACACGTCGTCCGGAGGCGGGGGCTCTGGTGGCGGCGGCTCCGGGGGAGGCGGCTCCGGTGGC
GGTGGTTCCGGCGGAGGCTCGCTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCCATCACCCTTATTTCTGTCAACGGCATCTTCG
TTATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTGTCGCGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGAGAAT
CCGTGCGCCCTGTGTGA（配列番号329）

CD40L
MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLL
NCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQ
LTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNV
TDPSQVSHGTGFTSFGLLKL（配列番号273）

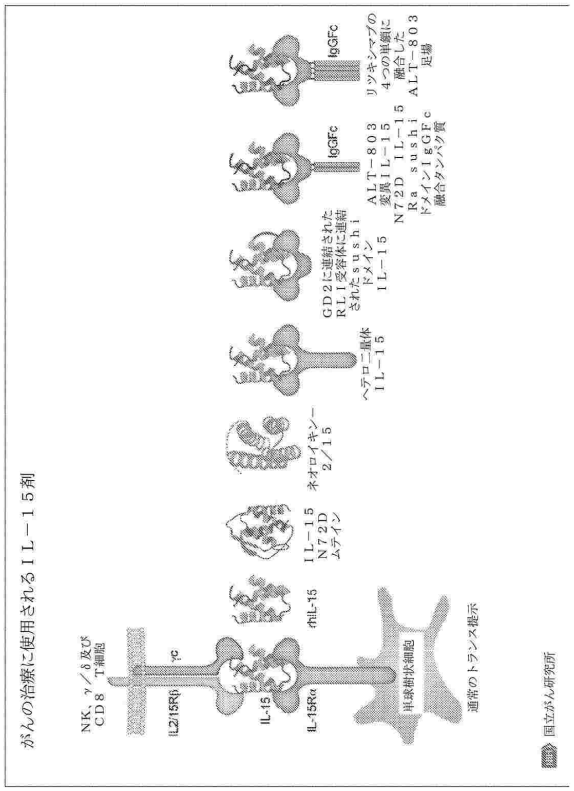
CD40L
ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCTTCATGTA
TCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTGTACTTGCACCGCCGCCTGGACA
AAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAGAGGTGTAACACTGGCGAGC
GTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGAGATCAAGAGCCAGTTCGAGGGCTTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAA
GGAGGAGACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGGTGATCAGAACCCCCAAATTGCAGCGCATGTGA
TAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCAGTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACC
TGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGACGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACG
TTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCTCTCAGGCTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGA
GCGAATCCTGCTCCGCGCCGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGAGCATCCACCTTGGTGG
GGTTTTTGAGCTGCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGC
TTCACCTCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG（配列番号321）

【図３８Ｄ】

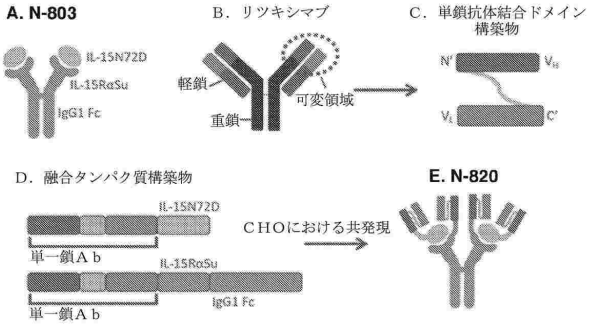
GFP
ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC
GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA（配列番号330）

テザリングされたＩＬ－２１
MDWTWILFLVAAATRVHSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQK
AQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRT
HGSEDS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICC
LTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV（配列番号331）

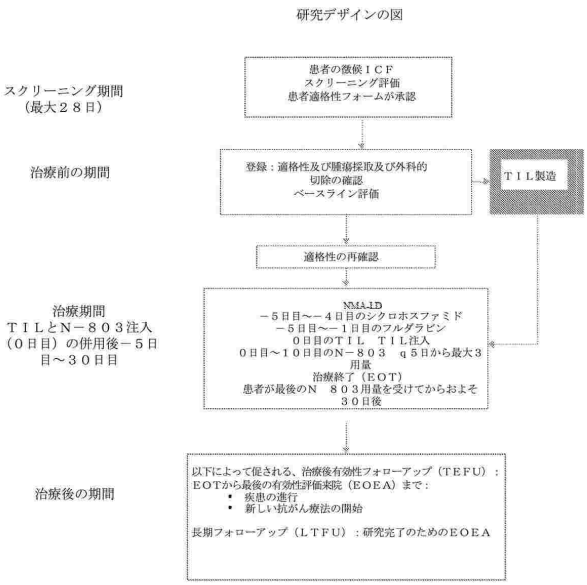
【図３９】



【図４０】



【図４１】



【配列表】

<u>20255165510000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066795

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61K35/17 A61K38/20 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2022/133801 A1 (KHATTAR MITHUN [US] ET AL) 5 May 2022 (2022-05-05) the whole document ----- -/--	1,7, 13-26, 28-35, 48, 65-92, 112-120

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 August 2023	05/09/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Teyssier, Bertrand

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066795

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KHATTAR M ET AL: "cytoTIL15: A novel TIL therapy for melanoma with superior potency and enhanced persistence without IL2 to improve safety & efficacy and expand patient eligibility", ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 32, no. S5, 1008P, 21 September 2021 (2021-09-21), page S852, XP055912316, ESMO Congress; virtual; 16-21 September 2021 DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.1392 abstract -----	1,7, 13-26, 28-35, 48, 65-92, 112-120
X	BURGA R ET AL: "Genetically engineered tumor-infiltrating lymphocytes (cytoTIL15) exhibit IL-2-independent persistence and anti-tumor efficacy against melanoma in vivo", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 9, no. Suppl. 2, 166, November 2021 (2021-11), page A176, XP055912329, 36th Annual Meeting of the Society for Immunotherapy of Cancer; virtual; 11-14 November 2021 DOI: 10.1136/jitc-2021-SITC2021.166 abstract -----	1,7, 13-26, 28-35, 48, 65-92, 112-120
X	TCHAICHA E H ET AL: "Allogeneic, IL-2-independent tumor-infiltrating lymphocytes expressing membrane-bound IL-15 (cytoTIL15) eradicate tumors in a melanoma PDX model through recognition of shared tumor antigens", CANCER RESEARCH, vol. 82, no. 12, Supplement, LB212, June 2022 (2022-06), XP093074882, AACR Annual Meeting; New Orleans, LA, USA; 8-13 April 2022 ISSN: 1538-7445 abstract -----	1,7, 13-26, 28-35, 48, 65-92, 112-120
Y	SARNAIK A A ET AL: "Lifileucel, a Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy, in Metastatic Melanoma", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 39, no. 24, 20 August 2021 (2021-08-20), pages 2656-2666, XP055947704, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.21.00612 the whole document -----	1-35,48, 65-92, 112-120

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066795

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERGAMASCHI C ET AL: "Heterodimeric IL-15 in Cancer Immunotherapy", CANCERS, vol. 13, no. 4, 837, 17 February 2021 (2021-02-17), XP093056090, DOI: 10.3390/cancers13040837 the whole document -----	1-35,48, 65-92, 106, 112-120
Y	WRANGLE J M ET AL: "ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial", THE LANCET ONCOLOGY, vol. 19, no. 5, 5 April 2018 (2018-04-05), pages 694-704, XP055605963, DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30148-7 cited in the application the whole document -----	1-27,35, 48, 65-92, 106, 112-120
Y	CONLON K ET AL: "Phase I study of single agent NIZ985, a recombinant heterodimeric IL-15 agonist, in adult patients with metastatic or unresectable solid tumors", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 9, no. 11, E003388, November 2021 (2021-11), XP055964474, DOI: 10.1136/jitc-2021-003388 cited in the application the whole document -----	1-27,35, 48, 65-92, 106, 112-120
Y	XU Y ET AL: "An Engineered IL15 Cytokine Mutein Fused to an Anti-PD1 Improves Intratumoral T-cell Function and Antitumor Immunity", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 9, no. 10, October 2021 (2021-10), pages 1141-1157, XP093054460, ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0058 the whole document -----	1-35,48, 65-92, 106, 112-120
	-/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066795

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTOMO S ET AL: "Anti-PD-L1/IL-15 fusion protein demonstrated efficient T-cell redirected killing of PD-L1 expressing target cells and in vivo efficacy that correlated to its retention in tumors", CANCER RESEARCH, vol. 80, no. 16_Supplement, 2827, 15 August 2020 (2020-08-15), XP093074883, AACR Annual Meeting; Philadelphia, PA, USA; 22-24 June 2020 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2020-2827 abstract ----- JUDGE S J ET AL: "Analysis of tumor-infiltrating NK and T cells highlights IL-15 stimulation and TIGIT blockade as a combination immunotherapy strategy for soft tissue sarcomas", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 8, no. 2, E001355, November 2020 (2020-11), XP093074864, DOI: 10.1136/jitc-2020-001355 the whole document ----- CHAUVIN J-M ET AL: "IL-15 Stimulation with TIGIT Blockade Reverses CD155-mediated NK-Cell Dysfunction in Melanoma", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 26, no. 20, 15 October 2020 (2020-10-15), pages 5520-5533, XP093074875, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0575 the whole document -----	1-35,48, 65-92, 106, 112-120 1-35,48, 65-92, 106, 112-120 1-35,48, 65-92, 106, 112-120

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066795

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/066795

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 36-47, 49-64, 93-105, 107-111
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/US2023/066795

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 36-47, 49-64, 93-105, 107-111

Pursuant to PCT Guidelines A5.26[1], relied upon by this Authority, a product defined by way of reference to its process of production is to be considered in an absolute manner, irrespective of how a similar or equivalent product may actually be produced. Present dependent claims 36-47, 49-64, 93-105 and 107-111 pertain to methods of treating a cancer using an IL-15R agonist and tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) which are defined by way of reference to their process of obtention, which is subject-matter covered by Rule 39.1(iv) PCT and interpreted by this Authority as a product claim restricted by the intended therapeutic application. It is not apparent which distinctive characteristics, if any, may be imparted to the TILs by the processes of obtention referred to in said dependent claims, and the lack of definition of the essential technical features of the (underlying) product is such that no meaningful search can be be carried out for these claims (Article 17(2)(a)(ii) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/066795

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2022133801 A1	05-05-2022	AU 2022210485 A1	17-08-2023
		AU 2022211438 A1	17-08-2023
		CA 3205291 A1	28-07-2022
		CA 3205293 A1	28-07-2022
		CO 2023009868 A2	09-08-2023
		US 2022133801 A1	05-05-2022
		WO 2022159935 A1	28-07-2022
		WO 2022159939 A1	28-07-2022

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI				テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/185(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/185			
Ａ６１Ｋ	*39/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00			
Ａ６１Ｋ	*31/4164(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4164			
Ａ６１Ｋ	*31/4188(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4188			
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02			
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１		
		Ａ６１Ｐ	43/00		ＺＮＡ	

(32)優先日　令和4年5月10日(2022.5.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

アメリカ合衆国，テネシー州　３７２２１　ナッシュビル　ポロ　クラブ　ロード　２９４５

Ｆターム（参考）　4C084　AA19 BA44 DA12 NA05 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751 ZC752

4C085　AA14 BB11 EE03

4C086　AA01 AA02 BC38 CB05 DA38 EA18 MA02 MA03 MA04 MA66 NA05 ZB26 ZB27 ZC75

4C087　AA01 AA02 BB43 CA04 MA02 MA65 NA05 ZB26 ZC75

4C206　AA01 AA02 JA52 MA03 MA04 NA05 ZB26 ZB27 ZC75