

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-500403
(P2024-500403A)

(43)公表日 令和6年1月9日(2024.1.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z N A	4 B 0 2 9
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20		4 B 0 6 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/078(2010.01)	C 1 2 N	5/078		4 C 0 8 7
C 0 7 K	14/55 (2006.01)	C 0 7 K	14/55		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全435頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-536824(P2023-536824)	(71)出願人	519006377		
(86)(22)出願日	令和3年12月16日(2021.12.16)		アイオバンス バイオセラピューティク		
(85)翻訳文提出日	令和5年8月15日(2023.8.15)		ス, インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/063922		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9		
(87)国際公開番号	WO2022/133149		4 0 7 0 サン カルロス インダストリ		
(87)国際公開日	令和4年6月23日(2022.6.23)		アル ロード 8 2 5 스위트 4 0 0		
(31)優先権主張番号	63/248,944	(74)代理人	100079108		
(32)優先日	令和3年9月27日(2021.9.27)		弁理士 稲葉 良幸		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109346		
(31)優先権主張番号	63/146,424		弁理士 大貫 敏史		
(32)優先日	令和3年2月5日(2021.2.5)	(74)代理人	100117189		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 江口 昭彦		
(31)優先権主張番号	63/127,050	(74)代理人	100134120		
			弁理士 内藤 和彦		
		(72)発明者	フィンケンシュタイン, フリードリヒ		
			最終頁に続く		

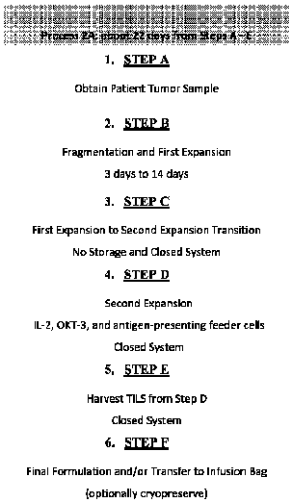
(54)【発明の名称】 腫瘍浸潤リンパ球によるがんの治療

(57)【要約】

がん（例えば、小児癌、ブドウ膜黒色腫または中皮腫）を有する患者の治療に用いることができるT I Lを生成するための方法が、本明細書に提供される。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、任意選択で、前記患者または前記対象が、少なくとも1つの前療法を受けている、前記方法。

【請求項 2】

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

（a）前記対象から取得された腫瘍試料を1）複数の腫瘍断片または2）腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または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、

10

（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集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、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、

20

（e）ステップ（d）から取得された前記治療的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）からの採取された前記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、

30

（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、

（h）治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（g）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 3】

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

（a）対象から取得された腫瘍試料を1）複数の腫瘍断片または2）腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

40

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

50

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）からの採取された前記第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（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、

（h）治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（g）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項4】

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

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

（b）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集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、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）からの採取された前記第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（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、

（h）治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（g）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項5】

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

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

（b）前記腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、

10

20

30

40

50

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 T I L 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 T I L 集団を産生するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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) からの採取された前記第 3 の T I L 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 T I L 集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 6】

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

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞と T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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、I L - 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 T I L 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 T I L 集団の急速拡張を行い、第 3 の T I L 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、I L - 2、O K T - 3 (抗 C D 3 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 (P B M C) 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 T I L 拡張が、前記急速な第 2 の拡張の開始後 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日または 10 日にわたって進行することができる、前記第 3 の T I L 集団を取得するステップと、

(g) 前記第 3 の T I L 集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 7】

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

(a) 前記対象または前記患者からがんを切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞と T I L 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 T I L 集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(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 T I L 集団の初期拡張 (またはプライミ

10

20

30

40

50

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、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

10

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

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

【請求項8】

ステップ(c)における前記第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2～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記がんが、中皮腫である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記中皮腫が、胸膜中皮腫、腹膜中皮腫、及び心膜中皮腫から選択される、請求項9に記載の方法。

20

【請求項11】

前記中皮腫が、上皮様中皮腫、肉腫様中皮腫、及び二相性中皮腫から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

前記中皮腫が、上皮様中皮腫、肉腫様中皮腫、及び二相性中皮腫から選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

前記中皮腫が、腺腫様中皮腫、嚢胞性中皮腫、脱形成性中皮腫、高分化乳頭状中皮腫、及び小細胞中皮腫から選択される、請求項9に記載の方法。

30

【請求項14】

前記患者が、前記中皮腫の治療を以前に受けていた、請求項9～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記以前の治療が、手術、放射線療法、化学療法、免疫療法、またはそれらの組み合わせである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記化学療法が、白金系シスプラチン、白金系カルボプラチン、またはカルボプラチンを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記免疫療法が、抗PD-1抗体治療、抗CTLA-4抗体治療、またはそれらの組み合わせを含む、請求項15に記載の方法。

40

【請求項18】

前記患者が、免疫療法も投与される、請求項9～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記免疫療法が、抗PD-1抗体治療、抗CTLA-4抗体治療、またはそれらの組み合わせである、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記がんが、小児癌である、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

50

前記がんが、ブドウ膜黒色腫である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ブドウ膜黒色腫が、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記小児癌が、神経芽腫である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記小児癌が、肉腫である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記肉腫が、骨肉腫である、請求項 2 4 に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

前記肉腫が、軟部組織肉腫である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記軟部組織肉腫が、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、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記小児癌が、中枢神経系（CNS）関連がんである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記CNS関連がんが、髄芽腫、松果体芽腫、神経膠腫、または上皮腫、神経膠芽細胞腫である、請求項 2 8 に記載の方法。

20

【請求項 3 0】

前記患者が、2歳未満、2歳～12歳未満、または12歳～21歳未満である、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記患者の体重が、40kg以下である、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記患者の体重が、8kg以上40kg以下である、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記患者が、ジヌツキシマブ治療を以前に受けている、請求項 2 3 に記載の方法。

30

【請求項 3 4】

前記患者が、ジヌツキシマブ治療を以前に受けていない、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記神経芽腫が、ジヌツキシマブに対して不応性である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記患者が、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けている、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記患者が、以前に硫酸ビンクリスチン治療を受けていない、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 3 8】

前記神経芽腫が、硫酸ビンクリスチン治療に対して不応性である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記小児癌が、ユーイング肉腫であり、前記患者が、ダクチノマイシン治療を以前に受けている、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記小児癌が、ユーイング肉腫であり、前記患者が、ダクチノマイシン治療を以前に受けていない、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

50

前記小児癌が、ユーイング肉腫であり、前記ユーイング肉腫が、ダクチノマイシンに対して不応性である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 42】

前記小児癌が、横紋筋肉腫であり、前記患者が、ダクチノマイシン治療を以前に受けている、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 43】

前記小児癌が、横紋筋肉腫であり、前記患者が、ダクチノマイシン治療を以前に受けていない、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 44】

前記小児癌が、横紋筋肉腫であり、前記横紋筋肉腫が、ダクチノマイシンに対して不応性である、請求項 27 に記載の方法。

10

【請求項 45】

前記小児癌が、横紋筋肉腫であり、前記患者が、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けている、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 46】

前記小児癌が、横紋筋肉腫であり、前記患者が、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けていない、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 47】

前記小児癌が、横紋筋肉腫であり、前記横紋筋肉腫が、硫酸ビンクリスチン治療に対して不応性である、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 48】

前記第 1 の拡張が、約 11 日の期間にわたって行われる、請求項 2～5 及び 8～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

前記初期拡張が、約 11 日の期間にわたって行われる、請求項 6～46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

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 1000 IU/mL～6000 IU/mL の初期濃度で存在する、請求項 2～5 及び 8～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 51】

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 1000 IU/mL～6000 IU/mL の初期濃度で存在する、請求項 6～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 52】

前記第 2 の拡張ステップにおいて、前記 IL-2 が、1000 IU/mL～6000 IU/mL の初期濃度で存在し、前記 OKT-3 抗体が、約 30 ng/mL の初期濃度で存在する、請求項 2～5 及び 8～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 53】

前記急速拡張ステップにおいて、前記 IL-2 が、1000 IU/mL～6000 IU/mL の初期濃度で存在し、前記 OKT-3 抗体が、約 30 ng/mL の初期濃度で存在する、請求項 6～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 54】

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 2～5 及び 8～47 に記載の方法。

【請求項 55】

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 6～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 56】

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 2～5 及び 8～47 の

50

いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 57】

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 6～47 に記載の方法。

【請求項 58】

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 2～5 及び 8～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 59】

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 6～47 に記載の方法。

10

【請求項 60】

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 2～5 及び 8～47 のいずれか 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 61】

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 6～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 62】

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 1～61 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 63】

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 $60 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 5 日間投与するステップを含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

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 $60 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、及びフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 3 日間投与するステップを含む、請求項 62 に記載の方法。

30

【請求項 65】

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 63 または 64 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 66】

前記患者への前記第 3 の 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 1～65 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 67】

前記患者への前記第 3 の 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 1～65 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 68】

前記 IL-2 レジメンが、許容範囲まで 8 時間毎に 15 分間のボラス静脈内注入として投与される、600, 000 もしくは 720, 000 IU/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エーションを含む高用量 IL-2 レジメンである、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

治療上有効な TIL 集団が投与され、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} TIL を含む、請求項 1～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

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 6～69 のいずれか 1

50

項に記載の方法。

【請求項 7 1】

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 6～6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

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 6～6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

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 1 1 日の期間内に個別に行われる、請求項 2～5 及び 8～6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

ステップ (a)～(f) が、約 1 0 日～約 2 2 日で行われる、請求項 2～5 及び 8～6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 5】

ステップ (a) において前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

ステップ (a) において前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を機械的に破壊して前記腫瘍試料を解離することをさらに含む、請求項 2 または 3 または 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

ステップ (a) において、前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、密度勾配分離を使用して前記解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む、請求項 2 または 3 または 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記酵素培地が、D N a s e を含む、請求項 7 5～7 7 に記載のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 9】

前記酵素培地が、3 0 単位／m L の D N a s e を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、請求項 7 5～7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記酵素培地が、1 . 0 m g ／m L のコラゲナーゼを含む、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記がんが、V 6 0 0 変異を有するがんである、請求項 9～8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記 V 6 0 0 変異が、V 6 0 0 E 変異、V 6 0 0 E 2 変異、V 6 0 0 K 変異、V 6 0 0 R 変異、V 6 0 0 M 4 変異、及び V 6 0 0 D 変異からなる群から選択される、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記方法が、少なくとも 1 つの B R A F 及び／または M E K 阻害剤を前記対象または前記患者に投与することをさらに含む、請求項 8 2～8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

先行請求項のいずれか 1 項に記載の T I L 組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

関連出願の相互参照

本出願は、2020年12月17日に出願された米国仮特許出願第63/127,050号、2021年2月5日に出願された米国仮特許出願第63/146,424号、2021年3月17日に出願された米国仮特許出願第63/162,437号、及び2021年9月27日に出願された米国仮特許出願第63/248,944号の優先権を主張し、これらは参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の組み込みパラグラフ

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2021年12月16日に作成された当該ASCIIコ

10

ピーは、116983-5083-WO__ST25.txtという名前で、サイズは245,455バイトである。

【背景技術】

【0003】

小児における固形腫瘍は、すべての小児癌のおよそ30%を占める(Kline et al. 2003)。また、満たされていないニーズが高いと特定されている最も一般的な腫瘍のうちのいくつかには、神経芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、及びCNS悪性腫瘍が含まれる。これらのがんの治療には、外科的切除、化学療法、及び放射線療法を伴う多様なアプローチが含まれる。異なる腫瘍組織間の生存率は異なる。再発または不応性疾患を有するすべての患者は、最悪の予後を有し、新しい革新的な治療アプローチ

20

が必要とされる集団である。

【0004】

小児における最も一般的な肉腫は、横紋筋肉腫(RMS、筋肉)、骨肉腫(骨細胞)、及びユーイング肉腫(EWS、骨の内側または外側)である。横紋筋肉腫は、小児における最も一般的な軟部組織肉腫であるが(Skapek et al. 2019)、ユーイング肉腫は、小児及び青年における別の侵襲的な軟部組織肉腫である。骨肉腫は、小児患者における最も一般的な骨腫瘍である。米国では、毎年およそ400人の新しい骨肉腫症例が診断されており、患者の20%が、最も頻繁に肺の転移性疾患と診断されている。米国では、毎年約400~500人の新しいRMS症例が発生している。ほとんどが小児及び青年において診断され、その半数より多くが10歳未満の小児である(National Cancer Institute [NCI]-Childhood Rhabdomyosarcoma Treatment PDQ(登録商標))。EWSは、米国において年に約200人の小児及び青年に起こり、約半数が10~20歳である。すべての肉腫は、手術、放射線療法、及び化学療法の多様なアプローチで治療される。軟部組織肉腫については、限局性疾患を有する小児及び青年において65%~85%の5年生存率が見られているが、転移性疾患及び再発を有するEWS、RMS、及びOS患者の全生存(OS)は、現在の療法にもかかわらず低いままであり、5年OSは30%未満である(Howlader et al. 2017、Gaspar et al. 2015、Leary et al. 2013、Zhang et al. 2018、Oberlin et al. 2008)。

30

【0005】

中枢神経系(CNS)腫瘍は、小児における固形腫瘍の最も一般的なタイプである。それらは、すべての小児癌診断の20%近くを占めるが、まとめると、それらは非常に異質な疾患のグループである。いくつかのより一般的なタイプには、髄芽腫、未分化神経外胚葉性腫瘍(PNET)、松果芽腫、神経膠腫、及び上衣腫が含まれ(Udaka and Packer 2018)、これらの腫瘍タイプの各々は、個別には非常にまれである。治療には、外科的切除、放射線療法、及び化学療法が含まれる。生存率は、組織学、外科的切除、及び転移に応じて異なる。一般に、再発性疾患を有する患者の生存率は不良である。

40

【0006】

50

CPI、養子細胞移植（ACT）、及び他の免疫療法を使用して免疫系を操作する能力は、成人のがん治療における重要な進歩をもたらした。細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）またはプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）標的化抗体などのCPIは、機能不全T細胞の再活性化を通じて効果的な免疫応答を誘導する。CPIで観察された抗腫瘍応答は、腫瘍反応性T細胞の存在及びそれらの免疫療法的可能性を示す。

【0007】

これまでのほとんどの進歩は成人がん患者の治療におけるものであったが、小児及び青年においても、小児悪性腫瘍の治療のためのCTLA-4阻害剤Yervoy（イピリムマブ）及びCD19指向性遺伝子修飾自家T細胞療法Kymriah（チサゲンレクルユーセル）などの免疫療法の最近の規制承認によって証明される、奨励データが見られている。しかしながら、CPI単独療法は、小児患者において低い奏効率のみをもたらし、患者は、CPIによる治療後に再発する可能性がある（Geoerger et al., 2020）。したがって、臨床的証拠は、CPI単独療法がほとんどの小児悪性腫瘍を治療するには不十分であり、代替案を調査する必要があることを示唆している（Accelerate EMA Pediatric Strategy Forum, 2018）。

【0008】

ブドウ膜黒色腫は、虹彩、毛様体、または脈絡膜（総称してブドウ膜と称される）を伴う眼のがん（黒色腫）である。腫瘍は、ブドウ膜内に存在し、眼に色を付ける色素細胞（メラノサイト）から生じる。眼黒色腫が身体の遠位部分に広がる場合、5年生存率は、約15%である。

【0009】

ブドウ膜黒色腫の一次治療には、罹患した眼の除去（摘出）が含まれ得る。ブドウ膜黒色腫の最も一般的な放射線治療は、ブランク近接照射療法であり、放射性種子を収容する小さな円盤形のシールド（ブランク）が、腫瘍の上にある眼の外面に付着している。近接照射療法に関連する合併症は、麻酔を必要とする2つの侵襲的手術の必要性と、健康な眼組織に対する放射線毒性効果に関連している。後脈絡膜腫瘍は、最も一般的なブドウ膜黒色腫であるため、ブランクの配置及び除去の両方に典型的には、眼外筋除去が必要である。両方の解剖は、複視を誘発するリスクを伴う。近接照射療法後の放射線誘発性合併症は多数あり、腫瘍の大きさ、腫瘍の位置、放射線の使用量、及び使用率に依存し得る。

【0010】

中皮腫は、内臓器官の中皮から発症するがんであり、一般的に肺及び胸壁の内膜に影響を及ぼす。中皮腫の症例の大部分は、アスベストへの曝露によって引き起こされる。悪性中皮腫には、上皮型、肉腫型、及び二相性の3つの主要な組織学的サブタイプがある。上皮様及び二相性中皮腫は、中皮腫のおよそ75~95%を占め、組織学的によく特徴付けられている。ほとんどの中皮腫は、サブタイプに関係なく、高レベルのサイトケラチン5を発現する。

【0011】

これまでのところ、中皮腫の治療は限られた成果を収めており、長期生存及び治療は非常にまれである。中皮腫は、一般に放射線及び化学療法に耐性がある。手術は期待外れであると分かり、いくつかの研究では、手術による生存期間の中央値がおおよそわずか12ヶ月であったことが示されている。免疫療法は、可変の結果をもたらした。イピリムマブを併用したニボルマブは、カーサー（curther）によって除去できない悪性胸膜中皮腫を有する成人の第一選択治療として使用されている。さらに、手術、放射線または光線力学的療法及び化学療法の併用アプローチを含むマルチモーダル療法は、中皮腫を治療するための日常業務には提案されていない。マルチモーダル療法の有効性及び安全性は明確ではなく、ある臨床試験では有害作用のリスクが上昇する可能性が示唆されている。

【0012】

したがって、小児癌、ブドウ膜黒色腫及び中皮腫を含む、ある特定のがんに対する新しい治療法の開発が必要である。

【発明の概要】

【0013】

小児癌またはブドウ膜黒色腫を有する患者の治療に用いることができるTILを生成するための方法が、本明細書に提供される。

【0014】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、任意選択で、患者または対象が、少なくとも1つの前療法を受けている。

【0015】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

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

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

（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、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、

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

【0016】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

（a）対象から取得された腫瘍試料を1）複数の腫瘍断片または2）腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

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

10

20

30

40

50

）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、

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

【0017】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

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

（b）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、

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

【0018】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

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

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、第1のガ

10

20

30

40

50

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、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

【0019】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

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

(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、

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

【0020】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

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

(b) 腫瘍を、腫瘍断片に断片化するステップと、

(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

10

20

30

40

50

培地、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) 第3のTIL集団の治療上有効な部分のがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)の第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。

【0022】

いくつかの実施形態では、ステップ(e)の第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。

【0023】

いくつかの実施形態では、がんは、中皮腫である。

【0024】

いくつかの実施形態では、中皮腫は、胸膜中皮腫、腹膜中皮腫、及び心膜中皮腫から選択される。

20

【0025】

いくつかの実施形態では、中皮腫は、上皮様中皮腫、肉腫様中皮腫、及び二相性中皮腫から選択される。

【0026】

いくつかの実施形態では、中皮腫は、上皮様中皮腫、肉腫様中皮腫、及び二相性中皮腫から選択される。

【0027】

いくつかの実施形態では、中皮腫は、腺腫様中皮腫、嚢胞性中皮腫、脱形成性中皮腫、高分化乳頭状中皮腫、及び小細胞中皮腫から選択される。

30

【0028】

いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫の治療を以前に受けていた。いくつかの実施形態では、以前の治療は、手術、放射線療法、化学療法、免疫療法、またはそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、化学療法は、白金系シスプラチン、白金系カルボプラチン、またはカルボプラチンを含む。いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD-1抗体治療、抗CTLA-4抗体治療、またはそれらの組み合わせを含む。

【0029】

いくつかの実施形態では、患者はまた、免疫療法を投与される。いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD-1抗体治療、抗CTLA-4抗体治療、またはそれらの組み合わせである。

40

【0030】

いくつかの実施形態では、がんは、小児癌である。

【0031】

いくつかの実施形態では、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【0032】

いくつかの実施形態では、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。

【0033】

いくつかの実施形態では、小児癌は、神経芽腫である。

50

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、肉腫である。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、肉腫は、骨肉腫である。

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態では、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態では、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。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、中枢神経系（CNS）関連癌である。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、CNS関連がんは、髄芽腫、松果体芽腫、神経膠腫、または上皮腫、神経膠芽細胞腫である。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、患者は、2歳未満、2歳～12歳未満、または12歳～21歳未満である。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、患者は、40kg以下の体重である。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、患者は、8kg以上及び40kg以下の体重である。

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態では、患者は、ジヌツキシマブ治療を以前に受けている。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、患者は、ジヌツキシマブ治療を以前に受けていない。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態では、神経芽腫は、ジヌツキシマブに対して不応性である。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、患者は、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けている。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、患者は、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けていない。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、神経芽腫は、硫酸ビンクリスチンに対して不応性である。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、ユーイング肉腫であり、患者は、ダクチノマイシン治療を以前に受けている。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、ユーイング肉腫であり、患者は、ダクチノマイシン治療を以前に受けていない。

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、ユーイング肉腫であり、ユーイング肉腫は、ダクチノマイシンに対して不応性である。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫であり、患者は、ダクチノマイシン治療を以前に受けている。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫であり、患者は、ダクチノマイシン治療を以前に受けていない。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫であり、横紋筋肉腫は、ダクチノマイ

10

20

30

40

50

シンに対して不応性である。

【0055】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫であり、患者は、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けている。

【0056】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫であり、患者は、硫酸ビンクリスチン治療を以前に受けていない。

【0057】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫であり、横紋筋肉腫は、硫酸ビンクリスチン治療に対して不応性である。

【0058】

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。

【0059】

いくつかの実施形態では、初期拡張は、約11日の期間にわたって行われる。

【0060】

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1000 IU/mL ~ 6000 IU/mLの初期濃度で存在する。

【0061】

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1000 IU/mL ~ 6000 IU/mLの間の初期濃度で存在する。

【0062】

いくつかの実施形態では、第2の拡張ステップ、IL-2は、1000 IU/mL ~ 6000 IU/mLの初期濃度で存在し、OKT-3抗体は、約30 ng/mLの初期濃度で存在する。

【0063】

いくつかの実施形態では、急速拡張ステップ、IL-2は、1000 IU/mL ~ 6000 IU/mLの初期濃度で存在し、OKT-3抗体は、約30 ng/mLの初期濃度で存在する。

【0064】

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。

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

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。

【0068】

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。

【0069】

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。

【0070】

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。

【0071】

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-

10

20

30

40

50

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。

【0072】

いくつかの実施形態では、この方法は、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。

【0073】

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 60 mg/m^2 /日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で5日間投与するステップを含む。

【0074】

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 60 mg/m^2 /日の用量で、フルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で3日間投与するステップを含む。

【0075】

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。

【0076】

いくつかの実施形態では、この方法は、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。

【0077】

いくつかの実施形態では、この方法は、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。

【0078】

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分間のボラス静脈内注入として投与される、 $600, 000$ もしくは $720, 000 \text{ IU/kg}$ 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エーションを含む高用量IL-2レジメンである。

【0079】

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、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} TILを含む。

【0080】

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。

【0081】

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。

【0082】

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。

【0083】

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。

【0084】

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。

【0085】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を機械的に破壊して腫瘍試料を解離することをさらに含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において対象から取得された腫瘍試料を処理

10

20

30

40

50

することは、密度勾配分離を使用して解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、DNaseを含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、30単位/mLのDNaseを含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、コラゲナーゼを含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、1.0mg/mLのコラゲナーゼを含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有するがんである。

【0093】

いくつかの実施形態では、V600変異は、V600E変異、V600E2変異、V600K変異、V600R変異、V600M4変異、及びV600D変異からなる群から選択される。

【0094】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つのBRAF及び／またはMEK阻害剤を対象または患者に投与することをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0095】

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

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

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

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

【図3】凍結保存されたTILの例示的な製造プロセス（約22日）の実施形態の図を示す。

【図4】TIL製造のための22日プロセスである、Gen2（プロセス2A）の実施形態の図を示す。

【図5】TIL製造のためのプロセス1C及びGen2（プロセス2A）の例示的な実施形態からのステップA～Fの比較表。

【図6】TIL製造のためのプロセス1Cの実施形態とGen2（プロセス2A）の実施形態との詳細な比較。

【図7】例示的なGen3型TIL製造プロセス。

【図8A】TIL製造のための2Aプロセス（およそ22日プロセス）とGen3プロセス（およそ14日～16日プロセス）の実施形態との比較を示す。

【図8B】ステップA～Fの概要を提供する例示的なプロセスGen3チャート（およそ14日～16日プロセス）。

【図8C】3つのプロセスバリエーションの各々について、ステップA～F（およそ14日～16日プロセス）の概要とともに3つの例示的なGen3プロセスを提供するチャート。

【図8D】ステップA～Fの概要を提供する例示的な修正Gen2様プロセス（およそ22日プロセス）。

【図9】Gen2（プロセス2A）とGen3プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。

【図10】様々なGen2（プロセス2A）とGen3.1プロセス実施形態との比較を示す。

【図11】Gen2、Gen2.1及びGen3.0プロセスの実施形態の様々な特徴を

10

20

30

40

50

説明する表。

【図 1 2】 Gen 3 . 1 と称される、Gen 3 プロセスの実施形態のための培地条件の概要。

【図 1 3】 Gen 2、Gen 2 . 1 及び Gen 3 . 0 プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。

【図 1 4】 Gen 2 及び Gen 3 . 0 プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。

【図 1 5】 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 1 6】 Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図 1 7】 Gen 3 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。

10

【図 1 8】 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 - 1 B B L または 4 - 1 B B に結合する抗体から誘導される 3 つの線形に結合した T N F R S F 結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれを I g G 1 - F c（C H 3 及び C H 2 ドメインを含む）によって第 2 の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの 2 つをジスルフィド結合（小さい長楕円）によって一緒に結合し、構造を安定化し、6 つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示される T N F R S F 結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のための G l y 及び S e r 配列、ならびに溶解性のための G l u 及び L y s 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、s c F v ドメインであり得る。

20

【図 1 9】 Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図 2 0】 Gen 3 . 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 2 1】 Gen 3 . 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 2 2】 Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図 2 3 A】 例示的な Gen 2 プロセス及び例示的な Gen 3 プロセスの比較表。

【図 2 3 B】 例示的な Gen 2 プロセス及び例示的な Gen 3 プロセスの比較表。

【図 2 4】 Gen 3 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。

30

【図 2 5】 Gen 3 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 2 6 A】 Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図 2 6 B】 Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図 2 7】 Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図 2 8】 Gen 2、Gen 2 . 1、及び Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の実施形態の比較。

【図 2 9】 Gen 2、Gen 2 . 1、及び Gen 3 プロセス（16 日プロセス）の実施形態の比較。

【図 3 0】 Gen 3 実施形態の構成要素。

40

【図 3 1】 Gen 3 実施形態のフローチャート比較（Gen 3 . 0、Gen 3 . 1 対照、Gen 3 . 1 試験）。

【図 3 2】 Gen 3 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 3 3】 承認基準表。

【図 3 4】 小児腫瘍特性。

【図 3 5】 重要な属性が Gen 2 の承認基準に合格した T I L を収穫する。

【図 3 6】 純度、記憶状態、及び分化特性評価。

【図 3 7】 活性化及び疲弊の特性評価。

【0 0 9 6】

50

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。

【0097】

配列番号 2 は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。

【0098】

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。

【0099】

配列番号 4 は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。

【0100】

配列番号 5 は、IL-2 形態である。

10

【0101】

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。

【0102】

配列番号 7 は、IL-2 形態である。

【0103】

配列番号 8 は、ムチンドメインポリペプチドである。

【0104】

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。

【0105】

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。

20

【0106】

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。

【0107】

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。

【0108】

配列番号 13 は、IL-2 配列である。

【0109】

配列番号 14 は、IL-2 ムテイン配列である。

【0110】

配列番号 15 は、IL-2 ムテイン配列である。

30

【0111】

配列番号 16 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 である。

【0112】

配列番号 17 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR2 である。

【0113】

配列番号 18 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR3 である。

【0114】

配列番号 19 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 カバットである。

【0115】

40

配列番号 20 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR2 カバットである。

【0116】

配列番号 21 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR3 カバットである。

【0117】

配列番号 22 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 クロチアである。

【0118】

配列番号 23 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR2 クロチアである。

【0119】

配列番号 24 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR3 クロチアである。

50

【0120】

配列番号25は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 _ I L - 2 I M G T である。

【0121】

配列番号26は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 I M G T である。

【0122】

配列番号27は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 I M G T である。

【0123】

配列番号28は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の V H 鎖である。

【0124】

配列番号29は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の重鎖である。

【0125】

配列番号30は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 カバットである。

【0126】

配列番号31は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 カバットである。

【0127】

配列番号32は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 カバットである。

【0128】

配列番号33は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 c h o t h i a である。

【0129】

配列番号34は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 c h o t h i a である。

【0130】

配列番号35は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 c h o t h i a である。

【0131】

配列番号36は、V L 鎖である。

【0132】

配列番号37は、軽鎖である。

【0133】

配列番号38は、軽鎖である。

【0134】

配列番号39は、軽鎖である。

【0135】

配列番号40は、ヒト4-1BBのアミノ酸配列である。

【0136】

配列番号41は、マウス4-1BBのアミノ酸配列である。

【0137】

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。

【0138】

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。

【0139】

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。

【0140】

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。

【0141】

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。

10

20

30

40

50

【0142】

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。

【0143】

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。

【0144】

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。

【0145】

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。

【0146】

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。

【0147】

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。

【0148】

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。

【0149】

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（V_H）である。

【0150】

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（V_L）である。

【0151】

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。

【0152】

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。

【0153】

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。

【0154】

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。

【0155】

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。

【0156】

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。

【0157】

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。

【0158】

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。

【0159】

10

20

30

40

50

- 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。
【0160】
- 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。
【0161】
- 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。
【0162】
- 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。
【0163】
- 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。
【0164】 10
- 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。
【0165】
- 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。
【0166】
- 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。
【0167】
- 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。
【0168】
- 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。
【0169】 20
- 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。
【0170】
- 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。
【0171】
- 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。
【0172】
- 配列番号 77 は、4-1BB リガンド (4-1BBL) アミノ酸配列である。
【0173】
- 配列番号 78 は、4-1BBL ポリペプチドの可溶性部分である。
【0174】 30
- 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。
【0175】
- 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。
【0176】
- 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。
【0177】
- 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。
【0178】 40
- 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。
【0179】
- 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。
【0180】
- 配列番号 85 は、ヒト OX40 のアミノ酸配列である。
【0181】 50

配列番号 86 は、マウス OX40 のアミノ酸配列である。

【0182】

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。

【0183】

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。

【0184】

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。

10

【0185】

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。

【0186】

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。

【0187】

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。

【0188】

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。

20

【0189】

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。

【0190】

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。

【0191】

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。

30

【0192】

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。

【0193】

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。

【0194】

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。

【0195】

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。

40

【0196】

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。

【0197】

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。

【0198】

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。

50

【 0 1 9 9 】

配列番号 1 0 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 0 0 】

配列番号 1 0 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 2 である。

【 0 2 0 1 】

配列番号 1 0 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 0 2 】

配列番号 1 0 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖である。

【 0 2 0 3 】

配列番号 1 0 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖である。

【 0 2 0 4 】

配列番号 1 0 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【 0 2 0 5 】

配列番号 1 1 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【 0 2 0 6 】

配列番号 1 1 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 0 7 】

配列番号 1 1 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 0 8 】

配列番号 1 1 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 0 9 】

配列番号 1 1 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 1 0 】

配列番号 1 1 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 2 である。

【 0 2 1 1 】

配列番号 1 1 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 1 2 】

配列番号 1 1 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【 0 2 1 3 】

配列番号 1 1 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【 0 2 1 4 】

配列番号 1 1 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 1 5 】

配列番号 1 2 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 1 6 】

10

20

30

40

50

配列番号 1 2 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 1 7 】

配列番号 1 2 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 1 8 】

配列番号 1 2 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の軽鎖 C D R 2 である。

【 0 2 1 9 】

配列番号 1 2 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の軽鎖 C D R 3 である。

10

【 0 2 2 0 】

配列番号 1 2 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖可変領域 (V _H) である。

【 0 2 2 1 】

配列番号 1 2 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖可変領域 (V _L) である。

【 0 2 2 2 】

配列番号 1 2 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖 C D R 1 である。

20

【 0 2 2 3 】

配列番号 1 2 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 2 4 】

配列番号 1 2 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 2 5 】

配列番号 1 3 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 2 6 】

配列番号 1 3 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖 C D R 2 である。

30

【 0 2 2 7 】

配列番号 1 3 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 2 8 】

配列番号 1 3 3 は、O X 4 0 リガンド (O X 4 0 L) アミノ酸配列である。

【 0 2 2 9 】

配列番号 1 3 4 は、O X 4 0 L ポリペプチドの可溶性部分である。

【 0 2 3 0 】

40

配列番号 1 3 5 は、O X 4 0 L ポリペプチドの代替可溶性部分である。

【 0 2 3 1 】

配列番号 1 3 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 0 0 8 の重鎖可変領域 (V _H) である。

【 0 2 3 2 】

配列番号 1 3 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 0 0 8 の軽鎖可変領域 (V _L) である。

【 0 2 3 3 】

配列番号 1 3 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 0 1 1 の重鎖可変領域 (V _H) である。

50

【0234】

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。

【0235】

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。

【0236】

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。

【0237】

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。

【0238】

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。

【0239】

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。

【0240】

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。

【0241】

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。

【0242】

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。

【0243】

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。

【0244】

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。

【0245】

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。

【0246】

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。

【0247】

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。

【0248】

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。

【0249】

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。

【0250】

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

10

20

30

40

50

L) である。

【0251】

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。

【0252】

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。

【0253】

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。

【0254】

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。

【0255】

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。

【0256】

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。

【0257】

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。

【0258】

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。

【0259】

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。

【0260】

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。

【0261】

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。

【0262】

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。

【0263】

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。

【0264】

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。

【0265】

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。

【0266】

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。

【0267】

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。

【0268】

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。

【0269】

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。

【0270】

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

10

20

30

40

50

る。

【 0 2 7 1 】

配列番号 1 7 6 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。

【 0 2 7 2 】

配列番号 1 7 7 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。

【 0 2 7 3 】

配列番号 1 7 8 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。

【 0 2 7 4 】

配列番号 1 7 9 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。

【 0 2 7 5 】

配列番号 1 8 0 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。

【 0 2 7 6 】

配列番号 1 8 1 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。

【 0 2 7 7 】

配列番号 1 8 2 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。

【 0 2 7 8 】

配列番号 1 8 3 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。

【 0 2 7 9 】

配列番号 1 8 4 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。

【 0 2 8 0 】

配列番号 1 8 5 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。

【 0 2 8 1 】

配列番号 1 8 6 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。

【 0 2 8 2 】

配列番号 1 8 7 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。

【 0 2 8 3 】

配列番号 1 8 8 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【 0 2 8 4 】

配列番号 1 8 9 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【 0 2 8 5 】

配列番号 1 9 0 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。

【 0 2 8 6 】

配列番号 1 9 1 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。

【 0 2 8 7 】

配列番号 1 9 2 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【 0 2 8 8 】

配列番号 1 9 3 は、PD-L1 阻害剤アベルマブの重鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【 0 2 8 9 】

10

20

30

40

50

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。
【0290】
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。
【0291】
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。
【0292】
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。
【0293】
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。
【0294】
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。
【0295】
配列番号 200 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列である。
【0296】
配列番号 201 は、PD-L1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列である。
【0297】
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。
【0298】
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。
【0299】
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。
【0300】
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。
【0301】
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。
【0302】
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。
【0303】
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。
【0304】
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。
【0305】
配列番号 210 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列である。
【0306】
配列番号 211 は、CTLA-4 阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列である。
【0307】
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。
【0308】
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

10

20

30

40

50

る。

【0309】

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

【0310】

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

【0311】

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

10

【0312】

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

【0313】

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

【0314】

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

【0315】

配列番号220は、CTL A-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。

20

【0316】

配列番号221は、CTL A-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。

【0317】

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

【0318】

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

【0319】

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

30

【0320】

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

【0321】

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

【0322】

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

40

【0323】

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

【0324】

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

【0325】

配列番号230は、CTL A-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。

【0326】

配列番号231は、CTL A-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域(V_L)アミノ

50

酸配列である。

【0327】

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。

【0328】

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。

【0329】

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。

【0330】

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。

【0331】

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。

【0332】

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。

【発明を実施するための形態】

【0333】

I. 導入

急速拡張プロトコル（REP）によってエクスピボで培養されたTILを利用した養子細胞療法は、小児癌、ブドウ膜黒色腫または中皮腫などのがんを有する患者の宿主免疫抑制後の養子細胞療法に成功している。現在の注入受容パラメータは、TILの組成（例えば、CD28、CD8、またはCD4陽性）の読み取り値、ならびにREP産物の拡張の数値倍率及び生存率に依存している。

【0334】

現在のREPプロトコルは、患者に注入されるTILの健康状態についてほとんど洞察を与えていない。T細胞は、ナイーブT細胞からエフェクターT細胞への成熟の過程で深刻な代謝シフトを受ける（Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17, 364（その全体が本明細書に明示的に組み込まれる）、特に嫌気性及び好気性代謝の考察及びマーカーについて参照）。例えば、ナイーブT細胞は、ミトコンドリア呼吸に依存してATPを産生するが、TILなどの成熟した健康なエフェクターT細胞は、高度に解糖系であり、好気性解糖に依存して増殖、移動、活性化、及び抗腫瘍効果に必要な生体エネルギー基質を提供する。

【0335】

現在のTILの製造及び治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、及び本明細書に記載される他の要因によって制限されているため、ある特定のがん（例えば、小児癌、ブドウ膜黒色腫、及び中皮腫）を有する患者を治療する可能性は厳しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際に使用するのに適したTIL製造プロセス及びかかるプロセスに基づく治療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、ある特定のがん（例えば、小児癌、ブドウ膜黒色腫、及び中皮腫）の治療に用いることができるTILの生成に使用するための短縮製造プロセスを提供することによって、この必要性を満たす。

【0336】

II. 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。

10

20

30

40

50

【0337】

本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与すること」、「同時 (simultaneous)」、「及び「同時 (concurrent)」という用語は、対象への2つ以上の医薬品有効成分（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のTIL）の投与を包含し、医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物の両方が、対象において同時に存在するようにする。同時投与には、別々の組成物での同時投与、別々の組成物での異なる時間での投与、または2つ以上の医薬品有効成分が存在する組成物での投与が含まれる。別々の組成物での同時投与及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。

【0338】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【0339】

「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイには、生きている細胞または死んでいる細胞が用いられる細胞ベースのアッセイが包含され、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも含み得る。

【0340】

「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または器官に対する治療または処置の実施を伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／または器官は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。

【0341】

「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。

【0342】

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。

【0343】

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 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 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 $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 細胞の集団を提供するために行われる。

【0344】

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 $-150^\circ\text{C} \sim -60^\circ\text{C}$ の範囲で処理及び保管されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法は、実施例を含む本明細書の他の場所にも記載されている。明確にするために、「凍結保存されたTIL」は、一次TILのソースとして使用される可能性のある凍結組織試料と区別することができる。

【0345】

本明細書における「解凍された凍結保存 T I L」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度または T I L 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、室温以上に昇るように処理された T I L の集団を意味する。

【0346】

T I L 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。T I L は、一般に、C D 4、C D 8、T C R $\alpha \beta$ 、C D 2 7、C D 2 8、C D 5 6、C C R 7、C D 4 5 R a、C D 9 5、P D - 1、及び C D 2 5 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、T I L 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。

【0347】

「凍結保存培地 (c r y o p r e s e r v a t i o n m e d i a)」または「凍結保存培地 (c r y o p r e s e r v a t i o n m e d i u m)」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 % ~ 1 0 % の D M S O を含む培地を含むことができる。例示的な培地には、C r y o S t o r C S 1 0、H y p e r t h e r m a s o l、及びそれらの組み合わせが含まれる。「C S 1 0」という用語は、S t e m c e l l T e c h n o l o g i e s または B i o l i f e S o l u t i o n s から入手した凍結保存培地を指す。C S 1 0 培地は、商品名「C r y o S t o r (登録商標) C S 1 0」と称され得る。C S 1 0 培地は、D M S O を含む無血清の動物成分を含まない培地である。

【0348】

「セントラルメモリー T 細胞」という用語は、ヒトでは C D 4 5 R 0 + であり、C C R 7 (C C R 7 高) 及び C D 6 2 L (C D 6 2 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、T C R、C D 3、C D 1 2 7 (I L - 7 R)、及び I L - 1 5 R も含まれる。セントラルメモリー T 細胞の転写因子には、B C L - 6、B C L - 6 B、M B D 2、及び B M I 1 が含まれる。セントラルメモリー T 細胞は、T C R トリガー後、エフェクター分子として I L - 2 及び C D 4 0 L を主に分泌する。セントラルメモリー T 細胞は、血液中の C D 4 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。

【0349】

「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 C D 4 5 R 0 + であるが、C C R 7 の構成的発現を失い (C C R 7 低)、C D 6 2 L 発現が不均一であるかまたは低い (C D 6 2 L 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、T C R、C D 3、C D 1 2 7 (I L - 7 R)、及び I L - 1 5 R も含まれる。セントラルメモリー T 細胞の転写因子には、B L I M P 1 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、I L - 4、及び I L - 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 C D 8 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。C D 8 + 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。

【0350】

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

【0351】

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する「断片化すること」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍組織を破碎、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。

10

20

30

40

50

【0352】

「末梢血単核細胞」及び「P B M C」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（P B M C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。

【0353】

「末梢血リンパ球」及び「P B L」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、P B Lは、ドナーからの全血またはアフエレーシス産物から分離される。いくつかの実施形態では、P B Lは、C D 3 + C D 4 5 + 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エレーシス産物から分離される。

【0354】

「抗C D 3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C D 3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エーション、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗C D 3抗体には、ムロモナブとしても知られるO K T - 3が含まれる。抗C D 3抗体には、T 3及びC D 3 εとしても知られるU H C T 1クローンも含まれる。他の抗C D 3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。

【0355】

「O K T - 3」（本明細書では「O K T 3」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C D 3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エーションを指し、市販の形態、例えば、O K T - 3（30 ng / mL、M A C S G M P C D 3 p u r e、M i l t e n y i B i o t e c h, I n c., S a n D i e g o, C A, U S A）及びムロモナブ、またはそれらのバリエーション、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）。O K T - 3を産生することができるハイブリドーマは、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nに寄託され、A T C C受託番号C R L 8 0 0 1が割り当てられている。O K T - 3を産生することができるハイブリドーマは、E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f A u t h e n t i c a t e d C e l l C u l t u r e s（E C A C C）にも寄託され、カタログ番号8 6 0 2 2 7 0 6が割り当てられている。

【表1】

表1. ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なO K T - 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 INPSRGYTN	60
	NQKFQDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA	120
	KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTITW NSGSLSSGVH TFPVAVLQSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLNQDNLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
配列番号2 ムロモナブ軽鎖	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASASSVS YMNWYQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
	FRSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFFPS	120
	SEQLTSGGAS VVCFLNFFYP KDINVWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLT	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNH NEC	213

【0356】

「I L - 2」（本明細書では「I L 2」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、及びバリエーションを含む、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15 kDa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IL-2プロドラッグベンパガルデスロイキン（NKTR-214、平均6個のリジン残基が〔（2, 7-ビス〔メチルポリ（オキシエチレン）〕カルバモイル〕-9H-フルオレン-9-イル）メトキシ〕カルボニル〕で置換されたN⁶である、配列番号4のようなペグ化ヒト組換えIL-2）を含む、本明細書に記載のIL-2のペグ化形態も包含し、Nektar Therapeutics（South San Francisco, CA, USA）から入手可能であるか、または国際特許出願公開第WO2018/132496 A1号の実施例19に記載の方法、または米国特許出願公開第US2019/0275133 A1号の実施例1に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンパガルデスロイキン（NKTR-214）及び他のペグ化IL-2分子は、米国特許出願公開第US2014/0328791 A1号及び国際特許出願公開第WO2012/065086 A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化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の製剤は、米国特許第6,706,289号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0357】

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US2020/0181220 A1号及び同第US2020/0330601 A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、単離及び精製IL-2ポリペプチドと、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、及びY107から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製IL-2ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン2（IL-2）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、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、E 6 1、E 6 2、及び E 6 8 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、E 6 2 である。いくつかの実施形態では、K 3 5、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、K 4 3、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 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、K 3 5、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、K 4 3、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 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、N 6 -アジドエトキシ-L-リジン (A z K)、N 6 -プロパルギルエトキシ-L-リジン (P r a K)、B C N-L-リジン、ノルボルネンリジン、T C O-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 (p A M F)、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-プ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-G l c N A c p-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、I L-2 複合体は、野生型 I L-2 ポリペプチドと比較して、I L-2 受容体 α (I L-2 R α) 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 I L-2 ポリペプチドと比較して、I L-2 R α に対する結合親和性の約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 9 9 % 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 I L-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、1 0 倍、3 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、2 0 0 倍、3 0 0 倍、5 0 0 倍、1 0 0 0 倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、I L-2 と I L-2 R α 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 (P E G)、ポリ(プロピレングリコール) (P P G)、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 (P O Z)、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、P E G を含む。いくつかの実施形態では、P E G は、直鎖状 P E G または分岐状 P E G 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 (P S A)、ヒアルロン酸 (H A)、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート (H S)、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン (H E S) 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

10

20

30

40

50

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、ロマンツ試薬ジチオビス(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)、エチレンジアミンビス(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ノール(6MH)、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)シクロヘキサノール-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)シクロヘキサノール-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 (s I A X)、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 (s l A X X)、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 (s I A C)、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 (s I A C X)、p-ニトロフェニル ヨードアセテート (N P I A)、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 (M P B H)、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 (M 2 C 2 H)、3- (2-ピリジルジチオ) プロピオニルヒドラジド (P D P H)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (N H s - A s A)、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-N H s - A s A)、スルホスクシンイ

10

ミジル- (4-アジドサリチルアミド) ヘキサノエート (スルホ-N H s - L C - A s A)、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 (s A s D)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (H s A B)、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-H s A B)、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 (s A N P A H)、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-s A N P A H)、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド (A N B - N O)、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 (s A N D)、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 (s A D P)、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-s A D P)、スルホスクシンイミジル 4- (p-アジドフェニル) ブチレート (スルホ-s A P B)、スルホスクシンイミジル 2- (7-アジド-4-メチルクマリナー-3-アセトアミド) エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート (s A E D)、スルホスクシンイミジル 7-アジド-4-メチルクマリナー-3-アセテート (スルホ-s A M C A)、p-ニトロフェニル ジアゾビルベート (p N P D P)、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 (P N P - D T P)、1- (p-アジドサリチルアミド) -4- (ヨードアセトアミド) ブタン (A s I B)、N- [4- (p-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 (A P D P)、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 (A B H)、4- (p-アジドサリチルアミド) ブチルアミン (A s B A)、またはp-アジドフェニル グリオキサール (A P G) を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でジペプチドリンカーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、V a l - C i t、P h e - L y s、V a l - A l a、またはV a l - L y s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 (m c)、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 (s M C C)、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-s M C C) 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 (P A B)、p-アミノベンジルオキシカルボニル (P A B C)、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、I L-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、I L-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I L-2 形態は、本明細書に記載のI L-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I L-2 形態は、米国特許

20

30

40

50

出願公開第US2020/0181220 A1号及び米国特許出願公開第US2020/0330601 A1号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、ポリエチレングリコール（PEG）を含む複合部分に共有結合したN6-アジドエトキシー-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と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzKは、配列番号5内のアミノ酸位置に関して、K35位、F42位、F44位、K43位、E62位、P65位、R38位、T41位、E68位、Y45位、V69位、またはL72位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチドは、配列番号5に対して1残基のN末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、IL-2 Rアルファ鎖会合を欠いているが、中間親和性IL-2 R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-アジドエトキシー-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と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzKは、配列番号5内のアミノ酸位置に関して、K35位、F42位、F44位、K43位、E62位、P65位、R38位、T41位、E68位、Y45位、V69位、またはL72位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、ポリエチレングリコール（PEG）を含む複合部分に共有結合したN6-アジドエトキシー-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と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzKは、配列番号5内のアミノ酸位置に関して、K35位、F42位、F44位、K43位、E62位、P65位、R38位、T41位、E68位、Y45位、V69位、またはL72位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、ポリエチレングリコール（PEG）を含む複合部分に共有結合したN6-アジドエトキシー-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と少なくとも98%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzKは、配列番号5内のアミノ酸位置に関して、K35位、F42位、F44位、K43位、E62位、P65位、R38位、T41位、E68位、Y45位、V69位、またはL72位でアミノ酸を置換する。

10

20

30

40

50

【0358】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、ALKS-4230（配列番号6）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Alkermes, Inc. から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（⁶⁰GG⁶¹）を介してヒトインターロイキン2断片（62-132）と融合し、ペプチジルリンカー（¹³³GS¹³⁸）を介してヒトインターロイキン2受容体α鎖断片（139-303）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン2断片（1-59）、バリエーション（Cys¹²⁵>Ser⁵¹）；G²ペプチドリリンカー（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、GS₃Sペプチドリリンカー（133-138）を介してヒトインターロイキン2受容体α鎖（IL2Rサブユニットアルファ、IL2Rα、IL2RA）（1-165）-ペプチド（139-303）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン2（IL-2）（75-133）-ペプチド[Cys¹²⁵（51）>Ser]-変異体（1-59）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号6に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：31-116、141-285、184-242、269-301、166-197、または166-199、168-199または168-197（配列番号6の番号

付けを使用する)、及び以下の位置でのグリコシル化部位:配列番号6の番号付けを使用する、N187、N206、T212。ネムバルイキンアルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のIL-2は、米国特許出願公開第2021/0038684 A1号及び米国特許第10,183,979号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号6と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号6で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号7のアミノ酸24~452、またはそのバリエーション、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、またはそのバリエーション、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-1R α 、またはIL-1R α と少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有し、IL-1R α 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。

10

20

30

40

50

【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 ATCLKHLQCL EELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSTTKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号 5 IL-2 形態	APTSSSTKKT QLQLEHLLLDL 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 VEFNLRWITF SQSIISTLTG GSSSTTKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE LKPLEEVLNL AQSGGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNNTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG HCREPPPPWEN EATERIYHFV VGQMVVYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQFQLI CTG	60 120 180 240 300 303
配列番号 7 IL-2 形態	MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGETR LQLEAVNITD LSENRRQDKR FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQEDESGSGG ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPFCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP 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 IIKTLNLSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号 10 組換えヒト IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARLKRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLDQEI KTCWNKILMGT KEH	60 120 153
配列番号 11 組換えヒト IL-15 (rhIL-15)	MNWNVNISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVT MKCFLLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNKEF LQSFVHVIVM FINTS	60 115
配列番号 12 組換えヒト IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVS I KKLKRKPPST NAGRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【0359】

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 2020/0270334 A1 号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域 HCDR1、HCDR2、HCDR3 を含む、重鎖可変領域 (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 C

R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。

【0360】

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。

【0361】

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、IL-2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。

【0362】

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。

【0363】

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US2020/0270334 A1号の表1のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0364】

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 2020/0270334 A 1 号の IgG・IL2F71A・H1 もしくは IgG・IL2R67A・H1、またはそのバリエーション、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、またはパルビズマブの 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。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : 例示的なパリビズマブ抗体ー I L - 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	MYRMQLLSICI 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	DIWDDKKDY NPSLKS 16	
配列番号18 HCDR3	SMITNWFYDV 10	
配列番号19 HCDR1_IL-2	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE	60
カバット	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR	120
配列番号20 HCDR2カバット	WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141	
	DIWDDKKDY NPSLKS 16	
配列番号21 HCDR3カバット	SMITNWFYDV 10	
配列番号22 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL	60
クロチア	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE	120
配列番号23 HCDR2クロチア	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142	
	WWDDK	5
配列番号24 HCDR3クロチア	SMITNWFYDV 10	
配列番号25 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL	60
IMGT	QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE	120
配列番号26 HCDR2 IMGT	FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143	
	IWWDDKK	7
配列番号27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWFY DV 12	
配列番号28 V _H	QVTLRESGPA LVKPTQTTLT TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY	60
	KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV	120
	IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL	180
	EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWFY	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 EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC	180
	ARSMITNWFY DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV	240

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	TVSWNSGALT	SGVHTFPFPAVL	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	
	PPVLDSGGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	PGK	533	
	KAQLSVGYMH	10						
配列番号 30 LCDR1 カバット								
配列番号 31 LCDR2 カバット	DTSKLAS						7	
配列番号 32 LCDR3 カバット	FQGSQYPT 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	10
配列番号 35 LCDR3 クロチア	GSGYPF						6	
配列番号 36 V _L	DIQMTQSPST	LSASVGDRVT	ITCKAQLSVG	YMHYQQKPG	KAPKLLIYDT	SKLASGVPSR	60	
	FSGSGSGTEF	TLTISSLQPD	DFATYYCFQG	SGYPFTFGGG	TKLEIK 106			
配列番号 37 軽鎖	DIQMTQSPST	LSASVGDRVT	ITCKAQLSVG	YMHYQQKPG	KAPKLLIYDT	SKLASGVPSR	60	
	FSGSGSGTEF	TLTISSLQPD	DFATYYCFQG	SGYPFTFGGG	TKLEIKRTVA	APSVFIFFPS	120	
	DEQLKSGTAS	VVCLLNNFYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLT	180	
	SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR	GEC				
	213							
配列番号 38 軽鎖	QVTLRESGPA	LVKPTQTLTL	TCTFSGFSLA	PTSSTSKTKQ	LQLEHLLDL	QMILNGINNY	60	
	KNPKLTRMLT	AKFYMPKKAT	ELKHLQCLEE	ELKPLEEVLN	LAQSKNFHLR	PRDLISNINV	120	
	IVLELKGSET	TFMCEYADET	ATIVEFLNRW	ITFCQSIIST	LTSTSGMSVG	WIRQPPGKAL	180	
	EWLADIWDD	KKDYNPSLKS	RLTISKDTSK	NQVVLKVTNM	DPADTATYYC	ARSMITNWFY	240	
	DVWGAGTTVT	VSSASTKGPS	VFPLAPSSKS	TSGGTAALGC	LVKDYFPEPV	TVSWNSGALT	300	
	SGVHTFPFPAVL	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	PPVLDSGGSF	540	
	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	PGK		583	
配列番号 39 軽鎖	DIQMTQSPST	LSASVGDRVT	ITCKAQLSVG	YMHYQQKPG	KAPKLLIYDT	SKLASGVPSR	60	
	FSGSGSGTEF	TLTISSLQPD	DFATYYCFQG	SGYPFTFGGG	TKLEIKRTVA	APSVFIFFPS	120	
	DEQLKSGTAS	VVCLLNNFYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSTLT	180	
	SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR	GEC				
	213							

【0365】

「IL-4」（本明細書では「IL4」とも称される）という用語は、インターロイキン4として知られるサイトカインを指し、これは、Th2 T細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって産生される。IL-4は、ナイーブヘルパーT細胞（Th0細胞）からTh2 T細胞への分化を調節する。Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。IL-4によって活性化されると、Th2 T細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のIL-4を産生する。IL-4は、B細胞増殖及びクラスII MHC発現も刺激し、B細胞からのIgE及びIgG₁発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-4は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号CYT-211）及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA（ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号Gibco CTP0043）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-4のアミノ酸配列を表2に示す（配列番号9）。

【0366】

「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)。

【0367】

「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、及びバリエーションを含む、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、12.8 kDa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)。

【0368】

「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、及びバリエーションを含む、IL-21のすべての形態を含む。IL-21は、例えば、Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-21は、主にナチュラルキラーT細胞及び活性化ヒトCD4⁺T細胞によって産生される。組換えヒトIL-21は、15.4 kDa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12)。

【0369】

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

投薬量及び治療レジーム (regime) は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜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。

【0370】

「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。

10

【0371】

「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。

【0372】

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

20

【0373】

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 60 mg/kg/day 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 $25 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ 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 $720,000 \text{ IU/kg}$ でIL-2の静脈内注入を受ける。

30

【0374】

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。

40

【0375】

「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

50

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られて投与されるか、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。

【0376】

「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療という観点において治療的であり得る。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、(a) 疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象に疾患が生じるのを予防すること、(b) 疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または1つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

10

【0377】

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

20

【0378】

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。

30

40

【0379】

本明細書で使用される場合、「バリエント」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。バリエントは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのア

50

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。バリエーションは、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。バリエーションという用語は、ペグ化抗体またはタンパク質も含む。

【0380】

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。

10

【0381】

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、TCR $\alpha\beta$ 、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50 pg/mLを超える、約100 pg/mLを超える、約150 pg/mLを超える、または約200 pg/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（IFN γ ）放出が、約50 pg/mLを超える、約100 pg/mLを超える、約150 pg/mLを超える、または約200 pg/mLを超える、約300 pg/mLを超える、約400 pg/mLを超える、約500 pg/mLを超える、約600 pg/mLを超える、約700 pg/mLを超える、約800 pg/mLを超える、約900 pg/mLを超える、約1000 pg/mLを超える場合、TILは強力であるとみなされ得る。

20

30

【0382】

「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。

【0383】

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

40

【0384】

「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

50

、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。

【0385】

「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。

【0386】

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（複数可）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。

【0387】

「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、 CL 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（ $C1q$ ）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。

【0388】

「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。

10

【0389】

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

20

【0390】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) VL、VH、CL、及びCH1ドメインからなる一価断片である、Fab断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された2つのFab断片を含む二価断片である、F(ab')2断片、(iii) VH及びCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVL及びVHドメインからなるFv断片、(v) VHまたはVLドメインからなり得るドメイン抗体(dAb)断片(Ward, et al., Nature, 1989, 341, 544-546)、ならびに(vi) 単離した相補性決定領域(CDR)が含まれる。Fv断片の2つのドメイン、VL及びVHは、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え方法を使用して、VL及びVH領域が対合して、一本鎖Fv(scFv)として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Bird, et al., Science 1988, 242, 423-426、及びHuston, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 5879-5883)を参照されたい。かかるscFv抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、scFvタンパク質ドメインは、VH部分及びVL部分を含む。scFv分子は、VLドメインがscFv分子のN末端部分である場合、VL-L-VH、またはVHドメインがscFv分

30

40

50

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。 $s c F v$ 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。

【0391】

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。

【0392】

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

【0393】

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。

【0394】

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。

【0395】

「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。

【0396】

「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

10

20

30

40

50

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。

【0397】

「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に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バリエーションを用いるように修飾され得る。Fcバリエーションは、例えば、国際特許出願公開第WO 1988/07089 A1号、同第WO 1996/14339 A1号、同第WO 1998/05787 A1号、同第WO 1998/23289 A1号、同第WO 1999/51642 A1号、同第WO 99/58572 A1号、同第WO 2000/09560 A2号、同第WO 2000/32767 A1号、同第WO 2000/42072 A2号、同第WO 2002/44215 A2号、同第WO 2002/060919 A2号、同第WO 2003/074569 A2号、同第WO 2004/016750 A2号、同第WO 2004/029207 A2号、同第WO 2004/035752 A2号、同第WO 2004/063351 A2号、同第WO 2004/074455 A2号、同第WO 2004/099249 A2号、同第WO 2005/040217 A2号、同第WO 2005/070963 A1号、同第WO 2005/077981 A2号、同第WO 2005/092925 A2号、同第WO 2005/123780 A2号、同第WO 2006/019447 A1号、同第WO 2006/047350 A2号、及び同第WO 2006/085967 A2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。

【0398】

「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。

【0399】

10

20

30

40

50

「二重特異性抗体 (d i a b o d y)」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EP 404, 097号、国際特許公開第WO 93/11161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。

【0400】

「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ない、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第5, 714, 350号及び同第6, 350, 861号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める可能性がある。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産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ms 704、Ms 705、及びMs 709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Ms 704、Ms 705、及びMs 709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。Ms 704、Ms 705、及びMs 709 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EP 1, 176, 195号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ1, 6結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662) についても説明している。国際特許公開第WO 03/035835号は、フコースをAsn (297) 結合型炭水化物に付着させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリエーションCHO細胞株、Lec13細胞について説明している (Shields, et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 26733-26740も参照)。国際特許公開第WO 99/54342号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ (例えば、ベータ (1, 4) -N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII)) を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性GlcNac構造の増加を示し、抗体のADCC活性の増加をもたらす、細胞株について記載している (Umana, et al., Nat. Biotech. 1999, 17, 176-180も参照)。代替的に、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切断でき得る。例えば、フコシダーゼアルファ-L-フコシダーゼは、Tarentino, et al., Biochem. 1975, 14, 5516-5523に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

10

20

30

40

50

【0401】

「ペグ化」は、1つ以上のPEG基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（PEG）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C₁～C₁₀）アルコキシーもしくはアリーロ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。

【0402】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照バイオ製品と非常に類似しており、製品の安全性、純度、及び効力に関してバイオ製品と参照製品との間に臨床的に意味のある差異がない、バイオ製品を意味する。さらに、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。バイオ製品またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照IL-2タンパク質がアルデスロイキン（PROLEUKIN）である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁（EMA）によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正されたRegulation（EC）No 726/2004の第6条及びDirective 2001/83/ECの第10（4）条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、Regulation（EC）No 726/2004の第6条及びDirective 2001/83/ECの第10（4）条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。すでに認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称されることがある。バイオシミラーとみなされる製品に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関するCHMPガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む製品固有のガイドラインは、EMAによって製品毎に提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、EMAによって認可された参

10

20

30

40

50

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（E E A 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、E E A 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、製剤、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（PK）及び／または薬力学的（PD）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、EMAなどの規制当局によって類似のバイオ製品としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

10

20

30

40

50

【0403】

III. Gen 2 TIL 製造プロセス

これらの特徴のうちのいくつかを含む、Gen 2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。Gen 2の実施形態を図2に示す。

【0404】

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

【0405】

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。

【0406】

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。

【0407】

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。

【0408】

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。

【0409】

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。

【0410】

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8mm³の薄片に断片化され、約2～3mm³が特に有用である。いくつかの実施形態では、TILは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640緩衝液、2mMグルタミン酸、10mcg/mLゲンタマイシン、30単位/mL DNase、及び1.0mg/mLコラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ1分間機械的に解離させ、続いて5%CO₂中37℃で30分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、FICOLL分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第2012/0244133A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、TILを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【0411】

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、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パpain、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。

【0412】

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。

【0413】

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、10 mL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、2892 PZ 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、5 mL～15 mL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100 PZ U/mL～約400 PZ U/mLの範囲、例えば、約100 PZ U/mL～約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL～約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL～約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL～約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL、または約400 PZ U/mLである。

10

【0414】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、1 mL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、175 DMC 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100 DMC/mL～約400 DMC/mLの範囲、例えば、約100 DMC/mL～約400 DMC/mL、約100 DMC/mL～約350 DMC/mL、約100 DMC/mL～約300 DMC/mL、約150 DMC/mL～約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL、または約400 DMC/mLである。

20

30

【0415】

いくつかの実施形態では、DNase Iは、1 mL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、4 KU/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1 KU/mL～10 KU/mL、例えば、約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6 KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL、または約10 KU/mLの範囲である。

【0416】

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。

40

【0417】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約4.7 mLの滅菌HBSS中に約10.2 uLの中性プロテアーゼ（0.36 DMC U/mL）、21.3 μLのコラゲナーゼ（1.2 PZ/mL）及び250 uLのDNase I（200 U/mL）を含む。

【0418】

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、

50

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%CO₂で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5%CO₂で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、37℃、5%CO₂で一定の回転を伴って一晩消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わせられて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

10

【0419】

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。

【0420】

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。

【0421】

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。

20

【0422】

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。

【0423】

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。

【0424】

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。

30

【0425】

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。

【0426】

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。

【0427】

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27mm³の体積を有す

40

50

る。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1300 mm^3 ～約 1500 mm^3 の総体積を伴う約 30 ～約 60 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1350 mm^3 の総体積を伴う約 50 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1 グラム ～約 1.5 グラムの総質量を伴う約 50 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 4 個の断片を含む。

【0428】

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 1 mm^3 ～ 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 ～ 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 2 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 3 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 4 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 5 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 6 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 7 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 9 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $1\sim 4\text{ mm}\times 1\sim 4\text{ mm}\times 1\sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $2\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $3\text{ mm}\times 3\text{ mm}\times 3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $4\text{ mm}\times 4\text{ mm}\times 4\text{ mm}$ である。

【0429】

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。

【0430】

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。

【0431】

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。

【0432】

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。

【0433】

1. 胸水T細胞及びTIL

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのT細胞またはTILの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのTILの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第2014/0295426号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0434】

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脾嚢胞液を含む、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。

【0435】

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。

【0436】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：10である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：9である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：8である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：5である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：2である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：1である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にCellSaveチューブ内に入れられ、生存TILの減少を回避し、これは、4℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、24～48時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、4℃で、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

10

20

30

40

50

【0437】

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。

【0438】

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する胸腔内液試料は、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4 μ Mであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、5 μ M以上であり得、他の実施形態では、6、7、8、9、または10 μ Mのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたTILを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたTILを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで 사용할 ことができる。

【0439】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のRBCを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、BD Pharm Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）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 Dickinson）、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Stablyse（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。

【0440】

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

【0441】

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

10

20

30

40

50

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

【0442】

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

【0443】

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、6000 IU/mLのIL-2を有する不活性化ヒトAB血清を含む培地中2 mLのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に3～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、7～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約11日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。

【0444】

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

されるプロセスを含む)を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたTILは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。

【0445】

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

【0446】

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 10 cm^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 $10 \sim 40 \times 10^6$ 個の生きた腫瘍消化細胞または5~30個の腫瘍断片を装填した。G-Rex10及び24ウェルプレートの両方を、5%CO₂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、培地の半分の2~3日毎に交換した。

【0447】

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。

【0448】

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)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地(α MEM)、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。

【0449】

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

10

20

30

40

50

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。

【0450】

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)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、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。

10

【0451】

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。

20

【0452】

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

30

40

【0453】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。CTS (商標) Optmizer (商標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion

50

50

ement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約 2 mM のグルタミンが補充されており、約 6000 IU/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、55 μ M である。

【0454】

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 0.1 mM ~ 約 10 mM、0.5 mM ~ 約 9 mM、1 mM ~ 約 8 mM、2 mM ~ 約 7 mM、3 mM ~ 約 6 mM、または 4 mM ~ 約 5 mM 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 2 mM 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。

【0455】

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 5 mM ~ 約 150 mM、10 mM ~ 約 140 mM、15 mM ~ 約 130 mM、20 mM ~ 約 120 mM、25 mM ~ 約 110 mM、30 mM ~ 約 100 mM、35 mM ~ 約 95 mM、40 mM ~ 約 90 mM、45 mM ~ 約 85 mM、50 mM ~ 約 80 mM、55 mM ~ 約 75 mM、60 mM ~ 約 70 mM、または約 65 mM 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 55 mM 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、55 μ M である。

【0456】

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)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、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。

【0457】

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 ~ 200 mg / L の範囲であり、L - ヒスチジンの濃度は、約 5 ~ 250 mg / L であり、L - イソロイシンの濃度は、約 5 ~ 300 mg / L であり、L - メチオニンの濃度は、約 5 ~ 200 mg / L であり、L - フェニルアラニンの濃度は、約 5 ~ 400 mg / L であり、L - プロリンの濃度は、約 1 ~ 1000 mg / L であり、L - ヒドロキシプロリンの濃度は、約 1 ~ 45 mg / L であり、L - セリンの濃度は、約 1 ~ 250 mg / L であり、L - スレオニンの濃度は、約 10 ~ 500 mg / L であり、L - トリプトファンの濃度は、約 2 ~ 110 mg / L であり、L - チロシンの濃度は、約 3 ~ 175 mg / L であり、L - バリンの濃度は、約 5 ~ 500 mg / L であり、チアミンの濃度は、約 1 ~ 20 mg / L であり、還元型グルタチオンの濃度は、約 1 ~ 20 mg / L であり、L - アスコルビン酸 - 2 - リン酸塩の濃度は、約 1 ~ 200 mg / L であり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約 1 ~ 50 mg / L であり、インスリンの濃度は、約 1 ~ 100 mg / L であり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約 0.000001 ~ 0.0001 mg / L であり、アルブミン（例えば、AlbuMAX（登録商標）I）の濃度は、約 5000 ~ 50,000 mg / L である。

10

【0458】

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

20

30

40

50

【表 4】

表 4：非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメント中の 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

【0459】

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。

【0460】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., ClinTransl. Immunology, 4(1)2015 (doi:10.1038/cti.2014.31)に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMIまたはCTS（商標）Optmizer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。

【0461】

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。

【0462】

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またはそのバリエーションを含む。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 $20 \sim 30 \times 10^6$ 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 20×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1mgバイアルにつき 25×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1mgバイアルにつき 30×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $4 \sim 8 \times 10^6$ 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、 $5 \sim 7 \times 10^6$ 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、 6×10^6 IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、実施例5に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約10,000IU/mLのIL-2、約9,000IU/mLのIL-2、約8,000IU/mLのIL-2、約7,000IU/mLのIL-2、約6000IU/mLのIL-2、または約5,000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約9,000IU/mLのIL-2～約5,000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約8,000IU/mLのIL-2～約6,000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約7,000IU/mLのIL-2～約6,000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約6,000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1000IU/mL、約1500IU/mL、約2000IU/mL、約2500IU/mL、約3000IU/mL、約3500IU/mL、約4000IU/mL、約4500IU/mL、約5000IU/mL、約5500IU/mL、約6000IU/mL、約6500IU/mL、約7000IU/mL、約7500IU/mL、または約8000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1000～2000IU/mL、2000～3000IU/mL、3000～4000IU/mL、4000～5000IU/mL、5000～6000IU/mL、6000～7000IU/mL、7000～8000IU/mL、または約8000IU/mLのIL-2を含む。

【0463】

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を含む。

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。

【0464】

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。

【0465】

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の間、20ng/mL～30ng/mL、30ng/mL～40ng/mL、40ng/mL～50ng/mL、及び50ng/mL～100ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含まない。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。例えば、表1を参照されたい。

【0466】

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、バリエーション、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。

【0467】

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3000 IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3を約30 ng/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。

【0468】

いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、それは、CM1（培養培地1）と称される。いくつかの実施形態では、CMは、10%ヒトAB血清、25mM HEPES、及び10mg/mLゲンタマイシンを補充した、GlutaMAXを含むRPMI1640からなる。培養物が40mL容量及び10cm²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10~40×10⁶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%CO₂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、培地の半分以上を2~3日毎に交換した。いくつかの実施形態では、CMは、実施例に記載されるCM1であり、実施例1を参照されたい。いくつかの実施形態では、第1の拡張は、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地は、IL-2を含む。

【0469】

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

【0470】

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。

【0471】

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

【0472】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第1の拡張（REP前と称されるプロセスを含む、例えば、図1によるステップB）プロセスは、3～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップBの第1の拡張は、7～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップBの第1の拡張は、10～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、第1の拡張は、11日に短縮される。

【0473】

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。

【0474】

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。

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及び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、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US201

10

20

30

40

50

9 / 0 3 0 7 7 9 6 A 1 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。

【0475】

C. ステップ C：第 1 の拡張から第 2 の拡張へと移行

いくつかの事例では、例えば、図 1 に示されるステップ B から取得された T I L 集団を含む、第 1 の拡張から取得されたバルク T I L 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、第 2 の T I L 集団と称される第 1 の拡張から取得された T I L 集団は、以下で考察されるように、第 2 の拡張（R E P 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 T I L が治療に使用される場合、第 1 の T I L 集団（バルク T I L 集団と称されることもある）または第 2 の T I L 集団（いくつかの実施形態では、R E P T I L 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。

10

【0476】

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 T I L は、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、第 1 の拡張から（例えば、図 1 に示されるステップ B から）取得された T I L は保管されず、第 2 の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、第 1 の拡張から取得された T I L 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。

20

【0477】

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 T I L 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

30

40

50

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

10

【0478】

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

【0479】

20

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-R E X-10またはG-R E X-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。

【0480】

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（R E P）と称される拡張プロセス、ならびに図1のステップDに示されるプロセスを含み得る。第2の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗CD3抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。

30

【0481】

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（R E P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。

40

50

【0482】

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30 ng/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UHT-1（BioLegend, San Diego, CA, USAから市販）を含み得る。TILは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第2の拡張中に1つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでTILのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原A2（HLA-A2）結合ペプチド、例えば、0.3 μM MART-1:26-35（27L）またはgp100:209-217（210M）から、任意選択で300 IU/mLのIL-2またはIL-15などのT細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼがん抗原、MAGE-A3、SSX-2、及びVEGFR2、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。TILは、HLA-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。あるいは、TILは、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射されたHLA-A2 + 同種異系リンパ球及びIL-2でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第2の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射されたHLA-A2 + 同種異系リンパ球及びIL-2を用いて起こる。

【0483】

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3000 IU/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1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL、または約8000 IU/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、1000~2000 IU/mL、2000~3000 IU/mL、3000~4000 IU/mL、4000~5000 IU/mL、5000~6000 IU/mL、6000~7000 IU/mL、7000~8000 IU/mL、または8000 IU/mLのIL-2を含む。

【0484】

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30 ng/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0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 μg/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、0.1 ng/mL~1 ng/mL、1 ng/mL~5 ng/mL、5 ng/mL~10 ng/mL、10 ng/mL~20 ng/mLの間、20 ng/mL~30 ng/mL、30 ng/mL~40 ng/mL、40 ng/mL~50 ng/mL、及び50 ng/mL~100 ng/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。

【0485】

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、バリエーション、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、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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、 $20 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

10

【0486】

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 $3000 \text{ IU}/\text{mL}$ の初期濃度で、及びOKT-3を約 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ 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。

【0487】

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

20

【0488】

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

30

【0489】

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

40

【0490】

50

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/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20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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5 IU/mLのIL-21～約1 IU/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2 IU/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1 IU/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0.5 IU/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1 IU/mLのIL-21を含む。

10

【0491】

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。

20

【0492】

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150 mL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、30 mg/mLのOKT3抗CD3抗体、及び3000 IU/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。

30

【0493】

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。

【0494】

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、150 mL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、3000 IU/mLのIL-2及び30 ng/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フラスコは、5% CO₂中37℃でインキュベートされ得る。培地の半分が、3000 IU/mLのIL-2を含む50/50培地を使用して5日目に交換され得る。いくつかの実施形態では、7日目に、2つのT-175

40

50

フラスコからの細胞が3 Lバッグ内で組み合わせられ得、5 %ヒトAB血清及び3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む3 0 0 m L の A I M V が、3 0 0 m L の T I L 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、 $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞 / m L の間の細胞数を維持した。

【0495】

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、100 cmのガス透過性シリコン底部（G-R E X - 1 0 0、Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USAから市販されている）を有する500 mL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 T I L は、5 %ヒトAB血清、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2、及び30 ng / m L の抗CD3（O K T 3）を補充した400 mLの50 / 50培地中、P B M Cで培養され得る。G-R E X - 1 0 0 フラスコを、5 % C O ₂ 中37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250 mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500 rpm（491 × g）で10分間遠心分離される。T I L ペレットが、5 %ヒトAB血清、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む150 mLの新鮮な培地で再懸濁され、元のG-R E X - 1 0 0 フラスコに戻し追加され得る。T I L がG-R E X - 1 0 0 フラスコ内で連続的に拡張される場合、7日目に、各G-R E X - 1 0 0 内のT I L が、各フラスコに存在する300 mLの培地に懸濁され得、細胞懸濁液が3つの100 mLアリコートに分割され得、それを使用して、3つのG-R E X - 1 0 0 フラスコに播種することができる。その後、5 %ヒトAB血清及び3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む150 mLのA I M - V が各フラスコに添加され得る。G-R E X - 1 0 0 フラスコが5 % C O ₂ 中37℃でインキュベートされ得、4日後に、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む150 mLのA I M - V が、各G-R E X - 1 0 0 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。

【0496】

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T I L が150 mL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、30 mg / m L のO K T 3 抗CD3抗体、及び3 0 0 0 I U / m L の I L - 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-R E X フラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【0497】

いくつかの実施形態では、第2の拡張（REPと称される増殖を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにT I L 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 / 0010058 A 1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T I L の選択に使用され得る。

【0498】

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T I L の試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、T I L 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。

【0499】

いくつかの実施形態では、T I L の第2の拡張（REPと称される拡張を含む）は、以

前に記載されているT-175フラスコ及びガス透過性バッグ (Tran, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751及びDudley, et al., 2003, J Immunother., 26:332-342) またはガス透過性G-REXフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、ガス透過性G-REXフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、T-175フラスコ内で行われ、約 1×10^6 個のTILが約150mLの培地に懸濁され、これが各T-175フラスコに添加される。TILは、「フィーダー」細胞として1対100の比で放射線照射された(50Gy)同種異系PBMCと培養され、細胞が、3000IU/mLのIL-2及び30ng/mLの抗CD3を補充した、1:1のCMとAIM-V培地との混合物(50/50培地)中で培養された。T-175フラスコを、5%CO₂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。

10

【0500】

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、100cm²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%CO₂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得る。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%CO₂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。

20

30

【0501】

Tリンパ球及びBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V(可変)、D(多様性)、J(接合)、及びC(一定)は、免疫グロブリン及びT細胞受容体(TCR)の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるTILを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第2の拡張において取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び/またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及

40

50

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、TCR $\alpha\beta$ (すなわち、TCR α/β)の発現が増加する。

【0502】

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の細胞培養培地と称されることもある)は、以下でさらに詳細に考察されるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞(APC)を含む。

【0503】

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。

【0504】

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(α MEM)、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。

【0505】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS(商標)Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Ge⁴⁺、Se⁴⁺、Br、T、Mn²⁺、P、Si⁴⁺、V⁵⁺、Mo⁶⁺、Ni²⁺、Rb⁺、Sn²⁺、及びZr⁴⁺を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0506】

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、Lymph

10

20

30

40

50

h o O N E (商 標) T - C e l l E x p a n s i o n X e n o - F r e e M e d i u m、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M)、最小必須培地 (M E M)、イーグル基礎培地 (B M E)、R P M I 1 6 4 0、F - 1 0、F - 1 2、最小必須培地 (α M E M)、グラスゴー最小必須培地 (G - M E M)、R P M I 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。

【 0 5 0 7 】

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 (v o l %) 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 %、1 0 体積 %、1 1 体積 %、1 2 体積 %、1 3 体積 %、1 4 体積 %、1 5 体積 %、1 6 体積 %、1 7 体積 %、1 8 体積 %、1 9 体積 %、または 2 0 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 1 0 % である。

10

【 0 5 0 8 】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) である。C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M は、1 L の C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n B a s a l M e d i u m と、2 6 m L の C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - C e l l E x p a n s i o n S u p p l e m e n t 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、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M には、約 3 % の C T S (商 標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t (S R) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) が補充されている。いくつかの実施形態では、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M には、5 5 m M の 2 - メルカプトエタノールとともに、約 3 % の C T S (商 標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t (S R) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) が補充されている。いくつかの実施形態では、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M には、約 3 % の C T S (商 標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t (S R) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) 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、5 5 μ M である。

20

30

【 0 5 0 9 】

いくつかの実施形態では、合成培地は、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) である。C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M は、1 L の C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n B a s a l M e d i u m と、2 6 m L の C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - C e l l E x p a n s i o n S u p p l e m e n t 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、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M には、5 5 m M の 2 - メルカプトエタノールとともに、約 3 % の C T S (商 標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t (S R) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) が補充されている。いくつかの実施形態では、C T S (商 標) O p T m i z e r (商 標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M には、約 3 % の C T S (商 標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t (S R) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c)、5 5 m M の 2 - メルカプトエタノール、及び 2

40

50

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

【0510】

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

10

20

30

40

50

の濃度でグルタミン（すなわち、G l u t a M A X（登録商標））が補充されている。

【0511】

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5 mM～約150 mM、10 mM～約140 mM、15 mM～約130 mM、20 mM～約120 mM、25 mM～約110 mM、30 mM～約100 mM、35 mM～約95 mM、40 mM～約90 mM、45 mM～約85 mM、50 mM～約80 mM、55 mM～約75 mM、60 mM～約70 mM、または約65 mM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55 mM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、55 μ Mである。

10

【0512】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際PCT公開第WO／1998／030679号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Ge⁴⁺、Se⁴⁺、Br、T、Mn²⁺、P、Si⁴⁺、V⁵⁺、Mo⁶⁺、Ni²⁺、Rb⁺、Sn²⁺、及びZr⁴⁺を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、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。

20

30

【0513】

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5～200 mg／Lの範囲であり、L-ヒスチジンの濃度は、約5～250 mg／Lであり、L-イソロイシンの濃度は、約5～300 mg／Lであり、L-メチオニンの濃度は、約5～200 mg／Lであり、L-フェニルアラニンの濃度は、約5～400 mg／Lであり、L-プロリンの濃度は、約1～1000 mg／Lであり、L-ヒドロキシプロリンの濃度は、約1～45 mg／Lであり、L-セリンの濃度は、約1～250 mg／Lであり、L-スレオニンの濃度は、約10～500 mg／Lであり、L-トリプトファンの濃度は、約2～110 mg／Lであり、L-チロシンの濃度は、約3～175 mg／Lであり、L-バリンの濃度は、約5～500 mg／Lであり、チアミンの濃度は、約1～20 mg／Lであり、還元型グルタチオンの濃度は、約1～20 mg／Lであり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約1～200 mg／Lであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約1～5

40

50

0 mg / L であり、インスリンの濃度は、約 1 ~ 1 0 0 mg / L であり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約 0 . 0 0 0 0 0 1 ~ 0 . 0 0 0 1 mg / L であり、アルブミン（例えば、A l b u M A X（登録商標）I）の濃度は、約 5 0 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0 mg / L である。

【0514】

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方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方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方にリストされたタイプ及び濃度の非微量元素部分成分を含む。

10

【0515】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 2 6 0 ~ 3 5 0 m O s m o l である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 2 8 0 ~ 3 1 0 m O s m o l である。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約 3 . 7 g / L、または約 2 . 2 g / 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 2 m M）、1 つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（N E A A、最終濃度約 1 0 0 μ M）、2 - メルカプトエタノール（最終濃度約 1 0 0 μ M）がさらに補充されていてもよい。

20

【0516】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin Transl. Immunology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または CTS（商標）Optmizer 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。

30

【0517】

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、CAS 60 - 24 - 2）を欠いている。

【0518】

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。

40

【0519】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a) TIL を、第1の容器、例えば、G - REX - 100 MCS 容器内での小規模培養で約 3 ~ 7 日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養での TIL を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G - REX - 500 - MCS 容器に移し、小規模培養由来の TIL を、第2の容器内でのより大規模な培養で約 4 ~ 7 日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。

【0520】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a) TIL を、第1の容器、例えば、G - REX 100 MCS 容器内での第1

50

の小規模培養で約3～7日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、(b)第1の小規模培養由来のTILを、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。

【0521】

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。

【0522】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a)TILを、第1の容器、例えば、G-R E X 1 0 0 M C S容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、(b)小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R E X - 5 0 0 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。

【0523】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a)TILを、第1の容器、例えば、G-R E X - 1 0 0 M C S容器内での小規模培養で約5日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、(b)小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X - 5 0 0 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約6日間培養される。

【0524】

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。

【0525】

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。

【0526】

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の亜集団と一緒にプールして、治療有効量のTILを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、TILの各亜集団は、治療有効量のTILを含む。

【0527】

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。

【0528】

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。

【0529】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張は、分裂後約7～11日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張は、分裂後約5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日間、さらに行われる。

【0530】

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。

【0531】

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。

【0532】

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。

【0533】

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。

【0534】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【0535】

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

10

20

30

40

50

L 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 T I L に供給される。いくつかの実施形態では、X u r i W 2 5 などの自動細胞拡張システムは、急速な膨張及び供給のために使用される。

【0536】

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 R E P と称されるものを含む）は、R E P T I L 拡張中及び／または第 2 の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（P B M C）である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

10

【0537】

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

【0538】

いくつかの実施形態では、14 日目の生細胞の総数が、R E P 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少ない場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。

20

【0539】

いくつかの実施形態では、7 日目及び 14 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された生細胞の総数が、R E P 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、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 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、P B M C は、30 ng / mL の O K T 3 抗体及び 3000 I U / mL の I L - 2 の存在下で培養される。

【0540】

いくつかの実施形態では、7 日目及び 14 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された生細胞の総数が、R E P 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、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 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、P B M C は、5 ~ 60 ng / mL の O K T 3 抗体及び 1000 ~ 6000 I U / mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、10 ~ 50 ng / mL の O K T 3 抗体及び 2000 ~ 5000 I U / mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、20 ~ 40 ng / mL の O K T 3 抗体及び 2000 ~ 4000 I U / mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、25 ~ 35 ng / mL の O K T 3 抗体及び 2500 ~ 3500 I U / mL の I L - 2 の存在下で培養される。

30

【0541】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、P B M C 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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。

40

【0542】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞：約 100×10^6 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 フィーダー細胞：約 50×10^6 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 フィーダー細胞：約 25×10^6 TIL を必要とする。

【0543】

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

10

【0544】

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

【0545】

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。

【0546】

2. サイトカイン及び他の添加物

20

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。

【0547】

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

30

【0548】

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-1 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 US 2019/0307796 A1 号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップ D 中の培養培地で使用されてもよい。

40

【0549】

E. ステップ E: TIL を採取する

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

【0550】

TIL は、例えば、遠心分離を含む、任意の適切な滅菌様式で採取され得る。TIL を

50

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。

【0551】

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とおしてポンプ輸送し、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。

【0552】

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。

【0553】

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。

【0554】

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。

【0555】

F. ステップF：最終製剤及び輸液容器への移行

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

【0556】

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。

【0557】

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細胞集団を産生し、これらのT細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、より高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-REX-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の容器内でのより大規模な培養で約4～7日間培養することによって、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の小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）第1の小規模培養由来のT細胞を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT細胞の一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-REX-100MCS容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のT細胞を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-REX-500MCS容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT細胞の一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-REX-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によって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT細胞の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

【0558】

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。

10

20

30

40

50

【0559】

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。

【0560】

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の亜集団と一緒にプールして、治療有効量のTILを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、TILの各亜集団は、治療有効量のTILを含む。

10

【0561】

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。

【0562】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、第1の拡張（すなわち、REP前拡張）の開始後約8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、または13日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第1の拡張の開始後約10日目に起こる。例示的な一実施形態では、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。

20

【0563】

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。

【0564】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【0565】

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。

30

【0566】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、任意選択でOKT-3及びさらに任意選択でAPCを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、任意選択でOKT-3及びさらに任意選択でAPCを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

40

【0567】

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

50

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。

【0568】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【0569】

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

【0570】

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。

【0571】

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。

【0572】

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。

【0573】

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。

【0574】

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

少しした後に行われる。

【0575】

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。

10

【0576】

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。

【0577】

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。

【0578】

20

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。

【0579】

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。

【0580】

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。

【0581】

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。

30

【0582】

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。

【0583】

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

【0584】

40

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。

【0585】

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

【0586】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、8日の期間中に

50

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。

【0587】

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。

【0588】

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。

【0589】

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。

10

【0590】

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。

【0591】

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。

【0592】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん罹患しているドナーから取得される。

【0593】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん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。

【0594】

20

いくつかの実施形態では、T細胞は、小児癌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。

【0595】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ブドウ膜黒色腫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。

【0596】

いくつかの実施形態では、T細胞は、中皮腫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。

【0597】

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。

30

【0598】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）から取得されたPBLである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がん罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、神経芽腫、肉腫（横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫）、及びCNS媒介癌（髄芽腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）、松果芽腫、神経膠腫、及び上衣腫）から選択される小児癌である。いくつかの実施形態では、がんは、ブドウ膜黒色腫である。例示的な実施形態では、がんは、中皮腫である。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。

40

【0599】

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

50

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、アフエレーシスによって取得される。アフエレーシス産物は、典型的には、リンパ球、例えば、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフエ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。

10

【0600】

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

20

30

【0601】

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

40

【0602】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、TILは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつGen3と称されるTIL拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、TILは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、T

50

IL 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。

【0603】

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

10

20

30

40

50

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

【0604】

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

【0605】

A. ステップA：患者の腫瘍試料を取得する

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

について評価される。

【0606】

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、小児癌である。いくつかの実施形態では、がんは、中皮腫である。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫（例えば、ブドウ膜黒色腫）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。

10

【0607】

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8mm³の薄片に断片化され、約2～3mm³が特に有用である。TILは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640緩衝液、2mMグルタミン酸、10mcg/mLゲンタマイシン、30単位/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ1分間機械的に解離させ、続いて5%CO₂中37℃で30分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、FICOLL分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第2012/0244133A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、TILを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

20

30

【0608】

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%CO₂で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5%CO₂で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晚消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、37℃、5%CO₂で一定の回転を伴って一晚消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わせられて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

40

【0609】

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

50

つかの実施形態では、緩衝液は、滅菌 H B S S である。

【0610】

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 I V 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、 100 mg/mL の 10 倍作業ストックである。

【0611】

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、 $10,000\text{ IU/mL}$ の 10 倍作業ストックである。

【0612】

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、 10 mg/mL の 10 倍作業ストックである。

10

【0613】

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

【0614】

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

【0615】

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 T I L 細胞集団は、抗原提示細胞、I L - 1 2、及び O K T - 3 を含む細胞培養培地に曝露される。

20

【0616】

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、T I L 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、T I L 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。

30

【0617】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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キスピボプロセスである。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 27 mm^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 1300 mm^3 ～ 約 1500 mm^3 の総体積を伴う約 30 ～ 約 60 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1350 mm^3 の総体積を伴う約 50 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1 グラム ～ 約 1.5 グラムの総質量を伴う約 50 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 4 個の断片を含む。

40

【0618】

50

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 $1\text{ mm}^3 \sim 10\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3 \sim 8\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 2 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 3 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 4 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 5 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 6 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 7 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 9 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1 \sim 4\text{ mm} \times 1 \sim 4\text{ mm} \times 1 \sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ である。

10

【0619】

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キスピボ方法である。

20

【0620】

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% CO₂ 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% CO₂ 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% CO₂ 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。

30

40

【0621】

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。

【0622】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を得た後及び／または腫瘍試料から細胞懸濁液を得た後）、任意選択で凍結され得、ステップBに記載の拡張に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図8（特に、例えば図8B）に例示される。

【0623】

50

1. コア／小生検由来のTIL

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

【0624】

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。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞肺癌（NSCLC）である。いくつかの実施形態では、がんは、小児癌である。いくつかの実施形態では、がんは、中皮腫である。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫（例えば、ブドウ膜黒色腫）である。

10

20

【0625】

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。

【0626】

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。いくつかの実施形態では、がんは、小児癌である。いくつかの実施形態では、がんは、中皮腫である。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫（例えば、ブドウ膜黒色腫）である。

30

【0627】

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。

40

【0628】

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。

【0629】

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

50

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。

【0630】

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、針が皮膚をとお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、口をとお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。

10

【0631】

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。

20

【0632】

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。

30

【0633】

「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺の癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫（例えば、ブドウ膜黒色腫）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。いくつかの実施形態では、がんは、小児癌である。いくつかの実施形態では、がんは、中皮腫である。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。

40

【0634】

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-R E X-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-R E X-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-R E X-100に入れられ

50

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-R-E-X-500に入れられる。

【0635】

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。

【0636】

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。

10

【0637】

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。

20

【0638】

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。

30

【0639】

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。

【0640】

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。

40

【0641】

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%CO₂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%CO₂中37℃で30分間再びインキュベート

50

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%CO₂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。

【0642】

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。

【0643】

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、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパン、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。

【0644】

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。

【0645】

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、2892 PZ 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100 PZ U/mL～約400 PZ U/mLの範囲、例えば、約100 PZ U/mL～約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL～約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL～約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL～約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL、または約400 PZ U/mLである。

【0646】

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、175 DMC 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100 DMC/mL～約400 DMC/mLの範囲、例えば、約100 DMC/mL～約400 DMC/mL、約100 DMC/mL～約350 DMC/mL、約100 DMC/mL～約300 DMC/mL、約150 DMC/mL～約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL、または約400 DMC/mLである。

【0647】

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、4 KU/バイアルの濃度であった。い

10

20

30

40

50

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。

【0648】

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検証し、それに応じて消化カクテルに追加される酵素の最終量を修正する。

【0649】

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(0.36DMCU/mL)、21.3uLのコラゲナーゼ(1.2PZ/mL)及び250uLのDNase I(200U/mL)を含む。

【0650】

2. 胸水T細胞及びTIL

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのT細胞またはTILの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのTILの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第2014/0295426号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0651】

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脾嚢胞液を含む、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。

【0652】

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。

【0653】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:10である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:9である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:8である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:5である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:2である。い

くつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:1である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にCellSaveチューブ内に入れられ、生存TILの減少を回避し、これは、4℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、24~48時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、4℃で、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

10

【0654】

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。

【0655】

20

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とおして流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも4μmであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、5μm以上であり得、他の実施形態では、6、7、8、9、または10μmのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたTILを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたTILを含む細胞は、方法の接触ステップで使用することができる。

【0656】

30

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のRBCを含む状態で、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 Dickinson）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 Dickinson）、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Stablyse（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。

40

【0657】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／ま

50

たは拡張される前に、約 -140°C の温度で凍結保存される。

【0658】

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。

10

【0659】

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。

【0660】

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°C 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。

20

【0661】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL法2は、以下のように行われる：0日目に、凍結保存されたPBMC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°C 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。

【0662】

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試料を得ることを含むPBL法3を使用して拡張される。B細胞は、CD19+選択を使用して単離され、T細胞は、PBMC試料の非CD19+画分の負の選択を使用して選択される。

30

【0663】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL法3は、以下のように行われる：0日目に、末梢血から取得された凍結保存されたPBMCを解凍し、計数する。CD19+B細胞を、CD19 Multisortキット、ヒト（Miltenyi Biotec）を使用して選別する。非CD19+細胞画分のうち、T細胞を、ヒトPan T細胞単離キット及びLSカラム（Miltenyi Biotec）を使用して精製する。

【0664】

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。

40

【0665】

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°C 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。

【0666】

50

いくつかの実施形態では、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤または I T K 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 I T K 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、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも 1 ヶ月間、少なくとも 2 ヶ月間、少なくとも 3 ヶ月間、少なくとも 4 ヶ月間、少なくとも 5 ヶ月間、少なくとも 6 ヶ月間、または 1 年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、P B M C は、イブルチニブなどの I T K 阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。

【0667】

10

いくつかの実施形態では、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤または I T K 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 I T K 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。

【0668】

いくつかの実施形態では、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤または I T K 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 I T K 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、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤または I T K 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 I T K 阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも 1 ヶ月間、少なくとも 2 ヶ月間、少なくとも 3 ヶ月間、少なくとも 4 ヶ月間、少なくとも 5 ヶ月間、少なくとも 6 ヶ月間、または少なくとも 1 年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、P B M C は、I T K 阻害剤に以前に曝露されたが、少なくとも 3 ヶ月、少なくとも 6 ヶ月、少なくとも 9 ヶ月、または少なくとも 1 年以内に治療されていない患者に由来する。

20

【0669】

本発明のいくつかの実施形態では、0 日目に、細胞が C D 1 9 + 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 P B M C から単離される。

【0670】

30

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 I T K 阻害剤で前治療されていない患者の場合、1 0 ~ 1 5 m L のバフィーコートは、約 5×10^9 の P B M C を産生し、これは、次いで、約 5.5×10^7 の P B L を産生する。

【0671】

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 I T K 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 P B L を産生する。本発明のいくつかの実施形態では、 40.3×10^6 の P B M C は、約 4.7×10^5 の P B L を産生する。

【0672】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、P B M C は、全血試料から、アフレーションによって、バフィーコートから、または P B M C 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。

40

【0673】

いくつかの実施形態では、P B L は、米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 3 4 7 3 5 0 A 1 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。

【0674】

4. 骨髄由来の P B M C から骨髄浸潤リンパ球 (M I L) を拡張する方法

M I L 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 P B M C を取得することを含む。0 日目に、P B M C が C D 3 + / C D 3 3 + / C D 2 0 + / C D 1 4 + に

50

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。

【0675】

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。

10

【0676】

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、アフエーシス、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。

【0677】

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。

20

【0678】

本発明のいくつかの実施形態では、約10～50mLの骨髄穿刺液から産生されたPBMCの数は、約 5×10^7 ～約 10×10^7 PBMCである。他の実施形態では、産生されたPBMCの数は、約 7×10^7 PBMCである。

【0679】

本発明のいくつかの実施形態では、約 5×10^7 ～約 10×10^7 PBMCが、約 0.5×10^6 ～約 1.5×10^6 MILを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、約 1×10^6 MILが産生される。

【0680】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髄穿刺液から誘導された 12×10^6 PBMCは、およそ 1.4×10^5 MILを産生する。

30

【0681】

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、アフエーシスによって、パフィーコートから、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。

【0682】

いくつかの実施形態では、MILは、米国特許出願公開第US2020／0347350 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

40

【0683】

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. 2

50

009, 32, 415-423、Robbins, et al., J. Immunol. 2004, 173, 7125-7130、Shen, et al., J. Immunother., 2007, 30, 123-129、Zhou, et al., J. Immunother. 2005, 28, 53-62、及び Tran, et al., J. Immunother., 2008, 31, 742-751に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0684】

例えば、図8（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C）のステップAに記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長を好む条件下で、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、0日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、1容器当たり最大60個の断片及び6000IU/mLのIL-2を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に1～8日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に1～7日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、1～8日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、1～7日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、5～8日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、5～7日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、約6～8日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に、約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、約6～7日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に、約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、約7～8日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に、約 1×10^8 のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、約7日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の拡張は、約8日間起こり、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞をもたらす。

【0685】

いくつかの実施形態では、TILの拡張は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第1の拡張ステップ（例えば、REP前またはプライミングREPと称されるプロセスを含み得、0日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップBに記載されるものなど）、続いて以下のステップD及び本明細書に記載される急速な第2の拡張（ステップD、急速拡張プロトコル（REP）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意選択の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第2のステップD（再刺激REPステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる。このプロセスから取得されたTILは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 ～ 10 mm^3 である。

【0686】

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、25 mM Hepes、及び 10 mg / mL ゲンタマイシンを補充した、GlutaMAX を含む RPMI 1640 からなる。

【0687】

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、G R E X 100 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、60 個以下の腫瘍断片が 1 つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、1 容器当たり 500 mL 以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU / mL の I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 2.5×10^8 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、O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 30 ng / mL の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 100 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU / mL の I L - 2、30 ng / mL の O K T - 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、容器当たり 6000 IU / mL の I L - 2、30 ng / mL の O K T - 3、及び 2.5×10^8 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0688】

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 T I L の成長を好み、かつ 0 日目の培養開始から T I L 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、I L - 2、抗原提示フィーダー細胞、及び O K T - 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、6000 IU / mL の I L - 2、ならびに抗原提示フィーダー細胞及び O K T - 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 T I L 集団、一般に約 1×10^8 のバルク T I L 細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張中の成長培地は、I L - 2 またはそのバリエーション、ならびに抗原提示フィーダー細胞及び O K T - 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 T I L 集団、一般に約 1×10^8 のバルク T I L 細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張中の成長培地は、I L - 2 またはそのバリエーション、ならびに抗原提示フィーダー細胞及び O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、I L - 2 は、組換えヒト I L - 2 (r h I L - 2) である。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、1 mg バイアルにつき $20 \sim 30 \times 10^6$ IU / mg の比活性を有する。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、1 mg バイアルにつき 20×10^6 IU / mg の比活性を有する。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、1 mg バイアルにつき 25×10^6 IU / mg の比活性を有する。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、1 mg バイアルにつき 30×10^6 IU / mg の比活性を有する。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、 $4 \sim 8 \times 10^6$ IU / mg の I L - 2 の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、 $5 \sim 7 \times 10^6$ IU / mg の I L - 2 の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、I L - 2 ストック溶液は、 6×10^6 IU / mg の I L - 2 の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、I L - 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 10,000 IU / mL の I L - 2、約 9,000 IU / mL の I L - 2、約 8,000 IU / mL の I L - 2、約 7,000 IU / mL の I L - 2、約 6000 IU / mL の I L - 2、または約 5,000 IU / mL の I L - 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 9,000 IU / mL の I L - 2 ~ 約 5,000 IU / mL の I L - 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 8,000 IU/mL の IL-2 ～ 約 6,000 IU/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 7,000 IU/mL の IL-2 ～ 約 6,000 IU/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 6,000 IU/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 3000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張細胞培養培地は、IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張細胞培養培地は、約 3000 IU/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 1000 IU/mL、約 1500 IU/mL、約 2000 IU/mL、約 2500 IU/mL、約 3000 IU/mL、約 3500 IU/mL、約 4000 IU/mL、約 4500 IU/mL、約 5000 IU/mL、約 5500 IU/mL、約 6000 IU/mL、約 6500 IU/mL、約 7000 IU/mL、約 7500 IU/mL、または約 8000 IU/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 ～ 2000 IU/mL、2000 ～ 3000 IU/mL、3000 ～ 4000 IU/mL、4000 ～ 5000 IU/mL、5000 ～ 6000 IU/mL、6000 ～ 7000 IU/mL、7000 ～ 8000 IU/mL、または約 8000 IU/mL の IL-2 を含む。

10

【0689】

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 500 IU/mL の IL-15、約 400 IU/mL の IL-15、約 300 IU/mL の IL-15、約 200 IU/mL の IL-15、約 180 IU/mL の IL-15、約 160 IU/mL の IL-15、約 140 IU/mL の IL-15、約 120 IU/mL の IL-15、または約 100 IU/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 500 IU/mL の IL-15 ～ 約 100 IU/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 400 IU/mL の IL-15 ～ 約 100 IU/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 300 IU/mL の IL-15 ～ 約 100 IU/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 200 IU/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 180 IU/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 180 IU/mL の IL-15 を含む。

20

30

【0690】

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 20 IU/mL の IL-21、約 15 IU/mL の IL-21、約 12 IU/mL の IL-21、約 10 IU/mL の IL-21、約 5 IU/mL の IL-21、約 4 IU/mL の IL-21、約 3 IU/mL の IL-21、約 2 IU/mL の IL-21、約 1 IU/mL の IL-21、または約 0.5 IU/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 20 IU/mL の IL-21 ～ 約 0.5 IU/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 15 IU/mL の IL-21 ～ 約 0.5 IU/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 12 IU/mL の IL-21 ～ 約 0.5 IU/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 10 IU/mL の IL-21 ～ 約 0.5 IU/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 5 IU/mL の IL-21 ～ 約 1 IU/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 2 IU/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 1 IU/mL

40

50

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0.5 IU/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1 IU/mLのIL-21を含む。

【0691】

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30 ng/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0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 µg/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、0.1 ng/mL~1 ng/mL、1 ng/mL~5 ng/mL、5 ng/mL~10 ng/mL、10 ng/mL~20 ng/mLの間、20 ng/mL~30 ng/mL、30 ng/mL~40 ng/mL、40 ng/mL~50 ng/mL、及び50 ng/mL~100 ng/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、15 ng/mL~30 ng/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、30 ng/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。

【0692】

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、バリエーション、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、0.1 µg/mL~100 µg/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、20 µg/mL~40 µg/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。

【0693】

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3000 IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3を約30 ng/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6000 IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3を約30 ng/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。

【0694】

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、25 mM Hepes、及び10 mg/mL ゲンタマイシンを補充した、GlutaMAXを含むRPMI 1640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。

【0695】

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。

【0696】

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)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、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。

【0697】

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。

【0698】

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)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、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。

【0699】

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

10

20

30

40

50

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。

【0700】

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）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、55 μ Mである。

【0701】

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）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1000 IU/mL～約8000 IU/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3000 IU/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。

【0702】

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。

【0703】

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。

【0704】

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）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、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。

【0705】

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。

【0706】

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。

【0707】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 260~350 mOsmol である。
いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 280~310 mOsmol である。いくつか
の実施形態では、合成培地には、最大約 3.7 g/L、または約 2.2 g/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 2 mM）、1 つ
以上の抗生物質、非必須アミノ酸（NEAA、最終濃度約 100 μM）、2-メルカプト
エタノール（最終濃度約 100 μM）がさらに補充されていてもよい。

【0708】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin Transl. Imm
unology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31
) に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または C
TS（商標）Optmizer を基礎細胞培地として使用し、0、2%、5%、または 1
0% のいずれかの CTS（商標）Immune Cell Serum Replace
ment を補充した。

【0709】

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、CAS 60-24-2）を欠いている。

【0710】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 2 の拡張（例えば、
図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）
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 3
の拡張（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び
／または図 8 D）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 4 の拡張（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／
または図 8 C 及び／または図 8 D）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 5 の拡張（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／
または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 6 の拡張（例えば、図 8（特に、例え
ば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 1（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）

10

20

30

40

50

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。

10

20

30

40

50

【0712】

いくつかの実施形態では、TILのプライミングによる第1の拡張は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、3日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、3日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、4日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、4日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、5日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、5日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、6日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、6日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、7日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、7日間続行することができる。

【0713】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21の組み合わせは、プライミングによる第1の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図8（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）による、ならびに本明細書に記載されるステップBプロセス中を含む、プライミングによる第1の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21の組み合わせは、プライミングによる第1の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図8（特に、例え

ば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) による、及び本明細書に記載されるステップ B プロセス中に含まれ得る。

【0714】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張、例えば、図 8 によるステップ B (特に、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 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 T I L 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 - R E X - 1 0 または G - R E X - 1 0 0 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 - R E X - 1 0 0 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 - R E X - 1 0 である。

10

【0715】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 4 ~ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 4 ~ 7 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 5 ~ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 5 ~ 7 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 6 ~ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前ま

20

30

40

50

たはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む))は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を必要とせず、むしろ6～7日目の間の任意の時点でプライミングによる第1の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第1の拡張手順(例えば、図8(特に、例えば図8 A 及び/または図8 B 及び/または図8 C 及び/または図8 D)からのステップBに記載されるもの、ならびにR E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む))は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を必要とせず、むしろ7または8日目の間の任意の時点でプライミングによる第1の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第1の拡張手順(例えば、図8(特に、例えば図8 A 及び/または図8 B 及び/または図8 C 及び/または図8 D)からのステップBに記載されるもの、ならびにR E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む))は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を必要とせず、むしろ7日目の間の任意の時点でプライミングによる第1の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第1の拡張手順(例えば、図8(特に、例えば図8 A 及び/または図8 B 及び/または図8 C 及び/または図8 D)からのステップBに記載されるもの、ならびにR E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む))は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を必要とせず、むしろ8日目の間の任意の時点でプライミングによる第1の拡張中に追加される。

10

20

【0716】

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8 B)からのステップBに記載されるもの、ならびにR E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む))は、T I L 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(P B M C)である。P B M Cは、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第1の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第1の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、G R E X - 10 当たり 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第1の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、G R E X - 100 当たり 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第1の拡張中に使用される。

30

【0717】

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

【0718】

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、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。

40

【0719】

いくつかの実施形態では、7日目の O K T 3 及び I L - 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、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 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、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 3000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 6000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。

50

【0720】

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、5~60 ng/mLのOKT3抗体及び1000~6000 IU/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、10~50 ng/mLのOKT3抗体及び2000~5000 IU/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、20~40 ng/mLのOKT3抗体及び2000~4000 IU/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、25~35 ng/mLのOKT3抗体及び2500~3500 IU/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 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/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、15 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/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、15 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。

10

【0721】

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。

20

【0722】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞:約 100×10^6 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 フィーダー細胞:約 50×10^6 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 フィーダー細胞:約 25×10^6 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 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の拡張で使用す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。

30

【0723】

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、6000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、容器当たり 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり30 ngのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、GEX100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU/mLのIL-2、30 ng/mLのOKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり6000 IU/mLのIL-2、30 ng/mLのOKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり500 mLの培養培地及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞当たり1

40

50

5 μ g の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び 15 μ g の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 100 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、500 mL の培養培地、6000 I U / mL の I L - 2、30 ng / mL の O K T - 3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地、6000 I U / mL の I L - 2、15 μ g の O K T - 3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞当たり 15 μ g の O K T - 3 を含む。

【0724】

10

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 T I L 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 (P B M C) である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 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 (a A P C) 細胞が P B M C の代わりに使用される。

【0725】

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

20

【0726】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、P B M C の代替物として、または P B M C 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。

【0727】

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 I L - 2 を含む培養培地を使用する。

【0728】

あるいは、T I L 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 U S 2017 / 0107490 A1 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、I L - 2、I L - 15 及び I L - 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、I L - 2 及び I L - 15、I L - 2 及び I L - 21、I L - 15 及び I L - 21、ならびに I L - 2、I L - 15、及び I L - 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。

30

【0729】

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、O K T - 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、4-1 B B 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、O X - 40 アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアソリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体 (P P A R) - 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-1 エー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 U S 2019 / 0307796 A1 号 (この開示は参照により本明細書に組み込まれる) に記載されるように、ステップ B 中の培養培地で使用されてもよい。

40

【0730】

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

50

場合によっては、例えば図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に示されるようにステップ B から取得される T I L 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 T I L 母集団（R E P 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（R E P）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 T I L 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 T I L 集団または急速な第 2 の拡張由来の拡張 T I L 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。

【0731】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張から（例えば、図 8（特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に示されるステップ B から）取得された T I L 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に示されるステップ B から）取得された T I L 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 T I L 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。

【0732】

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

10

20

30

40

50

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。

【0733】

いくつかの実施形態では、TILは、初期第1の拡張後、及び急速な第2の拡張前に保存されず、TILは、急速な第2の拡張に直接進行する（例えば、いくつかの実施形態では、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されるようにステップBからステップDへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張由来のTILである第2のTIL集団は、移行期間なしで急速な第2の拡張に直接進む。

【0734】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）によるステップCは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。い

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 R E X - 1 0 または G R E X - 1 0 0 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、G R E X - 1 0 0 内で行われ、急速な第 2 の拡張は、G R E X - 5 0 0 内で行われる。

【 0 7 3 5 】

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、T I L 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 R E P、ならびに図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 C D 3 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、G e n 3 プロセス全体の 8、9、10、または 11 日目）に、T I L は、より大容量の容器に移される。

【 0 7 3 6 】

いくつかの実施形態では、T I L の急速な第 2 の拡張（R E P と称されることもある拡張、ならびに図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L 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。

10

【0737】

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、R E P と称される拡張、ならびに図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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、T I L は、I L - 2、O K T - 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、T I L は、I L - 2、O K T - 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、T I L は、インターロイキン - 2（I L - 2）またはインターロイキン - 15（I L - 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 C D 3 抗体、例えば約 30 ng / mL の O K T 3、マウスモノクローナル抗 C D 3 抗体（O r t h o - M c N e i l , R a r i t a n , N J もしくは M i l t e n y i B i o t e c h , A u b u r n , C A から市販）または U H C T - 1（B i o L e g e n d , S a n D i e g o , C A , U S A から市販）を含み得る。T I L 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 T I L のさらなる刺激を誘導するように拡張することができる、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原 A 2（H L A - A 2）結合ペプチド、例えば、0.3 μ M M A R T - 1 : 26 - 35（27 L）または g p 100 : 209 - 217（210 M）から、任意選択で 300 I U / mL の I L - 2 または I L - 15 などの T 細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、N Y - E S O - 1、T R P - 1、T R P - 2、チロシナーゼがん抗原、M A G E - A 3、S S X - 2、及び V E G F R 2、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。T I L は、H L A - A 2 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。あるいは、T I L は、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射された H L A - A 2 + 同種異系リンパ球及び I L - 2 でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第 2 の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第 2 の拡張は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射された H L A - A 2 + 同種異系リンパ球及び I L - 2 を用いて起こる。

20

30

40

【0738】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、I L - 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 3000 I U / mL の I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 1000 I U / mL、約 1500 I U / mL、約 2000 I U

50

／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。

【0739】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30ng／mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1ng／mL、約0.5ng／mL、約1ng／mL、約2.5ng／mL、約5ng／mL、約7.5ng／mL、約10ng／mL、約15ng／mL、約20ng／mL、約25ng／mL、約30ng／mL、約35ng／mL、約40ng／mL、約50ng／mL、約60ng／mL、約70ng／mL、約80ng／mL、約90ng／mL、約100ng／mL、約200ng／mL、約500ng／mL、及び約1μg／mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1ng／mL～1ng／mL、1ng／mL～5ng／mL、5ng／mL～10ng／mL、10ng／mL～20ngの間、20ng／mL～30ng／mL、30ng／mL～40ng／mL、40ng／mL～50ng／mL、及び50ng／mL～100ng／mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、15ng／mL～30ng／mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30ng／mL～60ng／mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30ng／mLのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約60ng／mLのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。

【0740】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、IL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は、6000IU／mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、容器当たり 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培地中に、容器当たり500mLの培養培地及び30μgのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G-REX-100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培地中に、6000IU／mLのIL-2、60ng／mLのOKT-3、及び 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり500mLの培養培地、6000IU／mLのIL-2、30μgのOKT-3、及び 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0741】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、IL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は、6000IU／mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、容器当たり500mLの培養培地及び30μgのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G-REX-100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、6000IU／mLのIL-2、60ng／mLのOKT-3、及び $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な

第2の拡張における培地は、容器当たり500mLの培養培地、ならびに6000IU/mLのIL-2、30μgのOKT-3、及び $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0742】

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、バリエーション、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。

【0743】

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。

【0744】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び/またはIL-21の組み合わせは、第2の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び/またはIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図8（特に、例えば図8A及び/または図8B及び/または図8C及び/または図8D）による、ならびに本明細書に記載されるステップDプロセス中を含む、第2の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21の組み合わせは、第2の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図8（特に、例えば図8A及び/または図8B及び/または図8C及び/または図8D）による、及び本明細書に記載されるステップDプロセス中に含まれ得る。

【0745】

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

【0746】

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180 IU/mLのIL-15を含む。

【0747】

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/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20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/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5 IU/mLのIL-21～約1 IU/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2 IU/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1 IU/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0.5 IU/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1 IU/mLのIL-21を含む。

【0748】

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。

【0749】

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、150 mL培地中のプライミングによる第1の拡張、30 ng/mLのOKT3抗CD3抗体及び6000 IU/mLのIL-2におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも1.1倍（1.1×）、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.8倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍または4.0倍である。培地交換（一般に、使用済み培地の3分の2の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、3分の2培地交換）は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、G-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【0750】

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。

【0751】

いくつかの実施形態では、第2の拡張（REPと称される拡張、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDで参照される拡張を含み得る）は、100cmのガス透過性シリコン底部（GREX-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。5×10⁶または10×10⁶TIL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。GREX-100フラスコを、5%CO₂中37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500rpm（491×g）で10分間遠心分離される。TILペレットが、5%ヒトAB血清、6000IU/mLのIL-2を含む150mLの新鮮な培地で再懸濁され、元のGREX-100フラスコに戻し追加され得る。TILがGREX-100フラスコで連続して拡張される場合、10日目または11日目に、TILは、GREX-500などのより大きいフラスコに移され得る。培養14日目に、細胞が採取され得る。培養15日目に、細胞が採取され得る。培養16日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の3分の2は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、GREXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

10

20

【0752】

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。

【0753】

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。

30

【0754】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS（商標）Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Cd

40

50

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。
【0755】

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)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、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。

10

【0756】

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。

20

【0757】

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

30

【0758】

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

40

50

er (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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。

【0759】

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。

10

20

30

40

50

【0760】

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。

【0761】

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US2002/0076747 A1号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 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）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、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。

【0762】

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

10

20

30

40

50

リウムの濃度は、約 0.000001~0.0001 mg/L であり、アルブミン（例えば、AlbuMAX（登録商標）I）の濃度は、約 5000~50,000 mg/L である。

【0763】

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方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方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方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。

10

【0764】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 260~350 mOsmol である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 280~310 mOsmol である。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約 3.7 g/L、または約 2.2 g/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 2 mM）、1 つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（NEAA、最終濃度約 100 µM）、2-メルカプトエタノール（最終濃度約 100 µM）がさらに補充されていてもよい。

【0765】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin Transl. Immunology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または CTS（商標）Optmizer 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。

20

【0766】

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、CAS 60-24-2）を欠いている。

30

【0767】

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 2016/0010058 A1 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。

【0768】

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プ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。

40

【0769】

T リンパ球及び B リンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（接合）、及び C（一定）は、免疫グロブリン及び T 細胞受容体（T

50

C R) 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、TCRa b (すなわち、TCR α / β) の発現が増加する。

10

20

30

40

50

【0770】

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、6000 IU/mLのIL-2、30 μ g / フラスコのOKT-3、ならびに7.5 $\times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞(APC)を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培養培地(例えば、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、6000 IU/mLのIL-2、30 μ g / フラスコのOKT-3、ならびに5 $\times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞(APC)を含む。

【0771】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張、例えば、図8(特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D)によるステップDは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-R EX-100またはG-R EX-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-R EX-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-R EX-500である。

【0772】

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-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約3~7日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養でのTILを、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX-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日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。

【0773】

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-R EX-100 MCS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によって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。

【0774】

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。

【0775】

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-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。

【0776】

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-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約5日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約6日間培養される。

【0777】

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

【0778】

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。

【0779】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のTILを含む。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の完了後、1つ以上のTILの亜集団と一緒にプールして、治療有効量のTILを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、TILの各亜集団は、治療有効量のTILを含む。

【0780】

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。

【0781】

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、R E P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。

10

20

30

40

50

【0782】

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。

【0783】

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。

【0784】

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。

【0785】

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。

【0786】

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。

【0787】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される急速な第2の拡張手順（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDに記載されるような拡張、ならびにREPと称されるものを含む）は、REPTIL拡張中及び／または急速な第2の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（PBMC）である。PBMCは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【0788】

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

【0789】

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。

【0790】

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 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/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、60 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/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、60 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/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 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。

【0791】

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、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び1000～6000 IU/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、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2000～5000 IU/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、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2000～4000 IU/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、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2500～3500 IU/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、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。

【0792】

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。

【0793】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 5×10^8 フィーダー細胞：約 100×10^6 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 フィーダー細胞：約 100×10^6 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 フィーダー細胞：約 50×10^6 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 フィーダー細胞：約 50×10^6 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 フィーダー細胞：約 25×10^6 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 フィーダー細胞：約 25×10^6

⁶ T I Lを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第2の拡張は、急速な第2の拡張の2倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張が約 2.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の拡張は、約 5×10^8 フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張が約 2.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の拡張は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張の2倍 ($2.0 \times$)、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。

【0794】

10

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 (P B M C) である。P B M Cは、F i c o l l - P a q u e 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 (a A P C) 細胞がP B M Cの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、プライミングによる第1の拡張に追加されたP B M Cの2倍の濃度で、急速な第2の拡張に追加される。

【0795】

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

20

【0796】

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

【0797】

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I L - 2を含む培養培地を使用する。

【0798】

あるいは、T I L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U S 2 0 1 7 / 0 1 0 7 4 9 0 A 1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、I L - 2、I L - 1 5及びI L - 2 1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、I L - 2及びI L - 1 5、I L - 2及びI L - 2 1、I L - 1 5及びI L - 2 1、ならびにI L - 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1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。

30

【0799】

いくつかの実施形態では、ステップD (特に、例えば、図8 A及び／または図8 B及び／または図8 C及び／または図8 Dから) はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、O K T - 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 - 1 B B 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8 A及び／または図8 B及び／または図8 C及び／または図8 Dから) はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、O X - 4 0 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 (P P A R) - 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- エ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U S 2 0 1 9 / 0 3 0 7 7 9 6 A 1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8 A及び／または図8 B及び／または図

40

50

8 C 及び／または図 8 D から) 中の培養培地で使用されてもよい。

【0800】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) 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。

10

【0801】

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。

【0802】

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とおしてポンプ輸送し、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。

20

30

【0803】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) 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。

40

【0804】

いくつかの実施形態では、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) 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。

【0805】

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

50

れる。いくつかの実施形態では、T I L 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、T I L 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、T I L 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。

【0806】

F. ステップF：最終製剤及び輸液容器への移行

図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップA～Eが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のT I L が上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

10

【0807】

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T I L 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T I L 懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張されたT I L 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 I L 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、及びリンパ内が含まれる。

【0808】

V. さらにGen 2、Gen 3、及び他のT I L 製造プロセスの実施形態

20

A. P B M C 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する培養培地（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）を参照）は、抗C D 3抗体、例えばO K T - 3を含む。I L - 2と組み合わせた抗C D 3抗体は、T I L 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F a b 及びF (a b ') 2断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、T s o u k a s e t a l . , J . I m m u n o l . 1985, 135, 1719（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0809】

いくつかの実施形態では、P B M C フィーダー層の数は、以下のように計算される：

30

A. T細胞の体積（10 μ m 直径）： $V = (4/3) \pi r^3 = 523.6 \mu m^3$

B. 40 μ m（4細胞）の高さを有するG - R E X - 100（M）のカラム： $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu m^3$

C. カラムBを充填するために必要な細胞数： $4 \times 10^{12} \mu m^3 / 523.6 \mu m^3 = 7.6 \times 10^8 \mu m^3 * 0.64 = 4.86 \times 10^8$

D. 四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数： $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$

E. G - R E X - 500に外挿されるフィーダー及びT I L の数：T I L : 100×10^6 及びフィーダー： 2.5×10^9

この計算では、100 cm²の底部を有するシリンジ中でのT I L 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、J i n , e t . a l . , J . I m m u n o t h e r . 2012, 35, 283-292に記載されているように、N C I 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、J a e g e r a n d N a g e l , S c i e n c e , 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、M u s i n , R u s s . M a t h . S u r v . , 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。

40

【0810】

50

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第2の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、急速な第2の拡張の細胞培養培地と比較しておよそ50%少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第1の拡張を行うことを含む。

【0811】

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。

【0812】

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。

【0813】

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。

【0814】

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。

【0815】

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。

【0816】

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。

【0817】

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。

【0818】

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。

【0819】

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。

【0820】

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。

【0821】

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。

【0822】

10

20

30

40

50

2 : 1 ~ 正確にまたは約 3 : 1 の範囲から選択される。

【0835】

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。

【0836】

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。

【0837】

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。

【0838】

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。

【0839】

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。

【0840】

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。

【0841】

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。

【0842】

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。

【0843】

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。

【0844】

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。

【0845】

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。

10

20

30

40

50

【0846】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 APCであり、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 3.5×10^8 、 3.6×10^8 、 3.7×10^8 、 3.8×10^8 、 3.9×10^8 、 4×10^8 、 4.1×10^8 、 4.2×10^8 、 4.3×10^8 、 4.4×10^8 、 4.5×10^8 、 4.6×10^8 、 4.7×10^8 、 4.8×10^8 、 4.9×10^8 、 5×10^8 、 5.1×10^8 、 5.2×10^8 、 5.3×10^8 、 5.4×10^8 、 5.5×10^8 、 5.6×10^8 、 5.7×10^8 、 5.8×10^8 、 5.9×10^8 、 6×10^8 、 6.1×10^8 、 6.2×10^8 、 6.3×10^8 、 6.4×10^8 、 6.5×10^8 、 6.6×10^8 、 6.7×10^8 、 6.8×10^8 、 6.9×10^8 、 7×10^8 、 7.1×10^8 、 7.2×10^8 、 7.3×10^8 、 7.4×10^8 、 7.5×10^8 、 7.6×10^8 、 7.7×10^8 、 7.8×10^8 、 7.9×10^8 、 8×10^8 、 8.1×10^8 、 8.2×10^8 、 8.3×10^8 、 8.4×10^8 、 8.5×10^8 、 8.6×10^8 、 8.7×10^8 、 8.8×10^8 、 8.9×10^8 、 9×10^8 、 9.1×10^8 、 9.2×10^8 、 9.3×10^8 、 9.4×10^8 、 9.5×10^8 、 9.6×10^8 、 9.7×10^8 、 9.8×10^8 、 9.9×10^8 、または 1×10^9 APCである。

10

20

【0847】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 1.5×10^8 APC～正確にまたは約 3×10^8 APCの範囲から選択され、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 4×10^8 APC～正確にまたは約 7.5×10^8 APCの範囲から選択される。

【0848】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 2×10^8 APC～正確にまたは約 2.5×10^8 APCの範囲から選択され、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 4.5×10^8 APC～正確にまたは約 5.5×10^8 APCの範囲から選択される。

30

【0849】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 2.5×10^8 APCであり、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 5×10^8 APCである。

【0850】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に追加されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、プライミングによる第1の拡張の7日目（例えば、方法の7日目）に追加されるPBMCの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡張の0日目に抗原提示細胞を第1のTIL集団に追加することと、7日目に抗原提示細胞を第2のTIL集団に追加することを含み、0日目に追加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第1の拡張の7日目（例えば、方法の7日目）に追加される抗原提示細胞の数のおよそ50%である。

40

【0851】

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。

【0852】

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

50

は、正確にまたは約 1.0×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 4.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0853】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0854】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0855】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

【0856】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、 1.5×10^6 、 1.6×10^6 、 1.7×10^6 、 1.8×10^6 、 1.9×10^6 、 2×10^6 、 2.1×10^6 、 2.2×10^6 、 2.3×10^6 、 2.4×10^6 、 2.5×10^6 、 2.6×10^6 、 2.7×10^6 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、または 4.5×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

【0857】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0858】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 3.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 6.0×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0859】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4.0×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0860】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4.0×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0861】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 APC / cm^2 、 2.6×10^6 APC / cm^2 、 2.7×10^6 APC / cm^2 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、 4.5×10^6 、 4.6×10^6 、 4.7×10^6 、 4.8×10^6 、 4.9×10^6 、 5×10^6 、 5.1×10^6 、 5.2×10^6 、 5.3×10^6 、 5.4×10^6 、 5.5×10^6 、 5.6×10^6 、 5.7×10^6 、 5.8×10^6 、 5.9×10^6 、 6×10^6 、 6.1×10^6 、 6.2×10^6 、 6.3×10^6 、 6.4×10^6 、 6.5×10^6 、 6.6×10^6 、 6.7×10^6 、

10

20

30

40

50

6.8×10^6 、 6.9×10^6 、 7×10^6 、 7.1×10^6 、 7.2×10^6 、 7.3×10^6 、 7.4×10^6 、または 7.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0862】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、 1.5×10^6 、 1.6×10^6 、 1.7×10^6 、 1.8×10^6 、 1.9×10^6 、 2×10^6 、 2.1×10^6 、 2.2×10^6 、 2.3×10^6 、 2.4×10^6 、 2.5×10^6 、 2.6×10^6 、 2.7×10^6 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、または 4.5×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 APC / cm^2 、 2.6×10^6 APC / cm^2 、 2.7×10^6 APC / cm^2 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、 4.5×10^6 、 4.6×10^6 、 4.7×10^6 、 4.8×10^6 、 4.9×10^6 、 5×10^6 、 5.1×10^6 、 5.2×10^6 、 5.3×10^6 、 5.4×10^6 、 5.5×10^6 、 5.6×10^6 、 5.7×10^6 、 5.8×10^6 、 5.9×10^6 、 6×10^6 、 6.1×10^6 、 6.2×10^6 、 6.3×10^6 、 6.4×10^6 、 6.5×10^6 、 6.6×10^6 、 6.7×10^6 、 6.8×10^6 、 6.9×10^6 、 7×10^6 、 7.1×10^6 、 7.2×10^6 、 7.3×10^6 、 7.4×10^6 、または 7.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

10

20

【0863】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.0×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 4.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

30

【0864】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 1.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 3.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 6×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

40

【0865】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【0866】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 2×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4×10^6 APC / c

50

m^2 の密度で培養フラスコに播種される。

【0867】

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、PBM C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PBM C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。

【0868】

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、PBM C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PBM C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。

10

【0869】

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、PBM C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PBM C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。

【0870】

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、PBM C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、PBM C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。

20

【0871】

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、PBM C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、PBM C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。

【0872】

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、PBM C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、PBM C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。

30

【0873】

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、PBM C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、PBM C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。

【0874】

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、PBM C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、PBM C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。

40

【0875】

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、PBM C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、PBM C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。

【0876】

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、PBM C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、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確

50

にまたは約 2.9 : 1 の範囲から選択される。

【0877】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM C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、PBM C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。

【0878】

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、PBM C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、PBM C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。

10

【0879】

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、PBM C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、PBM C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。

【0880】

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、PBM C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、PBM C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。

20

【0881】

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、PBM C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、PBM C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。

【0882】

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、PBM C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、PBM C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。

30

【0883】

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、PBM C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、PBM C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。

【0884】

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、PBM C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、PBM C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。

40

【0885】

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、PBM C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、PBM C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。

【0886】

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、PBM C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、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にま

50

たは約 10 : 1 の範囲から選択される。

【0887】

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、PBM C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、PBM C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。

【0888】

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、PBM C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、PBM C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。

10

【0889】

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、PBM C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、PBM C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。

【0890】

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、PBM C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、PBM C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。

20

【0891】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM C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、PBM C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。

【0892】

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、PBM C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、PBM C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。

30

【0893】

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、PBM C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、PBM C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。

【0894】

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、PBM C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、PBM C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。

40

【0895】

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、PBM C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、PBM C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。

【0896】

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、PBM C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、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2 : 1～正確にま

50

たは約 2.3 : 1 の範囲から選択される。

【0897】

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、P BMC 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、P BMC 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。

【0898】

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、P BMC 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、P BMC 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。

【0899】

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、P BMC 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、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 である。

【0900】

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、P BMC 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、P BMC 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。

【0901】

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、P BMC を含む）の数は、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 APC（例えば、P BMC 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、P BMC 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 APC（例えば、P BMC を含む）である。

【0902】

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

C（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 1×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 3.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 3.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 1×10^9 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【0903】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 1.5×10^8 APC～約 3×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、約 4×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～約 7.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

10

【0904】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 2×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 2.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 4.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 5.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

20

【0905】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 2.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）であり、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）である。

【0906】

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。

30

【0907】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）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。

【0908】

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。

40

【0909】

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。

【0910】

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

50

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。

【0911】

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。

【0912】

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。

【0913】

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。

【0914】

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。

【0915】

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。

【0916】

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。

【0917】

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。

【0918】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM C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。

【0919】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM C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。

【0920】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM C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。

【0921】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM C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。

【0922】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM C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。

【0923】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM C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。

【0924】

10

20

30

40

50

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、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PB

50

MCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC(例えば、PBM C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、PBM Cを含む)の第1の層の数のAP C(例えば、PBM C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。

【0931】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む)の第1の層の数のAP C(例えば、PBM C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。

10

【0932】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む)の第1の層の数のAP C(例えば、PBM C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。

20

【0933】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM Cを含む)の第1の層の数の、AP C(例えば、PBM C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である。

【0934】

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、PBM C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、PBM C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、PBM C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、第1のAPC(例えば、PBM Cを含む)層の数の第2のAPC(例えば、PBM C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。

30

40

【0935】

50

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 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される。

【0936】

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 $1.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される。

【0937】

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 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $3.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される。

【0938】

B. 任意選択の細胞培地成分

1. 抗CD3抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図1及び8（特に、例えば図8B）を参照）は、抗CD3抗体を含む。IL-2と組み合わせた抗CD3抗体は、TIL集団におけるT細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにFab及びF(ab')₂断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0939】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトCD3ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトCD3抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体ムロモナブであるOKT3が使用される（Ortho-McNeil, Raritan, NJまたはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販されている）。表1を参照されたい。

【0940】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトCD3ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトCD3抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体ムロモナブであるOKT3が使用される（Ortho-McNeil, Raritan, NJまたはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販されている）。

【0941】

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

10

20

30

40

50

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、F a b 断片、F（a b'）断片、F a b 発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに 4-1 B B に結合する抗体の操作された形態、例えば、s c F v 分子も含む。いくつかの実施形態では、4-1 B B 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、4-1 B B 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 4-1 B B アゴニストには、抗 4-1 B B 抗体、ヒト抗 4-1 B B 抗体、マウス抗 4-1 B B 抗体、哺乳動物抗 4-1 B B 抗体、モノクローナル抗 4-1 B B 抗体、ポリクローナル抗 4-1 B B 抗体、キメラ抗 4-1 B B 抗体、抗 4-1 B B アドネクチン、抗 4-1 B B ドメイン抗体、一本鎖抗 4-1 B B 断片、重鎖抗 4-1 B B 断片、軽鎖抗 4-1 B B 断片、抗 4-1 B B 融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリエント、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗 4-1 B B 抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Lee, et al., P L O S O n e 2 0 1 3, 8, e 6 9 6 7 7。いくつかの実施形態では、4-1 B B アゴニストは、アゴニスト、抗 4-1 B B 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、4-1 B B アゴニストは、E U-1 0 1 (E u t i l e x C o. L t d.)、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、バリエント、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、4-1 B B 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、バリエント、もしくはバイオシミラーである。

10

20

【0942】

いくつかの実施形態では、4-1 B B アゴニストまたは 4-1 B B 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 4-1 B B 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 4-1 B B 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（4-1 B B L）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 T N F R S F 結合ドメイン及び I g G 1-F c 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、G i e f f e r s, et al., M o l. C a n c e r T h e r a p e u t i c s 2 0 1 3, 1 2, 2 7 3 5-4 7 に記載されている。

30

【0943】

アゴニスト 4-1 B B 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、4-1 B B アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で 4-1 B B 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、4-1 B B アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（c e l l u l a r t o x i c i t y）（A D C C）、例えば、NK細胞細胞傷害性（c y t o t o x i c i t y）を抑制するアゴニスト 4-1 B B 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、4-1 B B アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（A D C P）を抑制するアゴニスト 4-1 B B 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、4-1 B B アゴニストは、補体依存性細胞傷害性（C D C）を抑制するアゴニスト 4-1 B B 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、4-1 B B アゴニストは、F c 領域機能性を抑制するアゴニスト 4-1 B B モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

40

【0944】

いくつかの実施形態では、4-1 B B アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト 4-1 B B（配列番号 40）に結合することの特徴とする。いくつかの実施形態では、4-1 B B アゴニストは、ヒト 4-1 B B に結合する結合分子である（配列番号 40）

50

／s以下の k_{dissoc} で結合する4-1BBアゴニストを含む。

【0948】

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。

【0949】

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、バリエーション、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IL6、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エーション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（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. 2012, 61, 1721-33に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のclinicaltrials.gov識別子NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066、及びNCT02554812が含まれる。

【0950】

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）、バリエーション、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。

【0951】

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(V_H)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s c F v抗体を含む。

【0952】

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。

【0953】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含む4-1BB抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された4-1BBアゴニスト抗体であり、4-1BBアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。4-1BBアゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

10

20

30

40

50

【表 6】

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 4 2 ウトミルマブの 重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN 60 SPSFQGGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
配列番号 4 3 ウトミルマブの 軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTCLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTPPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
配列番号 4 4 ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG K IYPGDSYTN 60 YSPSFQGGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 4 5 ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTCLTVL 108
配列番号 4 6 ウトミ ルマブの重鎖 CDR 1	STYWIS 6
配列番号 4 7 ウトミ ルマブの重鎖 CDR 2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
配列番号 4 8 ウトミ ルマブの重鎖 CDR 3	RGYGFIDY 8
配列番号 4 9 ウトミ ルマブの軽鎖 CDR 1	SGDNIGDQYA H 11
配列番号 5 0 ウトミ ルマブの軽鎖 CDR 2	QDKNRPS 7
配列番号 5 1 ウトミ ルマブの軽鎖 CDR 3	ATYTGFGLA V 11

【0954】

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、バリエーション、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-カップ、抗 [ホモサピエンス TNFRSF9 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 9、4-1BB、T 細胞抗原 ILA、CD137)]、ホモサピエンス (完全ヒト) モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表 7 に示す。ウレルマブは、298 位 (及び 298') に N-グリコシル化部位、22-95 位 (V_H-V_L)、148-204 位 (C_H1-C_L)、262-322 位 (C_H2)、及び 368-426 位 (C_H3) (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) (23'-88' 及び 136'-196' 位) に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、227-227' 位及び 230-230' 位に鎖間重鎖-重鎖ジスルフィド架橋ならびに 135-216' 及び 135'-216' 位に鎖間重鎖-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エーション及び断片の調製及び特性は、米国特許第 7,288,638 号及び同第 8,962,804 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び

臨床特徴は、Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016に記載されており、<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のclinicaltrials.gov識別子NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992、及びNCT01471210が含まれる。

【0955】

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。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【0956】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号54に示される配列を含み、4-1BBアゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号55に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含むscFv抗体を含む。

【0957】

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。

【0958】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バ

イオ製品のアミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して１つ以上の翻訳後修飾を含む４－１ＢＢ抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／または欧州連合ＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

10

【表 7】

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 5 2 ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSG GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTYS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTH TYTCNVDPKPT SNTKVDKRVK SKYGPCCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFCSCVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号 5 3 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号 5 4 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 5 5 ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTHG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号 5 6 ウレルマブの重鎖 CDR 1	GYYS	5
配列番号 5 7 ウレルマブの重鎖 CDR 2	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号 5 8 ウレルマブの重鎖 CDR 3	DYGPNGYDWY FDL	13
配列番号 5 9 ウレルマブの軽鎖 CDR 1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 6 0 ウレルマブの軽鎖 CDR 2	DASNRAT	7
配列番号 6 1 ウレルマブの軽鎖 CDR 3	QQRSDWPPAL T	11

20

30

40

【0959】

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 Ｐｈａｒｍｉｎｇ ｅｎ ５５２５３２）、ＢＢＫ２（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ ＭＳ６２１ＰＡＢＸ）

50

、145501 (Leinco Technologies B591)、ATCC 番号 HB-11248として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第6,974,863号に開示される抗体、5F4 (BioLegend 311503)、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-IgG1 (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3E1)、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3E1)、米国特許第5,928,893号に開示される抗体、米国特許第6,303,121号に開示される抗体、米国特許第6,569,997号に開示される抗体、国際特許出願公開第WO2012/177788号、同第WO2015/119923号、及び同第WO2010/042433号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、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。

10

20

【0960】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、国際特許出願公開第WO2008/025516A1号、同第WO2009/007120A1号、同第WO2010/003766A1号、同第WO2010/010051A1号、及び同第WO2010/078966A1号、米国特許出願公開第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。

30

【0961】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、構造I-A (C末端Fc抗体断片融合タンパク質) もしくは構造I-B (N末端Fc抗体断片融合タンパク質) に示されるような4-1BBアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリエーション、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、4-1BB L (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、親水性残基及び柔軟性のためのGly及びSer配列、ならびに溶解性のためのGlu及びLysを含み得るリンカーによって結合された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, 20

40

50

13, 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。

【0962】

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。

【表 8】

表 8. C 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質設計（構造 I-A）を有する、4-1BB アゴニスト融合タンパク質を含む、TNFRSF アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 62 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLVHQQDLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV 180 LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
配列番号 63 リンカー	GGPGSSKSCD KHTCPCPCPA PE 22
配列番号 64 リンカー	GGSGSSKSCD KHTCPCPCPA PE 22
配列番号 65 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PCPCAPE 27
配列番号 66 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PCPCAPE 27
配列番号 67 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPCPCAPE 29
配列番号 68 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPCPCAPE 29
配列番号 69 リンカー	GGPGSSSGSGS SDKTHTCPCP APE 24
配列番号 70 リンカー	GGPGSSSGSGS DKTHTCPCP APE 23
配列番号 71 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPCPAP E 21
配列番号 72 リンカー	GGSSSSSSSS GSKTHTCPCP CPAPE 25

【0963】

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 TNFRSF 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。

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. N末端Fc抗体断片融合タンパク質設計（構造I-B）を有する、4-1BBアゴニスト融合タンパク質を含む、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号 73 Fcドメイン	METDTLLLV LLLWVPAGNG DKHTCPCP APPELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNATK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLD SGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME 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	SSSSSSSGSGS GS	12
配列番号 76 リンカー	SSSSSSSGSGS GSGSGS	16

10

【0964】

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、バリエント、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。

20

【0965】

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4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、4-1BB L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4-1BB L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。

30

【0966】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号44及び配列番号45に示される配列と少なくとも95%同一である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配列及びV_L配列を含むscFvドメインである1つ以上の4-1BB結合ドメインを含み、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。

40

50

【表 10】

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 s c F v 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 4-1BB L	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
配列番号 78 4-1BB L 可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVGAE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
配列番号 79 4B 4-1-1バージョン1の可変重鎖	QVQLQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
配列番号 80 4B4 -1-1バージョン1の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLINSINSEV EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
配列番号 81 4B4 -1-1バージョン2の可変重鎖	QVQLQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
配列番号 82 4B4 -1-1バージョン2の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLINSINSEV EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 83 H39E3-2の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYNTYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
配列番号 84 H39E3-2の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTFG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

【0967】

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、細胞膜まである特定の距離を提供するが、4-1BB 結合ドメインの一部ではない）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。

【0968】

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。

【0969】

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。

【0970】

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。

10

【0971】

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、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにOX40に結合する抗体の操作された形態、例えば、scFv分子も含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのOX40アゴニストには、抗OX40抗体、ヒト抗OX40抗体、マウス抗OX40抗体、哺乳動物抗OX40抗体、モノクローナル抗OX40抗体、ポリクローナル抗OX40抗体、キメラ抗OX40抗体、抗OX40アドネクチン、抗OX40ドメイン抗体、一本鎖抗OX40断片、重鎖抗OX40断片、軽鎖抗OX40断片、抗OX40融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、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。

20

30

【0972】

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、Giffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載されている。

40

50

【0973】

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。

10

【0974】

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。

20

【表11】

表11. OX40抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)					
配列番号85 ヒトOX40 (ホモサピエンス)	MCVGARRLGR	GPCAALLLLG	LGLSTVTGLH	CVGDTYPSND	RCHECRPGN	GMVSRCSRSQ
	NTVCRPCGPG	FYNDVVSSKP	CKPCTWCNLR	SGSERKQLCT	ATQDTVCRCR	AGTQPLDSYK
	PGVDCAPCPP	GHFSPGDNQA	CKPWTNCTLA	GKHTLQPASN	SSDAICEDRD	PPATQPQETQ
	GPPARPITVQ	PTEAWPRTSQ	GPSTRPVEVP	GGRAVAAILG	LGLVLGLLGP	LAILLALYLL
	RRDQRLPPDA	HKPPGGGSFR	TPIQEEQADA	HSTLAKI		
配列番号86 マウスOX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA	LLLLGLTLGV	TARRLNCVKH	TYPSGHKCCR	ECQPGHGMVS	RCDHTRDTLC
	HPCETGFYNE	AVNYDTCKQC	TQCNHRSGSE	LKQNTPTQD	TVCRCRPGTQ	PRQDSGYKLG
	VDCVPCPPGH	FSPGNNQACK	PWTNCTLSGK	QTRHPASDSL	DAVCEDRSL	ATLLWETQRP
	TFRPTTVQST	TVWPRTSELP	SPPTLVTPQG	PAFAVLLGLG	LGLLAPLTVL	LALYLLRKAW
	RLPNTPKPCW	GNSFRTPIQE	EHTDAHFTLA	KI		

30

【0975】

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100 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約90 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約80 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約70 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約60 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約50 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約40 pM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30 pM以下の K_D で結合するOX40アゴニストを含む。

40

【0976】

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 $7.5 \times 10^5 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $7.5 \times 10^5 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $8 \times 10^5 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $8.5 \times 10^5 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $9 \times 10^5 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒ

50

トもしくはマウスOX40に約 $9.5 \times 10^5 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 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 $1 \times 10^6 \text{ l} / \text{M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合するOX40アゴニストを含む。

【0977】

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 $2 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.1 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.2 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.3 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.4 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.5 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.6 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウスOX40に約 $2.7 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.8 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.9 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウスOX40に約 $3 \times 10^{-5} \text{ l} / \text{s}$ 以下の k_{dissoc} で結合するOX40アゴニストを含む。

10

【0978】

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 10 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 9 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 8 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 7 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 6 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 5 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 4 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 3 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 2 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 1 nM 以下の IC_{50} で結合する、OX40アゴニストを含む。

20

【0979】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、MED10562またはMED10562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型グリカンを含む）、22-95位（ V_H-V_L ）、148-204位（ C_H1-C_L ）、265-325位（ C_H2 ）、及び371-429位（ C_H3 ）（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_H1-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。

30

40

【0980】

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

50

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87及び配列番号88に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号87及び配列番号88に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

【0981】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、タポリキシズマブの重鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号89に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号90に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、配列番号89及び配列番号90に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含むscFv抗体を含む。

20

【0982】

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。

30

【0983】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、タポリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タポリキシズマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タポ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バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参

40

50

照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【表 1 2】

表 1 2. タボリキシズマブに関連する O X 4 0 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 8 7 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRTITN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTSLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGDSFLL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 8 8 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 8 9 タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRTITN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTSLVT 118
配列番号 9 0 タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGSTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 9 1 タボリキシズマブの重鎖 C D R 1	GSFSSGYWN 9
配列番号 9 2 タボリキシズマブの重鎖 C D R 2	YIGYISYNGI TYH 13
配列番号 9 3 タボリキシズマブの重鎖 C D R 3	RYKYDYDGGH AMDY 14
配列番号 9 4 タボリキシズマブの軽鎖 C D R 1	QDISNYLN 8
配列番号 9 5 タボリキシズマブの軽鎖 C D R 2	LLIYYTSKLH S 11
配列番号 9 6 タボリキシズマブの軽鎖 C D R 3	QQGSALPW 8

【 0 9 8 4】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、P f i z e r , I n c . から入手可能な完全ヒト抗体である 1 1 D 4 である。1 1 D 4 の調製及び特性は、米国特許第 7 , 9 6 0 , 5 1 5 号、同第 8 , 2 3 6 , 9 3 0 号、及び同第 9 , 0 2 8 , 8 2 4 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。1 1 D 4 のアミノ酸配列を表 1 3 に示す。

【 0 9 8 5】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、配列番号 9 7 によって示される重鎖及び配列番号 9 8 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、それぞれ、配列番号 9 7 及び配列番号 9 8 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片 (s c F v) 、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97及び配列番号98に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

【0986】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、11D4の重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号99に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号100に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号99及び配列番号100に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。

20

【0987】

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。

30

【0988】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、11D4に関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、11D4である。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、11D4である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、11D4である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイ

40

50

オ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、１１Ｄ４である。

【表１３】

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	PGKGLEWVS	ISSSSSTIDY	60
	ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRDED	TAVYYCARES	GWYLFYWGQ	GTTLTVSSAS	120
	TKGPSVFPLA	PCSRSTSEST	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	180
	YSLSSVVTVP	SSNFGTQTYT	CNVDHKPSNT	KVDKTVERKC	CVECPPCPAP	PVAGPSVFLF	240
	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	QFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQFNSTFRVV	300
	SVLTIVHQDW	LNGKEYKCKV	SNKGLPAPIE	KTISKTKGQP	REPQVYTLPP	SREEMTKNQV	360
	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPMLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	420
	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK				444
	DIQMTQSPSS	LSASVGDVRT	ITCRASQGIS	SWLAWYQQKP	EKAPKSLIYA	ASSLQSGVPS	60
	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	YNSYPPTFGG	GTKVEIKRTV	AAPSVFIIPP	120
配列番号 98 １１Ｄ４の軽鎖	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT	180
	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC			214
配列番号 99 １１Ｄ４の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYSMNWVRQA	PGKGLEWVS	ISSSSSTIDY	60
	ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRDED	TAVYYCARES	GWYLFYWGQ	GTTLTVSS	118
配列番号 100 １１Ｄ４の軽鎖 可変領域	DIQMTQSPSS	LSASVGDVRT	ITCRASQGIS	SWLAWYQQKP	EKAPKSLIYA	ASSLQSGVPS	60
	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	YNSYPPTFGG	GTKVEIK		107
配列番号 101 11 Ｄ４の重鎖 CDR 1	SYSMN						5
配列番号 102 11 Ｄ４の重鎖 CDR 2	YISSSSSTID YADSVKG						17
配列番号 103 11 Ｄ４の重鎖 CDR 3	ESGWYLFDY						9
配列番号 104 11 Ｄ４の軽鎖 CDR 1	RASQGISSWL A						11
配列番号 105 11 Ｄ４の軽鎖 CDR 2	AASSLQS						7
配列番号 106 11 Ｄ４の軽鎖 CDR 3	QQYNSYPPT						9

【０９８９】

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。

【０９９０】

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）、バリエント、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。

【0991】

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。

【0992】

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。

【0993】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、18D8 に関して薬物規制当局によって承認された OX40 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む OX40 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8 である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された OX40 アゴニスト抗体であり、OX40 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8 である。OX40 アゴニスト抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合 EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8 である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8 である。

10

20

30

40

50

【表 1 4】

表 1 4. 1 8 D 8 に関連する O X 4 0 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 1 0 7 1 8 D 8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFFYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSL SVVTVPSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVSVSLT VVHQDWLNGK EYCKVSNKNG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 1 0 8 1 8 D 8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT 180 SKADYEKKHV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号 1 0 9 1 8 D 8 の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFFYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
配列番号 1 1 0 1 8 D 8 の軽鎖 可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
配列番号 1 1 1 1 8 D 8 の重鎖 C D R 1	DYAMH 5
配列番号 1 1 2 1 8 D 8 の重鎖 C D R 2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
配列番号 1 1 3 1 8 D 8 の重鎖 C D R 3	DQSTADYYFY YGMDV 15
配列番号 1 1 4 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 1 1 5 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 2	DASNRAT 7
配列番号 1 1 6 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 3	QQRSNWPT

【0 9 9 4】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、G l a x o S m i t h K l i n e p l c . から入手可能なヒト化抗体である H u 1 1 9 - 1 2 2 である。H u 1 1 9 - 1 2 2 の調製及び特性は、米国特許第 9 , 0 0 6 , 3 9 9 号及び同第 9 , 1 6 3 , 0 8 5 号、ならびに国際特許公開第 W O 2 0 1 2 / 0 2 7 3 2 8 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。H u 1 1 9 - 1 2 2 のアミノ酸配列を表 1 5 に示す。

【0 9 9 5】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖及び軽鎖 C D R または可変領域（V R）を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号 1 1 7 に示される配列を含み、O X 4 0 アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号 1 1 8 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 9 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 8 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 7 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 6 % 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。

【0996】

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。

【0997】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu119-122に関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。

10

20

30

40

50

【表 1 5】

表 1 5. H u 1 1 9 - 1 2 2 に関連する O X 4 0 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 1 1 7 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYFEP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS	60 120
配列番号 1 1 8 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 1 1 9 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 重鎖 C D R 1	SHDMS	5
配列番号 1 2 0 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 重鎖 C D R 2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 1 2 1 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 重鎖 C D R 3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 1 2 2 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 軽鎖 C D R 1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 1 2 3 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 軽鎖 C D R 2	LASNLES	7
配列番号 1 2 4 H u 1 1 9 - 1 2 2 の 軽鎖 C D R 3	QHSRELPLT	9

10

20

【0 9 9 8】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、G l a x o S m i t h K l i n e p l c . から入手可能なヒト化抗体である H u 1 0 6 - 2 2 2 である。H u 1 0 6 - 2 2 2 の調製及び特性は、米国特許第 9 , 0 0 6 , 3 9 9 号及び同第 9 , 1 6 3 , 0 8 5 号、ならびに国際特許公開第 W O 2 0 1 2 / 0 2 7 3 2 8 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。H u 1 0 6 - 2 2 2 のアミノ酸配列を表 1 6 に示す。

30

【0 9 9 9】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖及び軽鎖 C D R または可変領域（V R）を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号 1 2 5 に示される配列を含み、O X 4 0 アゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号 1 2 6 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 2 5 及び配列番号 1 2 6 に示される配列と少なくとも 9 9 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 2 5 及び配列番号 1 2 6 に示される配列と少なくとも 9 8 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 2 5 及び配列番号 1 2 6 に示される配列と少なくとも 9 7 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 2 5 及び配列番号 1 2 6 に示される配列と少なくとも 9 6 % 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、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 2 5 及び配列番号 1 2 6 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

40

【1 0 0 0】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、それぞれ、配列番号 1 2 7、配列番号 1 2 8、及び配列番号 1 2 9 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D

50

R 3 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 1 3 0、配列番号 1 3 1、及び配列番号 1 3 2 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 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。

【1 0 0 1】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、H u 1 0 6 - 2 2 2 に関して薬物規制当局によって承認された O X 4 0 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む O X 4 0 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、H u 1 0 6 - 2 2 2 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 O X 4 0 アゴニスト抗体であり、O X 4 0 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、H u 1 0 6 - 2 2 2 である。O X 4 0 アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合 E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、H u 1 0 6 - 2 2 2 である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、H u 1 0 6 - 2 2 2 である。

【表 1 6】

表 1 6. H u 1 0 6 - 2 2 2 に関連する O X 4 0 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 1 2 5 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTFTVTV SS	60 120 122
配列番号 1 2 6 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDVS TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASYLYTGVPVS RFGSGSGSTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号 1 2 7 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖 C D R 1	DYSMH	5
配列番号 1 2 8 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖 C D R 2	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号 1 2 9 H u 1 0 6 - 2 2 2 の重鎖 C D R 3	PYYDYVSYA MDY	13
配列番号 1 3 0 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖 C D R 1	KASQDVSTAV A	11
配列番号 1 3 1 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖 C D R 2	SASYLYT	7
配列番号 1 3 2 H u 1 0 6 - 2 2 2 の軽鎖 C D R 3	QQHYSTPRT	9

【1 0 0 2】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニスト抗体は、M E D I 6 4 6 9（9 B 1 2 と
も称される）である。M E D I 6 4 6 9 は、マウスモノクローナル抗体である。We i n
b e r g , e t a l . , J . I m m u n o t h e r . 2 0 0 6 , 2 9 , 5 7 5 - 5 8 5

。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。

【1003】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、L106 BD (Pharming 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。

【1004】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、国際特許出願公開第WO95/12673号、同第WO95/21925号、同第WO2006/121810号、同第WO2012/027328号、同第WO2013/028231号、同第WO2013/038191号、及び同第WO2014/148895号、欧州特許出願第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。

【1005】

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、バリエーション、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TNRF5F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。

【1006】

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、バリエーション、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。

10

【1007】

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。

20

【1008】

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 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。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 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 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 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 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 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 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 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 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。

30

40

【表 17-1】

表 17. 融合タンパク質（例えば、構造 I-A 及び I-B）における OX40 結合ドメインとしてまたは s c F v 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 SIKVQFTEYK KDEEPLFQLK CVL	VGNAARPRFE KEKGFILTSQ KVRSVNSLMV	RNKLLLVASV KEDEIMKVQN ASLTYKDKVY	IQGLGLLCLF NSVIINCDFG LNVTTDNTSL	TYICLHFSAL YLISLKGYSF DDFHVNGGEL	QVSHRYPRIQ QEVNISLHYQ ILIHQNPGEF	60 120 180 183
配列番号 134 OX40L 可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI VNISLHYQKD IHQNPGEFCV	LKVQFTEYKKE EEPLFQLKKV	KGFILTSQKE RSVNSLMVAS	DEIMKVQNNNS LTYKDKVYLN	VIINCDFGYL ISLKGYSFSQE	QVSHRYPRIQ FHVNGGELIL	60 120 131
配列番号 135 OX40L 可溶性 ドメイン（代替）	YPRIQSIKVQ SLHYQKDEEP NPGEFCVL	FTEYKKEKGF LFQLKKVRSV	ILTSQKEDEI NSLMVASLTY	MKVQNNNSVII KDKVYLNVT	NCDGFFYLISL KGYSFSQEVNI	QVSHRYPRIQ NGGELILIHQ	60 120 128
配列番号 136 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG ADSVKGRFTI	LVQPGGSLRL SRDNSKNTLY	SCAASGFTFS LQMNSLRAED	NYTMNWVRQA TAVYYCAKDR	PGKGLEWVSA YSQVHYALDY	ISGSGGSTYY WGQGTFLTVS	60 120
配列番号 137 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS SGVPDRFSGS	LPVTPGEPAS GSGTDFTLKI	ISCRSSQSLL SRVEAEDVGV	HSNGYNYLDW YYCQYYNHP	YLQKAGQSPQ TTFGQGTK	LLIYLGSNRA	60 108
配列番号 138 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG SRKGRFTISR	VVQPGSLRL DNSKNTLYLQ	SCAASGFTFS MNLRAEDTA	DYTMNWVRQA VYYCARDRYF	PGKGLEWVSS RQQNAFDYWG	ISGSGSTYYAD QGTLTVTVSSA	60 120
配列番号 139 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS SGVPDRFSGS	LPVTPGEPAS GSGTDFTLKI	ISCRSSQSLL SRVEAEDVGV	HSNGYNYLDW YYCQYYNHP	YLQKAGQSPQ TTFGQGTK	LLIYLGSNRA	60 108
配列番号 140 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG ADSVKGRFTI	LVQPRGSLRL SRDNSKNTLY	SCAASGFTFS LQMNSLRAED	SYAMNWVRQA TAVYYCAKDR	PGKGLEWVAV YITLPNALDY	ISYDGSNKYY WGQGTFLTVS	60 120
配列番号 141 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS SGVPDRFSGS	LPVTPGEPAS GSGTDFTLKI	ISCRSSQSLL SRVEAEDVGV	HSNGYNYLDW YYCQYKSNP	YLQKPGQSPQ PTFGQGTK	LLIYLGSNRA	60 108
配列番号 142 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG DSVMGRFTIS	LVHPPGSLRL RDNSKNTLYL	SCAGSGFTFS QMNSLRAEDT	SYAMHWVRQA AVYYCARYDN	PGKGLEWVSA VMGLYWFEDY	IGTGGGTYYA GQGTFLTVSS	60 120
配列番号 143 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT RFGSGSGGTD	LSLSPGERAT FTLTISSELP	LSCRASQSVS EDFAVYYCQQ	SYLAWYQQKP RSNWPPAFGG	GQAPRLLIYD GTKVEIKR	ASNRAIGIPA	60 108
配列番号 144 重鎖可変領域	EVQLQSGGPE NEKFKGKATL	LVKPGASVKM TSDKSSSTAY	SCKASGYTFT MELSSLTSED	SYVMHWVKQK SAVYYCANYY	PGQGLEWIGY GSSLSMDYWG	INPYNDGTKY QGTSVTVSS	60 119
配列番号 145 軽鎖可変領域	DIQMTQTSS RFGSGSGGTD	LSASLGDRVT YSLTISNLEQ	ISCRASQDIS EDIATYFCQQ	NYLNWYQQKP GNTLPWTFGG	DGTVKLLIYY GTKLEIKR	TSRLHSGVPS	60 108
配列番号 146 重鎖可変領域	EVQLQSGGPE NQNFKDKATL	LVKPGASVKI TVDKSSSTAY	SCRKTSGYTFK MEFRSLTSED	DYTMHWVKQS SAVYYCARMG	HGKSLEWIGG YHGPHLDFDV	IYPNNGGSTY WGAGTTVTVS	60 120 121
配列番号 147 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF RFTGGSGGTD	MSTSLGDRVS FTLTISNVQS	ITCKASQDVG EDLTDYFCQQ	AAVAWYQQKP YINYPLTFGG	GQSPKLLIYW GTKLEIKR	ASTRHTGVPD	60 108
配列番号 148 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QIQLVQSGPE ADDFKGRFAF SS	LKKPGETVKI SLETSASTAY	SCKASGYTFT LQINNLRKNE	DYSMHWVKQA TATYFCANPY	PGKGLKWMGW YDYVSYAMD	INTETGEPTY YWGHTSVTV	60 120 122
配列番号 149 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE ADDFKGRFVF SS	LKKPGASVKV SLDTSVSTAY	SCKASGYTFT LQISSLKAED	DYSMHWVRQA TAVYYCANPY	PGQGLKWMGW YDYVSYAMD	INTETGEPTY YWGQGTTVTV	60 120 122
配列番号 150 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF RFTGGSGGTD	MSTSVRDRVS FTFTISSVQA	ITCKASQDVS EDLAVYYCQQ	TAVAWYQQKP HYSTPRTFGG	GQSPKLLIYS GTKLEIK	ASYLYTGVPD	60 107
配列番号 151 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF RFTGGSGGTD	MSTSVRDRVS FTFTISSVQA	ITCKASQDVS EDLAVYYCQQ	TAVAWYQQKP HYSTPRTFGG	GQSPKLLIYS GTKLEIK	ASYLYTGVPD	60 107

10

20

30

40

50

【表 17-2】

配列番号 152 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60
	PDTMERRFTI SRDNTKKTLY LQMSSLRSER TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTILTVSA 120
配列番号 153 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLLELVAA INSDGGSTYY 60
	PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTSS 120
配列番号 154 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60
	GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
配列番号 155 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60
	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 156 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMWVRQSP 60
	EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120
配列番号 157 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LFLWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60
	GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGSRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLITFGAG 120
	TKLELK 126

10

【1009】

20

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。

30

【1010】

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。

40

【1011】

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。

【1012】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、前述のVLドメインのうちのいずれかに連結された前述のVHドメインのうちのいずれかを含むOX40アゴニストscFv抗

50

体である。

【1013】

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。

【1014】

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。

【1015】

C. 任意選択の細胞生存率分析

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第1の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンブルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマーブルーアッセイ及びMTTアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【1016】

1. 細胞計数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。CD3、CD4、CD8、及びCD56などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、FACSCanto（商標）フローサイトメーター（BD Biosciences）を使用して、例えば、BD Biosciences（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、米国特許公開第2018/0280436号または国際特許公開第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。

【1017】

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。

【1018】

2. 細胞培養

いくつかの実施形態では、上で考察され、図1及び8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に例示されたものを含む、TILを拡張するための方法は、約5,000mL～約25,000mLの細胞培地、約5,000mL～約10,000mLの細胞培地、または約5,800mL～約8,700mLの細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第2の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張及び第2の拡張（急速な第2の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、TILの数を

10

20

30

40

50

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、A I M-V細胞培地（L-グルタミン、50 μMの硫酸ストレプトマイシン、及び10 μM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、T I L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、T I L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。

【1019】

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

【1020】

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I L-2、1 X抗原提示フィーダー細胞、及びO K T-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、T I Lを第2のガス透過性容器に移し、I L-2、2 X抗原提示フィーダー細胞、及びO K T-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T I L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。

【1021】

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、I L-2、1 X抗原提示フィーダー細胞、及びO K T-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、T I Lを第2のガス透過性容器に移し、I L-2、2 X抗原提示フィーダー細胞、及びO K T-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T I L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。

【1022】

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、I L-2、1 X抗原提示フィーダー細胞、及びO K T-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、T I Lを第2のガス透過性容器に移すことと、I L-2、2 X抗原提示フィーダー細胞、及びO K T-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T I L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。

【1023】

いくつかの実施形態では、T I L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、P B M Cを使用してT I L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、T I L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、T I Lは、X u r i C e l l E x p a n s i o n S y s t e m W 2 5（G E H e a l t h c a r e）などのガス透過性バッグ内のT I L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、T I Lは、X u r i C e l l

10

20

30

40

50

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 100 mL、約 200 mL、約 300 mL、約 400 mL、約 500 mL、約 600 mL、約 700 mL、約 800 mL、約 900 mL、約 1 L、約 2 L、約 3 L、約 4 L、約 5 L、約 6 L、約 7 L、約 8 L、約 9 L、及び約 10 L 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。

【1024】

いくつかの実施形態では、TIL は、G-R EX 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 から $10 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6$ 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-R EX フラスコ内の約 10 cm 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、サイトカインがボラスとして追加され得る。かかる容器、装置、及び方法は、当該技術分野で知られており、TIL を拡張するために使用されており、米国特許出願公開第 US 2014 / 0377739 A1 号、国際公開第 WO 2014 / 210036 A1 号、米国特許出願公開第 US 2013 / 0115617 A1 号、国際公開第 WO 2013 / 188427 A1、米国特許出願公開第 US 2011 / 0136228 A1、米国特許第 US 8,809,050 B2 号、国際公開第 WO 2011 / 072088 A2 号、米国特許出願公開第 US 2016 / 0208216 A1 号、米国特許出願公開第 US 2012 / 0244133 A1 号、国際公開第 WO 2012 / 129201 A1 号、米国特許出願公開第 US 2013 / 0102075 A1 号、米国特許第 US 8,956,860 B2 号、国際公開第 WO 2013 / 173835 A1 号、米国特許出願公開第 US 2015 / 0175966 A1 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。かかるプロセスも、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292 に記載されている。

【1025】

D. 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。

【1026】

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。

【1027】

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。

【1028】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張 T I L 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に示されるようなステップ A から取得された T I L 集団を含む、第 1 の拡張前のバルク T I L 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に示されるように、例えば、ステップ B で拡張された T I L 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 T I L 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 T I L 集団（例えば、本明細書に記載の第 2 の T I L 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 T I L 集団を含む、第 2 の拡張前のバルク T I L 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 T I L 集団（例えば、第 3 の T I L 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 T I L 集団を含む、第 2 の拡張後に起こる。

10

【1029】

いくつかの実施形態では、T I L 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、T s o n g , B i o p h y s . J . 1 9 9 1 , 6 0 , 2 9 7 - 3 0 6 及び米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 2 7 2 3 7 A 1 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、T I L 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、G r a h a m a n d v a n d e r E b , V i r o l o g y 1 9 7 3 , 5 2 , 4 5 6 - 4 6 7 、W i g l e r , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 1 9 7 9 , 7 6 , 1 3 7 3 - 1 3 7 6 、及び C h e n a n d O k a y a r e a , M o l . C e l l . B i o l . 1 9 8 7 , 7 , 2 7 4 5 - 2 7 5 2 、ならびに米国特許第 5 , 5 9 3 , 8 7 5 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、T I L 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 (D O T M A) 及びジオレイルホスホチジルエタノールアミン (D O P E) の 1 : 1 (w / w) リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、R o s e , e t a l . , B i o t e c h n i q u e s 1 9 9 1 , 1 0 , 5 2 0 - 5 2 5 及び F e l g n e r , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 9 8 7 , 8 4 , 7 4 1 3 - 7 4 1 7 、ならびに米国特許第 5 , 2 7 9 , 8 3 3 号、同第 5 , 9 0 8 , 6 3 5 号、同第 6 , 0 5 6 , 9 3 8 号、同第 6 , 1 1 0 , 4 9 0 号、同第 6 , 5 3 4 , 4 8 4 号、及び同第 7 , 6 8 7 , 0 7 0 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、T I L 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 , 7 6 6 , 9 0 2 号、同第 6 , 0 2 5 , 3 3 7 号、同第 6 , 4 1 0 , 5 1 7 号、同第 6 , 4 7 5 , 9 9 4 号、及び同第 7 , 1 8 9 , 7 0 5 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。

20

30

40

【1030】

いく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（

50

TSCM)の増加をもたらす。TSCMは、抗原を経験したセントラルメモリーT細胞の初期前駆細胞である。TSCMは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なTIL製品の生成に望ましいものである。TSCMは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のT細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いく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。

10

20

【1031】

いく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。

【1032】

いく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。

30

【1033】

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)、TGFB β 2、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、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、TGFB β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1 α)、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、TGFB β 2、CCR4/5、CTLA-4、CBLB(CBL-B)、CISH、CCR(キメラ共刺激受

40

50

容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、TGFB β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、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) からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGFB 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、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、CTLA-4を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CISHを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR (キメラ共刺激受容体) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-12を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-15を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-21を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、NOTCH1/2 ICDを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、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、TET2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、TGFB 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、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-1 α) 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

10

20

30

40

50

ク質キナーゼ A (PKA) を標的とする。

【1034】

いく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-1 α)、CCL4 (MIP1- β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22、及び／またはCCL17を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【1035】

いく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、CBLB、CISH、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TET2、TGFB β R2、及び／またはTGFB β の発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、TGFB β 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、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、CTLA-4の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、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。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM-3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、LAG-3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIGIT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、TET2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、TGFB β R2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、TGFB β の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【1036】

いく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。

【1037】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、及び／またはIL-21からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1038】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、NOTCH1/2 ICDの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、VHLの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD44の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PIK3CDの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、SOCS1の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1039】

。

いく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。

【1040】

いく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、TET2、CISH、TGFB β R2、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、TET2、CISH、TGFB β R2、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、TET2、CISH、TGFB β R2、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、CTLA-4、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT、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CTLA-4、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT、TET2、及びそれらの組み合わせのうちの1つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びCTLA-4の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及び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、PD-1及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びLAG3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びCISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びCBLBの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びTET2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、LAG3及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びTET2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、CISH及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CISH及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

タンパク質発現の一過性の変化は、C I S H及びT E T 2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、C B L B及びT I M 3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、C B L B及びT I G I T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、C B L B及びT E T 2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、T I M 3及びP D - 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、T I M 3及びL A G 3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、T I M 3及びC I S H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、T I M 3及びC B L 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、T I M 3及びT I G I T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、T I M 3及びT E T 2の発現の低下及び／または減少をもたらす。

10

【1041】

いくつかの実施形態では、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、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T I L集団、第2のT I L集団、または採取されたT I L集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

20

【1042】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、T E T 2、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、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C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、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、P D - 1、C T L A - 4、L A G 3、T I M 3、C I S H、C B L B、T I G I T、T E T 2、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C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、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。

30

【1043】

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。

40

【1044】

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

50

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。

【1045】

いく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す(これらは、米国特許出願公開第US2019/0093073 A1号、同第US2018/0201889 A1号、及び同第US2019/0017072 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)。かかる方法は、TIL集団を、転写因子(TF)及び／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該TF及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはTIL集団における腫瘍抗原特異的T細胞の数の増加をもたらす、それ故に、TIL集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないTIL集団と比較して再プログラミングされたTIL集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、TIL開始集団またはTIL前集団(すなわち、再プログラミング前の)集団と比較して、エフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞の亜集団の増加をもたらす。

【1046】

いくつかの実施形態では、転写因子(TF)には、TCF-1、NOTCH1/2 ICD、及び／またはMYBが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)は、TCF-1である。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)は、NOTCH1/2 ICDである。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)は、MYBである。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)は、さらなるTIL再プログラミングを誘導するために、市販のKNOCKOUT Serum Replacement(Gibco/ThermoFisher)などの誘導多能性幹細胞培養物(iPSC)とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)は、さらなるTIL再プログラミングを誘導するために、iPSCカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)は、iPSCカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、TSCMのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、TSCMのパーセンテージの約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95% TSCMの増加をもたらす。

【1047】

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産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、TIL集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を遺伝子修飾することを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾

する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77、Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. Ther. 2013, 15, 871-75-及び1997, 15, 871-75、Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71、及び米国特許第6,627,442号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、DNA発現ベクターとしてまたは発現可能なRNAもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、mRNA（例えば、キャップ及びポリA尾部を含むmRNA）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。SB10、SB11、及びSB100xなどのサケ科型Tel様トランスポザーゼ（SBまたはSleeping Beautyトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Hackett, et al., Mol. Therapy 2010, 18, 674-83及び米国特許第6,489,458号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【1048】

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。

【1049】

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媒体を必要としない。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US2016/0304873 A1号、同第US2019/0211337 A1号、同第US2019/0048341 A1号、及び同第US2019/0048341 A1号、ならびに米国特許第10,633,654号及び同第10,913,948 B2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、配列の好み等を最適化

30

40

50

するために、*s d R N A*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*s d R N A*配列は、一般に、 $1\mu\text{M}$ 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。

【1050】

二本鎖RNA (*d s R N A*) 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。*s i R N A*とは対照的に、*d s R N A*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*d s R N A*分子から放出される*s i R N A*分子の配列を含む前駆体分子を指す。

【1051】

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-OC₂H₅) を有する化学的に合成された非対称*s i R N A*二本鎖である、自己送達RNA干渉 (*s d R N A*) の使用を含む。*s i R N A*及び*s d R N A*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、*s i R N A*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*s d R N A*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 $1\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ の濃度で*s d R N A*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 $1\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ の濃度の*s d R N A*に1~3日間曝露することを含む、TIL集団への*s i R N A*または*s d R N A*の送達を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団への*s d R N A*の送達は、TIL集団が培地中 $10\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ の濃度で*s d R N A*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*s d R N A*の送達は、TIL集団が培地中 $50\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ の濃度で*s d R N A*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*s d R N A*の送達は、TIL集団が培地中 $0.1\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ ~ $50\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ の濃度で*s d R N A*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*s d R N A*の送達は、TIL集団が培地中 $0.1\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ ~ $50\mu\text{M}/10,000\text{TIL}$ の濃度で*s d R N A*に曝露される1~3日の期間を使用して達成され、*s d R N A*への曝露は、培地に新鮮な*s d R N A*を添加することによって2、3、4、または5回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第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。

【1052】

いくつかの実施形態では、*s i R N A*または*s d R N A*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、*s d R N A*は、NOTCH1/2 ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFB β 、TGFB β 2、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

10

20

30

40

50

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 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 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。

10

【1053】

s i R N A の化学修飾に基づく自己送達可能な R N A i 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、s d R N A を T I L に首尾よく送達することができる。非対称 s i R N A 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、L i g t e n b e r g , e t a l . M o l . T h e r a p y , 2018, 26, 1482-93 及び米国特許出願公開第 2016 / 0304873 A1（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、s d R N A のヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単に添加することによって、追加の製剤及び方法なしに、s d R N A が培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性により、単に培地中の s d R N A 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 R N A i を介した減少を支援することができる。理論に拘束されることはないが、s d R N A の骨格安定化は、非分裂細胞で数ヶ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

20

【1054】

いくつかの実施形態では、T I L 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 s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A は、R N A i 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、T I L の s i R N A または s d R N A 処理後 10 日以上で低下する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の 70 % を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の 70 % を超える減少が維持される T I L。いくつかの実施形態では、P D - 1 / P D - L 1 経路における発現の減少により、T I L 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、P D - 1 / P D - L 1 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、s i R N A または s d R N A による P D - 1 の発現の減少は、T I L 増殖の増加をもたらす。

30

40

【1055】

いくつかの実施形態では、本発明で使用される s d R N A 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 s d R N A 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 s d R N A 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 s d R N A 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 s d R N A 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 s d R N A 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 s d R N A 配列は、標的遺伝子の発現の 99 % の減

50

少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される s d R N A 配列は、約 0 . 2 5 μ M ~ 約 4 μ M 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 s d R N A 配列は、約 0 . 2 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 0 . 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 0 . 7 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 1 . 0 μ M 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 s d R N A 配列は、約 1 . 2 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 1 . 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 1 . 7 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 2 . 0 μ M 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 s d R N A 配列は、約 2 . 2 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 2 . 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 2 . 7 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 3 . 0 μ M 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 s d R N A 配列は、約 3 . 2 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 3 . 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 3 . 7 5 μ M 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 s d R N A 配列は、約 4 . 0 μ M 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。

10

20

30

40

50

【1056】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための1つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、2'-O-メチル修飾、2'-O-フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、2'-F修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾、及び／または2'-デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンD、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む1つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。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'-O-エチルを含む）、すなわち、2'-アルコキシ、2'-アミノ、2'-S-アルキル、2'-ハロ（2'-フルオロを含む）、T-メトキシエトキシ、2'-アリルオキシ（-OCH₂CH=CH₂）、2'-プロパルギル、2'-プロピル、エチニル、エテニル、プロベニル、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., Nuc l. A c i d s. R e s. 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。

【1057】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、2つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第1の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第2の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【1058】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A 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。

【1059】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 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（ $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ）、グリコール（ $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）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。

【1060】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 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。

【1061】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、s i R N A または s d R N A 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、または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。

【1062】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 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（R I S C 負荷後に廃棄される分子の一部）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明の s i R N A または s d R N A 化合物は、二重鎖領域（10～15塩基長の効率的な R I S C 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、s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A 化合物は、安定性を提供し、かつ R I S C 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、R I S C 侵入に干渉することなく安定性を確認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。

10

【1063】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 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、s i R N A または s d R N A 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、s i R N A または s d R N A のヌクレオチドの100%が修飾されている。

20

【1064】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 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。

30

40

【1065】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A 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、s i R N A または s d R N A は、12時間以上の培地中での半減期を有する。

【1066】

50

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'-O-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。

10

【1067】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ18～19ヌクレオチド長であり、およそ2～14個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個、または14個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、RISCの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する1つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、3'末端にあるか、5'末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の3'末端10ヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る2'-F及び／または2'-OMe修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の1位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も5'側のヌクレオチド)は、2'-OMe修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のC及びUヌクレオチドは、2'-F修飾されていてもよい。例えば、19ntガイド鎖の2～10位(または異なる長さのガイド鎖における対応する位置)のC及びUヌクレオチドは、2'-F修飾されていてもよい。ガイド鎖内のC及びUヌクレオチドは、2'-OMe修飾されている場合もある。例えば、19ntガイド鎖の11～18位(または異なる長さのガイド鎖における対応する位置)のC及びUヌクレオチドは、2'-OMe修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も3'側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のC及びUの大部分は2'-F修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の実施形態では、1位及び11～18位のCまたはUは2'-OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置1及び位置11～18のCsまたはUs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。

20

30

【1068】

自己送達可能なRNAi技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくRNAi剤(*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*法により、化学合成された化合物をエクスピボ及びインビボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載の*sdRNA*は、Advirna LLC(Worcester, MA, USA)から市販されている。

40

【1069】

*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得、例えば、Byrne, et al., J. Ocular Pharmacol. Therapeut., 2013, 29, 855

50

－ 8 6 4（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。

【1070】

いくつかの実施形態では、*s i R N A*または*s d R N A*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*T I L*に送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、*s i R N A*または*s d R N A*オリゴヌクレオチドを送達するために*T I L*集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【1071】

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*R N A i*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、*T I L*の集団に*s i R N A*または*s d R N A*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。

【1072】

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*T I L*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）、*T I L*によって取り込まれる（*T I L*による受動的取り込みを含む）。*s d R N A*は、第1の拡張中（例えば、ステップB）、第1の拡張後（例えば、ステップC中）、第2の拡張前または拡張中（例えば、ステップDの前またはステップD中）、ステップD後及びステップEにおける採取前、ステップFにおける採取中または採取後、ステップFにおける最終製剤化及び／または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップFにおける任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載の*T I L*に添加され得る。さらに、*s d R N A*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、CTLA-4、TIGIT、TET2及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上の*s d R N A*標的遺伝子が、100 nM～20 mM、200 nM～10 mM、500 nM～1 mM、1 μ M～100 μ M、及び1 μ M～100 μ Mからなる群から選択される濃度で*T I L*及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上の*s d R N A*標的遺伝子は、0.1 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、0.5 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、0.75 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、1 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、1.25 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、1.5 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、2 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、5 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地、または10 μ M *s d R N A* / 10, 000 *T I L* / 100 μ L 培地からなる群から選択される量で*T I L*及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上の*s d R N A*標的遺伝子は、REP前段階またはREP段階中に1日2回、1日1回、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、または7日毎に*T I L*培養物に添加され得る。

【1073】

*s d R N A*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*s d R N A*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*T I L*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、*T I L*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、*s d R N A*を細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地を*T I L*集団と接触させることとを含む。*T I L*は、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団、及び／

10

20

30

40

50

または第3の集団であり得る。

【1074】

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)に記載される方法を使用して、カチオン性、アニオン性、もしくは中性脂質組成物またはリポソームを使用して増強され得る。

10

【1075】

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、CTLA-4、TIGIT、TET2 及び／または CISH を標的とする siRNA または sdRNA のうちの1つ以上と一緒に使用される。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、CTLA-4、TIGIT、TET2 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、CTLA-4、TIGIT、TET2 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。

20

【1076】

いくつかの実施形態では、siRNA または sdRNA は、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、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、TET2、CISH、TGFB β R2、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、TET2、CISH、TGFB β R2、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、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、PD-1 を標的とし、1つの siRNA または sdRNA は、TIM3 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

30

40

50

、CTLA-4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、TIGIT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、TET2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、LAG3を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3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、CTLA-4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、TIGIT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、TET2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、CISHを標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3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、CTLA-4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、TIGIT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、TET2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、CBLBを標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIM3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、CBLBを標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、CTLA-4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、CBLBを標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIGIT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、CBLBを標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TET2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。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、CTLA-4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、TIGIT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、TET2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、CTLA-4を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TIGIT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、CTLA-4を標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TET2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、TIGITを標的とし、1つのsiRNAまたはsdRNAは、TET2を標的とする。

10

20

30

40

【1077】

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

50

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を治療用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。

10

【1078】

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産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306及び米国特許出願公開第2014/0227237A1号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第5,019,034号、同第5,128,257号、同第5,137,817号、同第5,173,158号、同第5,232,856号、同第5,273,525号、同第5,304,120号、同第5,318,514号、同第6,010,613号、及び同第6,078,490号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：（1）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、（2）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び（3）少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更

20

30

40

50

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、 100 V/cm 以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、 100 V/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 Okayama, *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)及びジオレイルホスホチジルエタノールアミン(DOPE)の1:1(w/w)リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Rose, et al., *Biotechniques* 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413-7417、ならびに米国特許第5,279,833号、同第5,908,635号、同第6,056,938号、同第6,110,490号、同第6,534,484号、及び同第7,687,070号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第5,766,902号、同第6,025,337号、同第6,410,517号、同第6,475,994号、及び同第7,189,705号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。TILは、本明細書に記載のTILの第1の集団、第2の集団、及び／または第3の集団であり得る。

【1079】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のDNA配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。DNAの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合(NHEJ)または相同指向修復(HDR)のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する(例えば、サイレンス、抑制、または増強する)挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【1080】

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、ジंक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。

【1081】

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、TALEN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US2020/0299644 A1号及び同第US2020/0121719 A1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、TALEN法、またはZFN法のうちの1つ以上によって、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたTILは、インビトロでそれらを修飾されていないTILと比較することによって、例えば、修飾されていないTILと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、CRISPR法、TALEN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。

【1082】

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 (BIO RAD)、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。

【1083】

TILを治療用集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Gen2）に従って、または米国特許出願公開第US2020/0299644 A1号及び同第US2020/0121719 A1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）に記載されているように実施することができ、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、治療的TIL集団の少なく

とも一部分においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、T I L 拡張プロセス中の C R I S P R 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 T I L 集団の少なくとも一部分において増強させる。

【1084】

C R I S P R は、c l u s t e r e d r e g u l a r l y i n t e r s p a c e d s h o r t p a l i n d r o m i c r e p e a t s (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 C R I S P R システムを使用する方法は、本明細書では C R I S P R 法とも称される。RNA 及び C a s 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 C R I S P R システムには、3つの型：I 型、I I 型、及び I I I 型がある。I I 型 C R I S P R (C a s 9 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。

10

【1085】

C R I S P R 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、C R I S P R 由来の RNA 及び C a s 9 を含む様々な C a s 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。C R I S P R 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、C R I S P R 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。I I 型 C R I S P R / C a s システムでは、スペーサーは、C R I S P R ゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短い C R I S P R RNA (c r RNA) に処理される。これらの c r RNA は、トランス活性化 c r RNA (t r a c r RNA) にアニーリングし、C a s 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。C a s 9 タンパク質による標的認識には、c r RNA 内の「シード」配列、及び c r RNA 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 (P A M) 配列が必要である。これにより、C R I S P R / C a s システムが再標的されて、c r RNA 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 c r RNA 及び t r a c r RNA 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 (s g RNA) に簡略化され得る。C R I S P R / C a s システムは、C a s 9 エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要な c r RNA 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。C a s タンパク質の異なるバリエーション (例えば、C p f 1 などの C a s 9 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。

20

30

【1086】

C R I S P R 法により T I L 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、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 (T I M - 3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、T E T 2、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及び B C O R が含まれる。

40

【1087】

C R I S P R 法により T I L 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、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及び I L - 2 1 が含まれる。

【1088】

50

C R I S P R 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, 6 9 7, 3 5 9 号、同第 8, 9 9 3, 2 3 3 号、同第 8, 7 9 5, 9 6 5 号、同第 8, 7 7 1, 9 4 5 号、同第 8, 8 8 9, 3 5 6 号、同第 8, 8 6 5, 4 0 6 号、同第 8, 9 9 9, 6 4 1 号、同第 8, 9 4 5, 8 3 9 号、同第 8, 9 3 2, 8 1 4 号、同第 8, 8 7 1, 4 4 5 号、同第 8, 9 0 6, 6 1 6 号、及び同第 8, 8 9 5, 3 0 8 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。C R I S P R / C a s 9 及び C R I S P R / C p f 1 を発現するためのプラスミドなどの C R I S P R 法を行うための資源は、G e n S c r i p t などの企業から市販されている。

【1089】

10

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 集団の遺伝子修飾は、米国特許第 U S 9 7 9 0 4 9 0 号に記載されている C R I S P R / C p f 1 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。

【1090】

T I L 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、G e n 2）に従って、または米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 2 9 9 6 4 4 A 1 号及び同第 U S 2 0 2 0 / 0 1 2 1 7 1 9 A 1 号、ならびに米国特許第 1 0, 9 2 5, 9 0 0 号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、T A L E 法によって T I L 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、T I L 拡張プロセス中の T A L E 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 T I L 集団の少なくとも一部分においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、T I L 拡張プロセス中の T A L E 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 T I L 集団の少なくとも一部分において増強させる。

20

【1091】

T A L E は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）を含む、転写活性化因子様エフェクタータンパク質を表す。遺伝子編集のために T A L E システムを使用する方法は、本明細書では T A L E 法とも称され得る。T A L E は、植物病原菌 X a n t h o m o n a s 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 3 3 ~ 3 5 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。T A L E 特異性は、反復可変二残基（R V D）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 T A L E 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 R V D 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。T A L E の DNA 結合ドメインは、I I S 型 F o k I 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 T A L E 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、1 4 ~ 2 0 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 T A L E N アームが F o k I 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。

30

【1092】

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、T A L E 反復配列を組み合わせ、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計された T A L E アレイも、C e l l e c t i s B i o r e s e a r c h (P a r i s, F r a n c e)、T r a n s p o s a g e n B i o p h a r m a c e u t i c a l s (L e x i n g t o n, K Y, U S A)、及び L i f e T e c h n o l o g i e s (G r a n d I s l a n d, N Y, U S A) から市販されている。本発明での使用に好適な T A L E 法及び T A L E N 法は、米国特許公開第 U S 2 0 1 1 / 0 2 0 1 1 1 8 A 1 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 1 1 7 8 6 9 A 1 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 3 1 5 8 8 4 A 1 号、同第 U S 2 0 1 5 / 0 2 0 3 8 7 1 A 1 号、及び同第 U S 2 0 1 6 / 0 1 2 0 9 0 6 A 1 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。

40

50

【1093】

T A L E 法によりT I L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、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 (T I M - 3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、T E T 2、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及びB C O Rが含まれる。

10

【1094】

T A L E 法によりT I L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、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1が含まれる。

【1095】

T A L E 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。

20

【1096】

T I L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US2020/0299644 A1号及び同第US2020/0121719 A1号、ならびに米国特許第10,925,900号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、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T I L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、T I L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T I L集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、T I L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T I L集団の少なくとも一部において増強させる。

30

【1097】

個々のジンクフィンガーは、保存された $\beta\beta\alpha$ 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D N Aの主溝の3 b p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、D N A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、F o k I制限酵素を含み、D N Aの触媒的切断を担っている。

【1098】

個々のZ F NのD N A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Z F N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D N A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、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(O P E N)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

40

50

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、S a n g a m o B i o s c i e n c e s (R i c h m o n d , C A , U S A) 及び S i g m a - A l d r i c h (S t . L o u i s , M O , U S A) から市販されている。

【1099】

ジンクフィンガー法によりT I L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、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 (T I M - 3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、T E T 2、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及びB C O Rが含まれる。

10

【1100】

ジンクフィンガー法によりT I L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、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1が含まれる。

20

【1101】

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。

30

【1102】

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, et al., Mol. Therapy, 2015, 23 1380-1390に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1103】

いくつかの実施形態では、T I Lは、高親和性T C R、例えば、M A G E - 1、H E R 2、もしくはN Y - E S O - 1などの腫瘍関連抗原で標的とされるT C R、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、C D 1 9）に結合するキメラ抗原受容体（C A R）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T C R、例えば、M A G E - 1、H E R 2、もしくはN Y - E S O - 1などの腫瘍関連抗原で標的とされるT C R、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、C D 1 9）に結合するキメラ抗原受容体（C A R）を含むようにT I L集団を遺伝子操作することを含む。適切には、T I L集団は、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団及び／または第3の集団であり得る。

40

【1104】

E. T I L製造のための閉鎖系

本発明は、T I L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。

50

【1105】

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。

【1106】

滅菌接続装置（STCD）は、互換性のある2本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、TILは、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

10

【1107】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、TILを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、1つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、第1の容器は密閉G容器であり、TIL集団が遠心分離され、第1の密閉G容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、注入バッグは、HypoThermosoil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。

20

【1108】

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。

30

【1109】

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。

【1110】

さらに、TIL細胞培養環境のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、TIL増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、閉鎖環境の培養液中のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖細胞培養系を提供する。

40

【1111】

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

50

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。

【1112】

いくつかの実施形態では、TILの増殖に最適な培養成分を置換または追加することができ、IL-2及び／またはOKT3などの因子、ならびに組み合わせを追加することができる。

【1113】

F. 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8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）の例示的なステップFにおいてTILに起こる。いくつかの実施形態では、TILは、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含有する。これは、一般に、TIL集団を凍結溶液、例えば、85%補体不活性化AB血清及び15%ジメチルスルホキシド（DMSO）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、-80℃で24時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。

【1114】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ5分の4が解凍されるまで37℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で1回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたTILは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【1115】

いくつかの実施形態では、TIL集団は、CS10凍結保存培地（CryoStor 10、BioLife Solutions）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL集団は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL集団は、1:1（体積：体積）比のCS10及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約1:1（体積：体積）比のCS10及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加のIL-2をさらに含む。

【1116】

上で考察されたように、また図1及び／または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されるステップA～Eで例示されるように、凍結保存は、TIL拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第1の拡張後のTILの拡張集団（例えば、ステップBに従って提供される、または図1もしくは8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）のステップDによる1回以上の拡張後の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、T I L は、5 % D M S O 中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、T I L は、5 % D M S O を加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、T I L は、実施例 6 に提供される方法に従って凍結保存される。

【1117】

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 °C の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で 1 回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍された T I L 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。

【1118】

場合によっては、図 1 または 8 からのステップ B（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）T I L 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 T I L 集団を、図 1 または 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 T I L が治療法に使用される場合、図 1 または 8 からのステップ B またはステップ D（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 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。

【1119】

G. 拡張 T I L の表現型特徴

いくつかの実施形態では、T I L 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、T I L の表現型特徴は、図 1 または 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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、T I L の表現型特徴は、図 1 または 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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、T I L の表現型特徴は、図 1 または 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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、T I L の表現型特徴は、図 1 または 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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、T I L の表現型特徴は、図 1 または 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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。

【1120】

いくつかの実施形態では、マーカーは、C D 8 及び C D 2 8 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、C D 8 の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、C D 2 8 の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、C D 8 及び／または C D 2 8 の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に提供される G e n 3 プロセス）と比較して、例えば図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に提供される 2 A 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 T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、C D 8 の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図 8（特に、例えば図 8 B）に提供される G e n 3 プロセス）と比較して、例えば図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、C D 2 8 の発現は、他のプロセス（例えば、例えば図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）に

提供される Gen 3 プロセス)と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A)に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、高い C D 2 8 発現は、より若く、より持続的な T I L 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。

【1121】

いくつかの実施形態では、C D 8 及び／または C D 2 8 に基づく第 1 の T I L 集団、第 2 の T I L 集団、第 3 の T I L 集団、または採取された T I L 集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) 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。

【1122】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に提供される Gen 3 プロセス)と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A)に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生された T I L 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、C C R 7 及び C D 6 2 L からなる群から選択される。

【1123】

いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L 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、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、ナイーブ (C D 4 5 R A + C D 6 2 L +) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、セントラルメモリー (C M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L +) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、エフェクターメモリー (E M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L -) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、R A + エフェクターメモリー／エフェクター (T E M R A / T E F F、C D 4 5 R A + C D 6 2 L +) T I L を含む。

【1124】

いくつかの実施形態では、T I L 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、T I L は、グランザイム B を発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、グラニュライシンを発現する。

【1125】

いくつかの実施形態では、再刺激された T I L 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、T I L は、インターフェロンガンマ (I F N - γ) 分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、例えば、図 8 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) に提供されるように、ステップ D の後の急速な第 2 の拡張ステップの後の E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、T I L の健康は、I F N - ガンマ (I F N - γ) 分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、活性な T I L を示す。いくつかの実施形態では、I F N - γ 産生の効力アッセイが用いられる。I F N - γ 産生は、細胞傷害能の別の尺度である。I F N - γ 産生は、C D 3、C D 2 8、及び C D 1 3 7 / 4 - 1 B B に対する抗体で刺激された T I L の培地中のサイトカイン I F N - 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 T I L からの培地中の I F N - γ レベルは、I F N - 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D) T I L に提供されるような Gen 3 プロセスのステップ D における I F N - γ 産生の増加は、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A) に提供される 2 A プロセスのステップ D と比較して、ステップ D T I L 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、I F N - γ 分泌

10

20

30

40

50

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、エクスピボでの 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 8 B の方法を含む、本発明の方法によって産生された TIL を含む、TIL においてエクスピボで測定される。

【1126】

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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 倍多くの IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 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 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 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。

【1127】

いくつかの実施形態では、少なくとも 100 pg/mL ～ 約 1000 pg/mL 以上の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 200 pg/mL、少なくとも 250 pg/mL、少なくとも 300 pg/mL、少なくとも 350 pg/mL、少なくとも 400 pg/mL、少なくとも 450 pg/mL、少なくとも 500 pg/mL、少なくとも 550 pg/mL、少なくとも 600 pg/mL、少なくとも 650 pg/mL、少なくとも 700 pg/mL、少なくとも 750 pg/mL、少なくとも 800 pg/mL、少なくとも 850 pg/mL、少なくとも 900 pg/mL、少なくとも 950 pg/mL、または少なくとも 1000 pg/mL 以上の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 200 pg/mL の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 200 pg/mL の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 300 pg/mL の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 400 pg/mL の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 500 pg/mL の IFN- γ 分泌が

10

20

30

40

50

50

10

20

30

40

50

50

ば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された T I L である。いくつかの実施形態では、少なくとも 50,000 p g / m L / 5 e 5 細胞の I F N - γ 分泌が可能な T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された T I L である。

【1129】

T リンパ球及び B リンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（接合）、及び C（一定）は、免疫グロブリン及び T 細胞受容体（T C R）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 T I L 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 T I L 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 T I L は、新たに採取された T I L 及び／または例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D）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 T I L 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 T I L は、新たに採取された T I L 及び／または図 8（特に、例えば図 8 A）に例示されるように G e n 2 と称される方法を使用して調製された T I L 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 T I L 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（T C R）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（T C R）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（T C R）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T C R α β（すなわち、T C R α / 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、G e n 3 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 C D R の数に基づく G e n 2 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。

【1130】

いくつかの実施形態では、T I L 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、C D 3、P D - 1、2 B 4 / C D 2 4 4、C D 8、C D 2 5、B T L A、K L R G、T I M - 3、C D 1 9 4 / C C R 4、C D 4、T I G I T、C D 1 8 3、C D 6 9、C D 9 5、C D 1 2 7、C D 1 0 3、及び／または L A G - 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、B T L A、C T L A - 4、I C O S、K i 6 7、L A G - 3、P D - 1、T I G I T、及び／または T I M - 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、B T L A、C T L A - 4、I C O S、K i 6 7、L A G - 3、C D 1 0 3 + / C D 6 9 +、C D 1 0 3 + / C D 6 9 -、P D - 1、T I G I T 及び／または T I M - 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、T I G I T、C D 3、F o x P 3、T i

m-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。

【1131】

いくつかの実施形態では、 $3000\text{ pg}/10^6\text{ TIL} \sim 300000\text{ pg}/10^6\text{ TIL}$ 以上のグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $3000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $5000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $7000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $9000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $11000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $13000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $15000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $17000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $19000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $20000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $40000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $60000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $80000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $100000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $120000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $140000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $160000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $180000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $200000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $220000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $240000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $260000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $280000\text{ pg}/10^6$ 超のTIL、 $300000\text{ pg}/10^6$ 以上のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $3000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $5000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $7000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $9000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $11000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $13000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $15000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $17000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $19000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $20000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $40000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌を示すTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dを含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、 $60000\text{ pg}/10^6$ 超のTILグランザイムB分泌

10

20

30

40

50

50

10

20

30

40

50

50

図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D を含む、本発明の拡張方法によって産生された T I L である。

【 1 1 3 3 】

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 T I L 集団と比較して、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D に提供されるような T I L 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 T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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、I F N - γ 分泌は、拡張されていない T I L 集団と比較して、1 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 20 倍、少なくとも 30 倍、少なくとも 40 倍、少なくとも 50 倍以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 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 T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 50 倍増加する。

【 1 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、I F N - 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 T N F - α (すなわち、T N F - アルファ) 分泌が可能な T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された T I L である。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌と比較して、少なくとも 1 倍低いレベルの T N F - α 分泌が可能な T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された T I L である。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌と比較して、少なくとも 2 倍低いレベルの T N F - α 分泌が可能な T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された T I L である。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌と比較して、少なくとも 3 倍低いレベルの T N F - α 分泌が可能な T I L は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方

法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも4倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも5倍低いレベルのTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。

【1135】

いくつかの実施形態では、少なくとも200 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α （すなわち、TNF-アルファ）分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも500 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも1000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも2000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも3000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも4000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも5000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも6000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも7000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも8000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも9000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF- α 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。

【1136】

いくつかの実施形態では、IFN- γ 及びグランザイムBのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8Dの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態で

10

20

30

40

50

は、 $IFN-\gamma$ 及び $TNF-\alpha$ のレベルを測定して、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって產生された TIL の表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイム B 及び $TNF-\alpha$ のレベルを測定して、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって產生された TIL の表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、 $IFN-\gamma$ 、グランザイム B 及び $TNF-\alpha$ のレベルを測定して、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D の方法を含む、本発明の拡張方法によって產生された TIL の表現型特徴を決定する。

【1137】

いくつかの実施形態では、表現型特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【1138】

H. 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 集団を產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 集団を產生することと、(d) ステップ (c) から取得された治療的 TIL 集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第 2 の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の TIL 集団を、第 1 の容器、例えば、G-R EX-100 MCS 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-R EX-500 MCS 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-R EX-100 MCS 容器内での第 1 の小規模培養で約 3～4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(2) 第 1 の小規模培養由来の第 2 の TIL 集団を、第 1 の容器とサイズが等しい少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の第 2 の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第 2 の容器内で、第 1 の小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 2 の TIL 集団の一部が、第 2 の小規模培養で約 4～7 日間、または約 4～8 日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の TIL 集団を、第 1 の容器、例えば、G-R EX-100 MCS 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-R EX-500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第 2 の容器内で、小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 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

10

20

30

40

50

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-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、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。

【1139】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、(b) IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行うことであって、プライミングによる第1の拡張が約1～8日間行われて第2のTIL集団が取得され、第2のTIL集団は第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、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-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S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-R E X-100 M C S容器内での第1の小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～6日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S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-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S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

10

20

30

40

50

約 4 ～ 5 日間培養される。

【 1 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的 TIL 集団に拡張するための方法であって、（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得することと、（b）IL-2 及び OKT-3 を含む細胞培養培地中で第 1 の TIL 集団を培養することによってプライミングによる第 1 の拡張を行うことであって、プライミングによる第 1 の拡張が約 1 ～ 7 日間行われて第 2 の TIL 集団が取得され、第 2 の TIL 集団は第 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 集団が取得され、第 3 の TIL 集団が治療的 TIL 集団である、第 3 の TIL 集団を産生することと、（d）ステップ（c）から取得された治療的 TIL 集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第 2 の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第 2 の TIL 集団を、第 1 の容器、例えば、G-Rex-100 MCS 容器内での小規模培養で約 3 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、（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-500 MCS 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-100 MCS 容器内での第 1 の小規模培養で約 3 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、（2）第 1 の小規模培養由来の第 2 の TIL 集団を、第 1 の容器とサイズが等しい少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の第 2 の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第 2 の容器内で、第 1 の小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 2 の TIL 集団の一部が、第 2 の小規模培養で約 4 ～ 7 日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第 2 の TIL 集団を、第 1 の容器、例えば、G-Rex-100 MCS 容器内での小規模培養で約 3 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、（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-500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第 2 の容器内で、小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 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-100 MCS 容器内での小規模培養で約 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、（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-g 500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第 2 の容器内で、小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 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。

【 1 1 4 1 】

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 A P C の数よりも多い、方法を提供する。

【 1 1 4 2 】

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 A P C 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。

【 1 1 4 3 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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 0 : 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。

10

【 1 1 4 4 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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 1 0 : 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。

【 1 1 4 5 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

20

【 1 1 4 6 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

【 1 1 4 7 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

30

【 1 1 4 8 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

【 1 1 4 9 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

40

【 1 1 5 0 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

【 1 1 5 1 】

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 A P C の数の、ステップ（b）において追加される A P C 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。

50

【1152】

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。

【1153】

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。

10

【1154】

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。

【1155】

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。

20

【1156】

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。

【1157】

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。

30

【1158】

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。

【1159】

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。

40

【1160】

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。

【1161】

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。

50

【1162】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約10:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1163】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約5:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1164】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約4:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1165】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約3:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1166】

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。

【1167】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.8:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1168】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.7:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1169】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.6:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1170】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.5:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1171】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.4:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1172】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.3:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1173】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.2:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1174】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.1:1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1175】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ(b)において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2:1になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1176】

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。

20

【1177】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 APCになるように、かつ急速な第2の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 3.5×10^8 、 3.6×10^8 、 3.7×10^8 、 3.8×10^8 、 3.9×10^8 、 4×10^8 、 4.1×10^8 、 4.2×10^8 、 4.3×10^8 、 4.4×10^8 、 4.5×10^8 、 4.6×10^8 、 4.7×10^8 、 4.8×10^8 、 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

30

40

50

、または 1×10^9 APC になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1178】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加される APC の数が、正確にまたは約 1×10^8 APC ~ 正確にまたは約 3.5×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第2の拡張において追加される APC の数が、正確にまたは約 3.5×10^8 APC ~ 正確にまたは約 1×10^9 APC の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1179】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加される APC の数が、正確にまたは約 1.5×10^8 APC ~ 正確にまたは約 3×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第2の拡張において追加される APC の数が、正確にまたは約 4×10^8 APC ~ 正確にまたは約 7.5×10^8 APC の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1180】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加される APC の数が、正確にまたは約 2×10^8 APC ~ 正確にまたは約 2.5×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第2の拡張において追加される APC の数が、正確にまたは約 4.5×10^8 APC ~ 正確にまたは約 5.5×10^8 APC の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1181】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約 2.5×10^8 APC が一次の第1の拡張に追加され、かつ正確にまたは約 5×10^8 APC が急速な第2の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。

【1182】

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。

【1183】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々内で、第1の TIL 集団がステップ (a) において取得され、第2の TIL 集団がステップ (b) において取得され、第3の TIL 集団がステップ (c) において取得され、ステップ (c) における複数の容器からの治療的 TIL 集団が組み合わせられて、ステップ (d) からの採取された TIL 集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1184】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1185】

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。

【1186】

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。

【1187】

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。

【1188】

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。

【1189】

10

20

30

40

50

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。

【1190】

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。

【1191】

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。

10

【1192】

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。

【1193】

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。

【1194】

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。

20

【1195】

他の実施形態では、ステップ(b)において、一次の第1の拡張が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞(APC)を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【1196】

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。

30

【1197】

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。

【1198】

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、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、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。

40

【1199】

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。

【1200】

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

50

ように修正された、上記の該当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】

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。

【1202】

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。

10

【1203】

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。

【1204】

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。

20

【1205】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【1206】

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。

30

【1207】

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。

【1208】

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。

40

【1209】

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。

【1210】

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

50

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。

【1 2 1 1】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P C 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。

【1 2 1 2】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P C 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。

【1 2 1 3】

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。

【1 2 1 4】

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 T I L 集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（A P C）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 A P C の数が、ステップ（b）において追加される A P C の数よりも多く、ステップ（b）において、A P C が、正確にまたは約 1 細胞層～正確にまたは約 3 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【1 2 1 5】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、A P C 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。

【1 2 1 6】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、A P C 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。

【1 2 1 7】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、A P C 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。

【1 2 1 8】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P C 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。

【1 2 1 9】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P C 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。

【1220】

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。

【1221】

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。

10

【1222】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：10の範囲から選択される、方法を提供する。

20

【1223】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：9の範囲から選択される、方法を提供する。

【1224】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：8の範囲から選択される、方法を提供する。

30

【1225】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：7の範囲から選択される、方法を提供する。

40

【1226】

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

50

の数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：6の範囲から選択される、方法を提供する。

【1227】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：5の範囲から選択される、方法を提供する。

10

【1228】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：4の範囲から選択される、方法を提供する。

20

【1229】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：3の範囲から選択される、方法を提供する。

【1230】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：2の範囲から選択される、方法を提供する。

30

【1231】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.2～正確にまたは約1：8の範囲から選択される、方法を提供する。

40

【1232】

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.

50

3～正確にまたは約1：7の範囲から選択される、方法を提供する。

【1233】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.4～正確にまたは約1：6の範囲から選択される、方法を提供する。

【1234】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.5～正確にまたは約1：5の範囲から選択される、方法を提供する。

【1235】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.6～正確にまたは約1：4の範囲から選択される、方法を提供する。

【1236】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.7～正確にまたは約1：3.5の範囲から選択される、方法を提供する。

【1237】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.8～正確にまたは約1：3の範囲から選択される、方法を提供する。

【1238】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.9～正確にまたは約1：2.5の範囲から選択される、方法を提供する。

【1239】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：2の範囲から選択される、方法を提供する。

【1240】

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を追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.1、1：2.2、1：2.3、1：2.4、1：2.5、1：2.6、1：2.7、1：2.8、1：2.9、1：3、1：3.1、1：3.2、1：3.3、1：3.4、1：3.5、1：3.6、1：3.7、1：3.8、1：3.9、1：4、1：4.1、1：4.2、1：4.3、1：4.4、1：4.5、1：4.6、1：4.7、1：4.8、1：4.9、1：5、1：5.1、1：5.2、1：5.3、1：5.4、1：5.5、1：5.6、1：5.7、1：5.8、1：5.9、1：6、1：6.1、1：6.2、1：6.3、1：6.4、1：6.5、1：6.6、1：6.7、1：6.8、1：6.9、1：7、1：7.1、1：7.2、1：7.3、1：7.4、1：7.5、1：7.6、1：7.7、1：7.8、1：7.9、1：8、1：8.1、1：8.2、1：8.3、1：8.4、1：8.5、1：8.6、1：8.7、1：8.8、1：8.9、1：9、1：9.1、1：9.2、1：9.3、1：9.4、1：9.5、1：9.6、1：9.7、1：9.8、1：9.9、または1：10から選択される、方法を提供する。

【1241】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比が、約1.5：1～約100：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1242】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約50：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1243】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約25：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1244】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約20：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1245】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約10：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1246】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団の数が、第1のTIL集団よりも少な

くとも正確にまたは約50倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1247】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団の数が、第1のTIL集団よりも少なくとも正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1248】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第2の期間の開始の正確にまたは約2日または正確にまたは約3日後に、細胞培養培地に追加のIL-2が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1249】

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。

【1250】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)の後に、(e)ステップ(d)から採取したTIL集団を、任意選択でHypothermosolを含有する注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1251】

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。

【1252】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、1:1の採取されたTIL集団の凍結保存培地に対する比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1253】

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。

【1254】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1255】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において細胞培養に追加されるAPCの総数が 2.5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1256】

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。

【1257】

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。

【1258】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1259】

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。

【1260】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）での採取が膜ベースの細胞処理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。

【1261】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）での採取がL O V O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。

10

【1262】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約5～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1263】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約10～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1264】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約15～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1265】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約20～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1266】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約25～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1267】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約30～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1268】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約35～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1269】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約40～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1270】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約45～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1271】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約50～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当す

50

る前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1272】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1273】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 27 mm^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。

【1274】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 20 mm^3 ～正確にまたは約 50 mm^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。

【1275】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 21 mm^3 ～正確にまたは約 30 mm^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。

【1276】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 22 mm^3 ～正確にまたは約 29.5 mm^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。

【1277】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 23 mm^3 ～正確にまたは約 29 mm^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。

【1278】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 24 mm^3 ～正確にまたは約 28.5 mm^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。

【1279】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 25 mm^3 ～正確にまたは約 28 mm^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。

【1280】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 26.5 mm^3 ～正確にまたは約 27.5 mm^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。

【1281】

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 50 mm^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。

【1282】

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 1300 mm^3 ～正確にまたは約 1500 mm^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

10

20

30

40

50

供する。

【1283】

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1350mm³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。

【1284】

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。

【1285】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地がG容器またはXuriセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1286】

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。

【1287】

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。

【1288】

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。

【1289】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7%～10%DMSOを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1290】

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。

【1291】

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。

【1292】

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。

【1293】

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。

【1294】

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。

【1295】

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。

【1296】

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。

【1297】

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。

10

【1298】

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。

【1299】

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。

20

【1300】

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。

【1301】

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。

【1302】

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。

30

【1303】

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。

【1304】

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。

40

【1305】

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。

【1306】

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。

【1307】

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

50

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。

【1308】

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。

【1309】

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。

【1310】

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。

【1311】

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。

【1312】

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。

【1313】

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。

【1314】

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。

【1315】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1316】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1317】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、17日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1318】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、18日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

20

30

40

50

【1319】

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。

【1320】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1321】

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。

【1322】

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。

【1323】

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。

【1324】

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。

【1325】

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。

【1326】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団を提供し、この治療的TIL集団は、第1のTIL拡張が抗原提示細胞(APC)またはOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【1327】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団を提供し、この治療的TIL集団は、第1のTIL拡張が抗原提示細胞(APC)を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【1328】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団を提供し、この治療的TIL集団は、第1のTIL拡張がOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【1329】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団を提供し、この治療的TIL集団は、第1のTIL拡張が抗原提示細胞(APC)もOKT3も追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【1330】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の治療的集団を提供し、この治療的TIL集団は、16日より長いプロセスによって

10

20

30

40

50

プロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【１３３１】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１７日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

【１３３２】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療的集団を提供し、この治療的ＴＩＬ集団は、１８日より長いプロセスによってプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する。

10

【１３３３】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３３４】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的ＴＩＬ集団を提供する。

【１３３５】

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。

20

【１３３６】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（または、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも１倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

30

【１３３７】

他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１６日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１７日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的ＴＩＬ集団が、１８日より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも２倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的ＴＩＬ集団を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＩＬは、例えば、上記のステップＡ～Ｆに記載されるように、または上記のステップＡ～Ｆに従って（または、例えば、図８（特に、例えば図８Ａ及び／または図８Ｂ及び／または図８Ｃ及び／または図８Ｄ）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少な

40

50

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。

【1338】

他の実施形態では、本発明は、治療的TIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的TIL集団が、17日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的TIL集団が、18日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

10

【1339】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL拡張が抗原提示細胞（APC）を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

20

【1340】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL拡張がOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

30

【1341】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL拡張がAPCを追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるTILの治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

40

【1342】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL拡張がOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも2倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

50

【1343】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL拡張がAPCを追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【1344】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL増殖がOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【1345】

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。

【1346】

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。

【1347】

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。

【1348】

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。

【1349】

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。

【1350】

他の実施形態では、本発明は、（i）方法が、対象由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を得ることを含み、（ii）方法が、プライミングによる第1の拡張ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、（iii）方法が、約8日間にわたってプライミングによる第1の拡張を行うことを含み、かつ（iv）方法が、約11日間にわたって急速な第2の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1351】

他の実施形態では、本発明は、（i）方法が、対象由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を得ることを含み、（ii）方法が、プライミングによる第1の拡張ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、（iii）方法が、約8日間にわたってプライミングによる第1の拡張を行うことを含み、かつ（iv）方法が、第2のTIL集団の培養物を約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約6日間培養することに

よって、急速な第2の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大5つの継代培養物が各々、第2のTIL集団の培養が急速な第2の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第2のTIL集団の培養物は、最大5つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1352】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1353】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1354】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1355】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1356】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1357】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1358】

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。

40

【1359】

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。

【1360】

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。

【1361】

50

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1362】

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。

【1363】

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。

10

【1364】

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。

【1365】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1366】

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。

【1367】

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。

【1368】

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。

30

【1369】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1370】

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。

40

【1371】

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。

【1372】

他の実施形態では、本発明は、（i）方法が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含み、（ii）方法が、プライミングによる第

50

1の拡張ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む培養培地中で約8日間培養することによってプライミングによる第1の拡張ステップを行い、第2のTIL集団を得ることを含み、かつ(iv)方法が、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む培養培地中で約11日間培養することによって急速な第2の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1373】

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。

【1374】

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。

【1375】

他の実施形態では、本発明は、T細胞を拡張する方法であって、(a)第1のT細胞集団を培養することによってドナーから取得された第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、(b)ステップ(a)においてプライミングされた第1のT細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第1のT細胞集団を培養することによって第1のT細胞集団の急速な第2の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化を促進して第2のT細胞集団を

取得することと、(c)第2のT細胞集団を採取することと、を含む、T細胞を拡張する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(b)小規模培養での第1のT細胞集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S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-R E X-100 M C S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-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

10

20

30

【1376】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張のステップが、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(b)小規模培養での第1のT細胞集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移し、小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第2の容器内でのより大規模な培養で約5～7日間培養することによって、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。

40

【1377】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、(a)第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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によって、培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、第2の小規模培養で約5～7日間培養される。

50

【1378】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5～7日間培養される。

10

【1379】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5～6日間培養される。

20

【1380】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

30

【1381】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約6日間培養される。

40

【1382】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S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-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約7日間培養される。

50

【1383】

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。

【1384】

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。

【1385】

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。

10

【1386】

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。

【1387】

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。

20

【1388】

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。

【1389】

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。

30

【1390】

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。

【1391】

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。

40

【1392】

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。

【1393】

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。

50

【1394】

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O K T－3及びI L－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。

【1395】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地が4－1 B Bアゴニスト、O K T－3及びI L－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。

【1396】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地がO K T－3、I L－2及び抗原提示細胞（A P C）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。

10

【1397】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地が4－1 B Bアゴニスト、O K T－3、I L－2及び抗原提示細胞（A P C）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。

【1398】

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O K T－3、I L－2及び抗原提示細胞（A P C）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。

20

【1399】

他の実施形態では、本発明は、第2の培養培地が4－1 B Bアゴニスト、O K T－3、I L－2及び抗原提示細胞（A P C）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。

【1400】

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、O K T－3、I L－2及び第1の抗原提示細胞（A P C）集団を含み、第1のA P C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A P C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、O K T－3、I L－2及び第2のA P C集団を含み、第2のA P C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A P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のA P C集団が、第1のA P C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。

30

【1401】

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、4－1 B Bアゴニスト、O K T－3、I L－2及び第1の抗原提示細胞（A P C）集団を含み、第1のA P C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A P C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、O K T－3、I L－2及び第2のA P C集団を含み、第2のA P C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A P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のA P C集団が、第1のA P C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。

40

【1402】

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、O K T－3、I L－2及び第1の抗原提示細胞（A P C）集団を含み、第1のA P C集

50

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。

【1403】

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。

10

【1404】

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。

20

【1405】

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。

【1406】

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。

30

【1407】

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。

【1408】

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。

【1409】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が約 1.0×10^6 APC/cm²~約 4.5×10^6 APC/cm²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。

40

【1410】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が約 1.5×10^6 APC/cm²~約 3.5×10^6 APC/cm²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。

【1411】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が約 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

【1412】

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 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

【1413】

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 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

10

【1414】

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 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

【1415】

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 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

20

【1416】

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 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

【1417】

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 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1418】

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 $1.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1419】

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 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $3.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ～正確にまたは約 $5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1420】

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

50

たは約 2.0×10^6 APC / cm^2 の密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ (b) において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 APC / cm^2 の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1421】

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。

【1422】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが放射線照射され、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1423】

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。

【1424】

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。

【1425】

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。

20

【1426】

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。

【1427】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1428】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、T細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1429】

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。

【1430】

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

40

50

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。

【1431】

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。

【1432】

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。

【1433】

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。

【1434】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1435】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1~20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1436】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1~10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1437】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1438】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1439】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1440】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1~20

10

20

30

40

50

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。

【1441】

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。

【1442】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1443】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1444】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1445】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～20個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1446】

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。

【1447】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1448】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1449】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1450】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1451】

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。

【1452】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、

50

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。

【1453】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1454】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1455】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～20個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1456】

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。

【1457】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1458】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1459】

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、または針生検から得ら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集団が得られ、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、方法を提供する。

【1460】

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、方法を提供する。

10

【1461】

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。

20

【1462】

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。

【1463】

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。

【1464】

他の実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約22日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1465】

他の実施形態では、本発明は、T細胞を拡張する方法であって、（i）第1のT細胞集団を培養することによって、ドナーにおける腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍細胞由来の第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、（ii）ステップ（a）においてプライミングされた第1のT細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第1のT細胞集団を培養することによって第1のT細胞集団の急速な第2の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化を促進して第2のT細胞集団を取得することと、（iv）第2のT細胞集団を採取することと、を含む、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得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、2、3、4、5、6、7、8、9及び10個のコア生検からなる群から選択される。

40

【1466】

いくつかの実施形態では、本発明は、T細胞またはTILが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL ゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離（GentleMACS, Miltenyi Biotec, Au

50

burn, 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。

10

【1467】

VI. 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。

20

【1468】

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} ～約 8×10^{10} のTILである。

30

40

【1469】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるTILの数は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11}

50

、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるTILの数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

10

【1470】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、例えば、薬学的組成物の100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または0.0001% w/w、w/v、またはv/v未満である。

20

【1471】

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%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または0.0001% w/w、w/v、またはv/v超である。

30

40

【1472】

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。

50

【1473】

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。

【1474】

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。

【1475】

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、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g、または10g超である。

【1476】

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を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。

【1477】

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回超であり得る。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または隔日に1回であり得る。TILの投与は、必要な限り継続することができる。

【1478】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、

1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

10

【1479】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 0.01 mg/kg ～約 4.3 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 3.2 mg/kg 、約 0.35 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 1.3 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 1.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1 mg/kg 、約 0.55 mg/kg ～約 0.85 mg/kg 、約 0.65 mg/kg ～約 0.8 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 0.75 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.85 mg/kg ～約 2 mg/kg 、約 1 mg/kg ～約 1.85 mg/kg 、約 1.15 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 1.3 mg/kg ～約 1.6 mg/kg 、約 1.35 mg/kg ～約 1.5 mg/kg 、約 2.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 2.3 mg/kg ～約 3.4 mg/kg 、約 2.4 mg/kg ～約 3.3 mg/kg 、約 2.6 mg/kg ～約 3.15 mg/kg 、約 2.7 mg/kg ～約 3 mg/kg 、約 2.8 mg/kg ～約 3 mg/kg 、または約 2.85 mg/kg ～約 2.95 mg/kg の範囲内である。

20

30

【1480】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1 mg ～約 500 mg 、約 10 mg ～約 300 mg 、約 20 mg ～約 250 mg 、約 25 mg ～約 200 mg 、約 1 mg ～約 50 mg 、約 5 mg ～約 45 mg 、約 10 mg ～約 40 mg 、約 15 mg ～約 35 mg 、約 20 mg ～約 30 mg 、約 23 mg ～約 28 mg 、約 50 mg ～約 150 mg 、約 60 mg ～約 140 mg 、約 70 mg ～約 130 mg 、約 80 mg ～約 120 mg 、約 90 mg ～約 110 mg 、または約 95 mg ～約 105 mg 、約 98 mg ～約 102 mg 、約 150 mg ～約 250 mg 、約 160 mg ～約 240 mg 、約 170 mg ～約 230 mg 、約 180 mg ～約 220 mg 、約 190 mg ～約 210 mg 、約 195 mg ～約 205 mg 、または約 $198 \sim 207 \text{ mg}$ の範囲内である。

40

【1481】

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。

【1482】

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。

50

【1483】

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。

【1484】

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。

【1485】

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。

【1486】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 組成物を提供する。

【1487】

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。

【1488】

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。

【1489】

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。

【1490】

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。

【1491】

任意の好適な用量の TIL が投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんが NSCLC である場合、約 2.3×10^{10} ~ 約 13.7×10^{10} の TIL が投与され、平均は約 7.8×10^{10} の TIL である。いくつかの実施形態では、約 1.2×10^{10} ~ 約 4.3×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 3×10^{10} ~ 約 12×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 4×10^{10} ~ 約 10×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 5×10^{10} ~ 約 8×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 6×10^{10} ~ 約 8×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 7×10^{10} ~ 約 8×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 2.3×10^{10} ~ 約 13.7×10^{10} である。いくつかの実施形態では、特にがんが NSCLC である場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 1.2×10^{10} ~ 約 4.3×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 3×10^{10} ~ 約 12×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 4×10^{10} ~ 約 10×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 5×10^{10} ~ 約 8×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 6×10^{10} ~ 約 8×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 7×10^{10} ~ 約 8×10^{10} TIL である。

【1492】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供される TIL の数は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、8

10

20

30

40

50

$\times 10^6$ 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供される TIL の数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1493】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の濃度は、例えば、薬学的組成物の 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または 0.0001% w/w、w/v、または v/v 未満である。

【1494】

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%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または 0.0001% w/w、w/v、または v/v 超である。

【1495】

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。

【1496】

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。

10

【1497】

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。

20

【1498】

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、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g、または10g超である。

30

【1499】

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。

40

【1500】

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

50

用量で投与され得る。投薬は、1年に1回、2回、3回、4回、5回、6回、または6回超であり得る。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または隔日に1回であり得る。T I Lの投与は、必要な限り継続することができる。

【1501】

いくつかの実施形態では、T I Lの有効な投与量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、T I Lの有効な投与量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1502】

いくつかの実施形態では、T I Lの有効な投与量は、約 0.01 mg/kg ～約 4.3 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 3.2 mg/kg 、約 0.35 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 1.3 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 1.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1 mg/kg 、約 0.55 mg/kg ～約 0.85 mg/kg 、約 0.65 mg/kg ～約 0.8 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 0.75 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.85 mg/kg ～約 2 mg/kg 、約 1 mg/kg ～約 1.85 mg/kg 、約 1.15 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 1.3 mg/kg ～約 1.6 mg/kg 、約 1.35 mg/kg ～約 1.5 mg/kg 、約 2.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 2.3 mg/kg ～約 3.4 mg/kg 、約 2.4 mg/kg ～約 3.3 mg/kg 、約 2.6 mg/kg ～約 3.15 mg/kg 、約 2.7 mg/kg ～約 3 mg/kg 、約 2.8 mg/kg ～約 3 mg/kg 、または約 2.85 mg/kg ～約 2.95 mg/kg の範囲内である。

【1503】

いくつかの実施形態では、T I Lの有効な投与量は、約 1 mg ～約 500 mg 、約 10 mg ～約 300 mg 、約 20 mg ～約 250 mg 、約 25 mg ～約 200 mg 、約 1 mg ～約 50 mg 、約 5 mg ～約 45 mg 、約 10 mg ～約 40 mg 、約 15 mg ～約 35 mg 、約 20 mg ～約 30 mg 、約 23 mg ～約 28 mg 、約 50 mg ～約 150 mg 、約 60 mg ～約 140 mg 、約 70 mg ～約 130 mg 、約 80 mg ～約 120 mg 、約 90 mg ～約 110 mg 、または約 95 mg ～約 105 mg 、約 98 mg ～約 102 mg 、約 150 mg ～約 250 mg 、約 160 mg ～約 240 mg 、約 170 mg ～約 230 mg 、約 180 mg ～約 220 mg 、約 190 mg ～約 210 mg 、約 195 mg ～約 205 mg 、または約 $198 \sim 207 \text{ mg}$ の範囲内である。

【1504】

T I L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。

【1505】

VII. 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。

10

【1506】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って（また例えば、図1及びまたは図8に示されるように）産生される拡張TILは、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34(20): 2389-239、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、TILは、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Dudley, et al., J. Immunother., 2003, 26: 332-342を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。2 mm³～3 mm³の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり5、10、15、20、25、または30個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり20、25、または30個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり20、22、24、26、または28個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり24個の試料が取得される。試料は、24ウェルプレートの個々のウェル内に配置され、高用量IL-2（6,000 IU/mL）を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／またはTILの増殖について監視され得る。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

20

【1507】

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。一晚の共培養によりインターフェロンガンマ（IFN- γ ）レベルが200 pg/mLを超え、バックグラウンドの2倍になった場合、TILは反応性があるとみなされ得る。（Goff, et al., J. Immunother., 2010, 33: 840-847、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張（REP）と称されることもある第2の拡張を含む、第2の拡張（例えば、図1及び／または図8のステップDに従って提供される第2の拡張）のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第2の拡張中の高い増殖）を有する拡張TILが、追加の第2の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図1及び／または図8のステップDで提供されるような第2の拡張中の高い増殖）を有するTILが、図1及び／または図8のステップDに従って、追加の第2の拡張のために選択される。

30

40

【1508】

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- γ の上昇は、100 pg/mL超及び4-3倍

50

スラインレベルを超えると定義された。

【1509】

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。

10

【1510】

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效性を示す。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ピボでの血液、血清、またはTIL中のサイトカインIFN- γ のレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、IFN- γ の増加は、本発明の方法によって産生されたTILで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、IFN- γ が1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、3倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、4倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、5倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、Quantikine ELISAキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、例えば、図1及び／または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されたTILで治療された対象のエクスピボでの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。

20

30

40

50

【1511】

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效性を示す。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ピボでの血液、血清、またはTIL中のサイトカインIFN- γ のレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、IFN- γ の増加は、本発明の方法によって産生されたTILで治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、IFN- γ が1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上増加する。

10

【1512】

いくつかの実施形態では、例えば図1及び／または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるTILは、例えばプロセス1C法と称される方法を含む、図1及び／または図8に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるTILと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、T細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたTILの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍、2倍、10倍、100倍、500倍、または1000倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、10倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、100倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1000倍増加する。

20

30

40

【1513】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（DCR）ならびに全応答率（ORR）が含まれ得る。

50

【1514】

A. がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、それらは、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

【1515】

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、固形腫瘍がんである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（HPV）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消火器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（NSCLC）及び小細胞肺癌）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに腫瘍からなる群から選択される。

10

20

【1516】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたMILまたはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

30

【1517】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少なくとも1つの前療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍がん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。

40

【1518】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）癌である。したがって、MSI-H及びdMMR癌ならびに試験は、Kawakami, et al., Curr. Treat. Options Oncol. 2015, 16, 30に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1519】

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

50

、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、伴侶動物である。

【1520】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、BRAF阻害剤及び／またはMEK阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるBRAF阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるMEK阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるBRAF阻害剤、ならびにトラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるMEK阻害剤による治療に対して不応性である。

10

20

【1521】

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。

【1522】

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。

【1523】

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。

30

【1524】

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。

【1525】

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。

【1526】

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。

【1527】

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。

40

【1528】

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。

【1529】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（CNS）関連癌である。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法によ

50

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。

【1530】

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関連癌は、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。

【1531】

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、本明細書に記載のBRAF V600変異に関連する黒色腫である。

【1532】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗PD-1または抗PD-L1抗体による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、患者のがんの進行に続く、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する事前の応答を示す。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせた抗CTLA-4抗体及び／または抗PD-1もしくは抗PD-L1抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わされている。

10

20

【1533】

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、NSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、PD-L1陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、腫瘍割合スコア（TPS）が1%未満でPD-L1を発現するがんを有する患者に由来する。

30

【1534】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1または抗PD-L1抗体及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

i) シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、
ii) ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはna-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。

【1535】

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、

40

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na-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。

【1536】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-L1抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナイーブである。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P

50

D-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ナীব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、治療ナীব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ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবまたは化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীব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瘍病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、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、治療ナীবまたは化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীব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瘍病変を有し、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、治療ナীবのNSCLCまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、PD-L1の発現が低く、及び／またはベースラインで巨大腫瘍病変を有する抗PD-1/PD-L1ナীব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、巨大腫瘍病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘍病変は、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。

10

20

30

40

50

【1537】

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、 $\geq 1\%$ TPSを有する。いくつかの実施形態では、不応性NSCLCを有する対象は、抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性NSCLCを有する対象は、抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗PD-L1抗体治療の前に決定された。

【1538】

いくつかの実施形態では、例えば、図1または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるTILは、例えば、プロセス1C法と称される方法などの、図1または図8に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるTILと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、T細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたTILの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍、2倍、10倍、100倍、500倍、または1000倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1ま

たは図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L 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 T I L 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 T I L 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 T I L で治療された患者と比較して、1000 倍増加する。

10

【1539】

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、 $\geq 1\%$ 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、 $\geq 1\%$ 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。

20

【1540】

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、 $0\% \sim 1\%$ の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、 $0\% \sim 0.9\%$ の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、 $0\% \sim 0.8\%$ の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、 $0\% \sim 0.7\%$ の TPS を示す NSCLC である。いくつかの実施形態では、NSCLC は、 $0\% \sim 0.6\%$ の TPS を示す NSCLC である。い

30

40

50

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。

10

【1541】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ100%の膜染色を含む。

【1542】

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。

20

【1543】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性PD-L1の上昇は、NSCLCにおける予後の悪化と相関する。例えば、Okuma, et al., Clinical Lung Cancer, 2018, 19, 410-417、Vecchiarelli, et al., Oncotarget, 2018, 9, 17554-17563を参照されたい。いくつかの実施形態では、PD-L1は、エクソソームPD-L1である。いくつかの実施形態では、PD-L1は、循環腫瘍細胞上に発現される。

30

【1544】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、対象または患者は、

i. <1%のPD-L1所定の腫瘍割合スコア (TPS)、

ii. 1%~49%のPD-L1のTPSスコア、または

iii. 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも1つを有し、ドライバー変異は、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異 (ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択され、この方法は、

40

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

(b) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1

50

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、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、

10

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

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

20

【1545】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

(b) 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異(ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択される、試験することと、

30

(c) 患者が、約1%～約49%のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

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

40

(e) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

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

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を

50

提供する密閉容器内で行われ、ステップ（f）からステップ（g）への移行が、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

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

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

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

（k）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

10

【1546】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（NSCLC）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

（a）PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア（TPS）について患者の腫瘍を試験することと、

（b）1つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択される、試験することと、

20

（c）患者が、約1%未満のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

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

30

（e）第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

40

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

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

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

（k）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対

50

象または患者に投与することと、を含む。

【1547】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（NSCLC）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

（a）PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア（TPS）について患者の腫瘍を試験することと、

（b）1つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、またはRET融合からなる群から選択される、試験することと、

（c）患者が、約1%～約49%のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

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

（e）第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

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

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

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

（k）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1548】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌（NSCLC）の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

（a）PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア（TPS）について患者の腫瘍を試験することと、

（b）1つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、またはRET融合からなる群から選択される、試験することと、

（c）患者が、約1%未満のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

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

（e）第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

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

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

10

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

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

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

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

20

【1549】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的TIL集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1550】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1551】

他の実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的TIL集団及び本明細書に記載のTIL組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための任意の方法を提供する。

30

【1552】

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、 60 mg/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、 25 mg/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任意の方法を提供する。

【1553】

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任意の方法を提供する。

【1554】

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分間のボラス静脈内注入として投与される600,000または720,000 IU/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任意の方法を提供する。

40

【1555】

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、ヒトパピローマウイルス(HPV)によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌(上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む)、子宮頸癌(扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌)、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消火器癌、消化管間質腫瘍、神経

50

膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（NSCLC）及び小細胞肺癌）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに腫瘍からなる群から選択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任意の方法を提供する。

【1556】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんが血液学的悪性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任意の方法を提供する。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたMILまたはPBLを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【1557】

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任意の方法を提供する。

【1558】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児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任意の方法を提供する。

【1559】

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）、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任意の方法を提供する。

【1560】

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任意の方法を提供する。

【1561】

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任意の方法を提供する。

【1562】

他の実施形態では、本発明は、がんがブドウ膜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任意の方法を提供する。

【1563】

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任意の方法を提供する。

【1564】

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任意の方法を提供する。

【1565】

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任意の方法を提供する。

【1566】

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任意の方法を提供する。

【1567】

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。

【1568】

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。

【1569】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1570】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的TIL集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的TIL集団を提供する。

【1571】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のTIL組成物を提供する。

【1572】

他の実施形態では、本発明は、必要に応じて、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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的TIL集団または任意のTIL組成物を提供する。

【1573】

他の実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、治療的TIL集合単独による治療を含んでもよく、またはTILならびに1つ以上のPD-1及び／またはPD-L1阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1574】

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/m²/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/m²/日の用量で5日間のフルダリンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的TIL集団または任意のTIL組成物を提供する。

【1575】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的TIL集団または任意のTIL組成物を提供する。

【1576】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的TIL集団または任意のTIL組成物を提供する。

【1577】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的TIL集団または任意のT

10

20

30

40

50

ＩＬ組成物を提供する。

【１５７８】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児癌であるように修正された、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５７９】

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）、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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

10

【１５８０】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５８１】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

20

【１５８２】

他の実施形態では、本発明は、がんがブドウ膜黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５８３】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５８４】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

30

【１５８５】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５８６】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

40

【１５８７】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５８８】

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的ＴＩＬ集団または任意のＴＩＬ組成物を提供する。

【１５８９】

50

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、本明細書に記載の対象を治療するための方法で使用するための任意の治療的 T I L 集団または任意の T I L 組成物を提供する。

【1590】

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 T I L 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任意の治療的 T I L 集団の使用を提供する。

【1591】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の T I L 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本明細書に記載の任意の T I L 組成物の使用を提供する。

10

【1592】

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、次いで治療上有効な投与量の治療的 T I L 集団または治療上有効な投与量の T I L 組成物を対象に投与することと、を含む、患者におけるがんを治療する方法における、本明細書に記載の任意の治療的 T I L 集団または本明細書に記載の任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1593】

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

20

【1594】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児癌であるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1595】

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（N S C L C）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）を含む）、神経膠芽細胞腫（G B M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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

30

【1596】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽細胞腫（G B Mを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1597】

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

40

【1598】

他の実施形態では、本発明は、がんがブドウ膜黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1599】

他の実施形態では、本発明は、がんが H N S C C であるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1600】

50

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1601】

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1602】

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

10

【1603】

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1604】

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、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

【1605】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

20

【1606】

他の実施形態では、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、ヒトパピローマウイルス (HPV) によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌 (上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む)、子宮頸癌 (扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌)、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消化器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌 (頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) を含む)、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌)、腎臓癌、肝臓癌、肺癌 (非小細胞肺癌 (NSCLC) 及び小細胞肺癌)、黒色腫 (ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む)、中皮腫 (悪性胸膜中皮腫を含む)、卵巣癌、膵臓癌 (膵管腺癌を含む)、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫 (ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む)、甲状腺癌 (未分化甲状腺癌を含む)、子宮癌、ならびに腫瘍からなる群から選択されるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。

30

【1607】

他の実施形態では、本発明は、がんが血液悪性腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の対象におけるがんを治療する方法における、任意の治療的 T I L 集団の使用または任意の T I L 組成物の使用を提供する。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、1 つ以上の CCR を発現するように修飾された T I L、M I L、または P B L 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 M I L または P B L 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

40

50

性腫瘍である。

【1608】

1. 小児癌を治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、小児患者（すなわち、治療時に21歳未満の患者）における小児癌を治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、小児癌は、神経芽腫、肉腫、または中枢神経系（CNS）関連癌である。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は、神経芽腫の治療のためのものである。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は、肉腫の治療のためのものである。いくつかの実施形態では、肉腫は、骨肉腫である。ある特定の実施形態では、肉腫は、軟部組織肉腫である。本明細書に記載のTILによって治療することができる軟部組織肉腫としては、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫及び未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な実施形態では、小児癌は、CNS関連癌である。CNS関連癌には、髄芽腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）、松果体芽腫、神経膠腫、上衣腫、及び神経膠芽細胞腫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、小児癌は、BRAF遺伝子の変異に起因するBRAFタンパク質のV600変異を示す。いくつかの実施形態では、変異は、V600K変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600R変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600D変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600E2変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600M4変異である。

10

20

【1609】

本明細書に記載のTILを使用して治療することができる追加の小児癌としては、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、CD33陽性急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ユーイング肉腫、ホジキンリンパ腫、悪性褐色細胞腫、骨髄腫、髄膜白血病、メルケル細胞癌、再発性、局所進行性、または転移性メルケル細胞癌、転移性非セミノーマ精巣癌、ミスマッチ修復欠損及び高頻度マイクロサテライト不安定性結腸直腸癌、ミスマッチ修復欠損及び高頻度マイクロサテライト不安定性固形腫瘍、非ホジキンリンパ腫、パラガングリオーマ、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病、原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、再発性または不応性B細胞急性リンパ芽球性白血病、不応性B細胞急性リンパ芽球性白血病、不応性古典的ホジキンリンパ腫、横紋筋肉腫、ウィルムス腫瘍、NTRK遺伝子融合を有する固形腫瘍、上衣下巨細胞性星細胞腫、T細胞急性リンパ芽球性白血病、T細胞リンパ芽球性白血病、及びウィルムス腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【1610】

本明細書で使用される場合、「小児患者」には、新生児（出生～生後28日）、乳幼児（29日～2歳未満）、小児（2歳～12歳未満）、及び青少年（12歳～21歳（22歳の誕生日まで、ただし22歳の誕生日を含まない））が含まれる。いくつかの実施形態では、小児患者は、18歳以下である。いくつかの実施形態では、小児患者の体重は、約2、3、4、5、6、7、8、9、または10kg以上である。ある特定の実施形態では、小児患者の体重は、約8kg～約40kgである。例示的な実施形態では、小児患者の体重は、少なくとも40kgである。いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも約1ヶ月齢、2ヶ月齢、3ヶ月齢、4ヶ月齢、5ヶ月齢、6ヶ月齢、7ヶ月齢、8ヶ月齢、9ヶ月齢、10ヶ月齢、11ヶ月齢、または12ヶ月齢である。いくつかの実施形態では、患者は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20歳である。例示的な実施形態では、小児患者は、2歳未満である。ある特定の実施形態では、小児患者は、2歳～12歳である。いくつかの実施形態では、小児患者は、12歳～21歳である。

40

【1611】

いくつかの実施形態では、小児癌は、骨肉腫である。骨肉腫は、間葉由来の原始的な形質転換細胞（したがって肉腫）から生じ、骨芽球分化を示し、悪性類骨を産生する、侵襲的な悪性腫瘍である。典型的には、骨肉腫の治療には、腫瘍を除去するための手術、続い

50

て残りのがん細胞を殺傷するための化学療法が含まれ、がん再発のリスクを低減する。骨肉腫の治療に有用な化学療法薬としては、ロイコボリンレスキューを有するメトトレキサート、動脈内シスプラチン、アドリマイシン、メスナを有するイホスファミド、BCD（ブレオマイシン、シクロホスファミド、ダクチノマイシン）、エトポシド、及びムラミルトリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象のTILで治療された小児患者は、1種以上の化学療法剤で以前に治療されていた。ある特定の実施形態では、小児患者は、1種以上の化学療法剤で以前に治療されていない。特定の実施形態では、骨肉腫は、1種以上の化学療法剤に対して不応性である。

【1612】

いくつかの実施形態では、小児癌は、神経芽腫である。神経芽腫は、ある特定の種類の神経組織において形成されるがんの一種であり、乳児で最も一般的ながんであり、白血病及び脳腫瘍に次いで小児で3番目に一般的ながんである。神経芽腫のためのFDAが承認した療法には、例えば、ジヌツキシマブ及び硫酸ビンクリスチンが含まれる。ジヌツキシマブ（Ch14.18及びAPN-311とも呼ばれる）は、典型的には、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-2及び13-シス-レチノイン酸（イソトレチノインとも呼ばれる）と組み合わせた高リスク神経芽腫を有する小児のための強化後療法として使用される。いくつかの実施形態では、小児患者は、ジヌツキシマブでの治療を以前に受けている。いくつかの実施形態では、小児患者は、ジヌツキシマブ、GMC-SF、IL-2及び／またはイソトレチノインを含む併用療法による治療を以前に受けている。例示的な実施形態では、小児患者は、最大5サイクルで4日間連続して10～20時間にわたって17.5mg/m²/日IVのジヌツキシマブ治療レジメンを以前に受けていた。他の実施形態では、小児患者は、ジヌツキシマブによる治療を以前に受けていない。いくつかの実施形態では、神経芽腫は、ジヌツキシマブに対して不応性である。いくつかの実施形態では、TIL療法は、ジヌツキシマブ治療レジメンと組み合わせて小児患者に提供される。例示的な実施形態では、最大5サイクルで4日間連続して10～20時間にわたって17.5mg/m²/日IVのジヌツキシマブ治療レジメン。

【1613】

いくつかの実施形態では、小児神経芽腫患者は、1種以上の化学療法剤で以前に治療されていた。他の実施形態では、小児神経芽腫患者は、1種以上の化学療法剤で以前に治療されていなかった。例示的な化学療法剤としては、白金化合物（例えば、シスプラチン、及びカルボプラチン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン）、トポイソメラーゼII阻害剤（例えば、エトポシド）、アントラサイクリン抗生物質（例えば、オキシソルピシン）、ピンカアルカロイド（ビンクリスチン）、及びトポイソメラーゼII阻害剤（トポテカン及びイリノテカン）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、神経芽腫は、1種以上の化学療法剤に対して不応性である。

【1614】

いくつかの実施形態では、小児癌は、横紋筋肉腫（RMS）である。横紋筋肉腫は、完全に分化していない骨格筋細胞から発症する、侵襲性かつ非常に悪性の形態のがんである。それは一般に小児期の疾患であると考えられており、大多数の症例は、18歳未満で発生する。比較的まれながんであるにもかかわらず、記録されたすべての軟部組織肉腫のおよそ40%を占める。RMSのための化学療法治療の2つの主要な方法がある。VACレジメンは、ビンクリスチン、アクチノマイシンD、及びシクロホスファミドを含む。IVAREジメンには、イホスファミド、ビンクリスチン、及びアクチノマイシンが含まれる。RMSの治療に有用な追加の化学療法剤としては、ドキソルピシン及びシスプラチンが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、1種以上の化学療法剤を以前に投与されている。いくつかの実施形態では、小児患者は、治療のVACまたはIVAREジメンを以前に受けたことがある。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、1種以上の化学療法剤を以前に投与されていない。いくつかの実施形態では、小児患者は、VACまたはIVAREの治療レジメ

10

20

30

40

50

ンを以前に受けていない。いくつかの実施形態では、RMSは、本明細書に記載の1種以上の化学療法剤に対して不応性である。いくつかの実施形態では、RMSは、治療のVACまたはIVAレジメンに対して不応性である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、ダクチノマイシンを以前に投与されている。いくつかの実施形態では、小児患者は、最大112週間、3～9週間毎に15mg/kg IVのダクチノマイシンレジメンを1～5日目に以前に投与されていた。他の実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、ダクチノマイシンを以前に投与されていない。いくつかの実施形態では、横紋筋肉腫は、ダクチノマイシンに対して不応性である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、硫酸ビンクリスチンを以前に投与されている。他の実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、硫酸ビンクリスチンを以前に投与されていない。いくつかの実施形態では、横紋筋肉腫は、硫酸ビンクリスチンに対して不応性である。

10

【1615】

いくつかの実施形態では、小児癌は、ユーイング肉腫である。ユーイング肉腫は、男性においてより一般的であり、通常、小児期または成人期初期に現れ、10～20歳の間にピークを迎える。ユーイング肉腫の原因は不明であり、ほとんどの症例はランダムに発生するように見える。ユーイング肉腫は、未分化神経外胚葉性腫瘍と一緒にグループ化されることがある。ユーイング肉腫の根底にある機序は、しばしば相互転座を伴う。化学療法剤は、ビンクリスチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、イホスファミド、ダクチノマイシン、及びエトポシドを含むがこれらに限定されないユーイング肉腫の治療に使用される。いくつかの実施形態では、ユーイング肉腫は、1種以上の化学療法剤で以前に治療されている。いくつかの実施形態では、ユーイング肉腫は、化学療法剤で以前に治療されていない。いくつかの実施形態では、ユーイング肉腫は、1種以上の化学療法剤に対して不応性である。いくつかの実施形態では、ユーイング肉腫は、ダクチノマイシンで以前に治療されている。いくつかの実施形態では、ユーイング肉腫は、1250mcg/m² IV q3週のダクチノマイシンレジメンで51週間にわたって以前に治療されている。他の実施形態では、ユーイング肉腫は、ダクチノマイシンで以前に治療されていない。いくつかの実施形態では、ユーイング肉腫は、ダクチノマイシンに対して不応性である。

20

【1616】

例示的な実施形態では、小児癌は、未分化神経外胚葉性腫瘍(PNET)である。PNETは、通常、25歳未満の小児及び若年成人において発生する神経節腫瘍である。PNETは、末梢性PNETとCNS PNETの2つのタイプに分類される。いくつかの実施形態では、小児患者は、末梢性PNETを有する。例示的な実施形態では、小児患者は、CNS PNETを有する。

30

【1617】

いくつかの実施形態では、小児癌は、髄芽腫である。髄芽腫は、小脳から始まり、脳脊髄液(CSF)を介して脳及び脊髄周辺の他の領域に広がる傾向があるがん性脳腫瘍である。髄芽腫はどの年齢でも起こり得るが、幼児において最も頻繁に起こる。これは、小児における最も一般的ながん性脳腫瘍である。髄芽腫の治療は、放射線療法及び化学療法を伴う。

40

【1618】

ある特定の実施形態では、小児癌は、松果体芽腫である。松果体芽腫は、松果体で発生する非常にまれな脳腫瘍である。松果体芽腫は、小児及び若年成人において最も一般的である。しかしながら、それは小児脳腫瘍の1%未満を占めるまれな腫瘍である。松果体芽腫は、典型的には、手術、放射線療法及び化学療法で治療される。松果体芽腫の治療のための化学療法剤には、ビンクリスチン、シクロホスファミド及びシスプラチンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTILを投与される小児患者は、1種以上の化学療法剤を以前に投与されている。他の実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、化学療法剤を以前に投与されていない。いくつかの実施形態では、松果体芽腫は、1種以上の化学療法剤に対して不応性である。

50

【1619】

いくつかの実施形態では、小児癌は、神経膠腫である。神経膠腫は、脳または脊椎のグリア細胞で始まる腫瘍の一種である。神経膠腫は、すべての脳腫瘍及び中枢神経系腫瘍の約30パーセント、及びすべての悪性脳腫瘍の80パーセントを占める。神経膠腫の治療は、典型的には、手術、放射線療法、及び化学療法を使用した併用アプローチである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTILを投与される小児患者は、1種以上の化学療法剤を以前に投与されている。他の実施形態では、本明細書に記載のTILを投与された小児患者は、化学療法剤を以前に投与されていない。いくつかの実施形態では、神経膠腫は、1種以上の化学療法剤に対して不応性である。

【1620】

例示的な実施形態では、小児癌は、上衣腫である。上衣腫は、上衣から生じる腫瘍である。小児の場合、位置は、典型的には頭蓋内である。上衣腫は、典型的には手術及び放射線療法によって治療される。

【1621】

いくつかの実施形態では、小児癌は、神経膠芽細胞腫である。神経膠芽細胞腫は、脳内で発生する最も侵襲的な種類のがんである。神経膠芽細胞腫は、典型的には放射線療法を使用して治療される。

【1622】

いくつかの実施形態では、小児癌は、1種以上の免疫チェックポイント阻害剤療法で治療されている。免疫チェックポイント阻害剤療法としては、PD-1阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）、PD-L1阻害剤（例えば、抗PD-L1抗体）、及びCTLA-4阻害剤（例えば、抗CTLA-4抗体）が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態では、小児癌は、チェックポイント阻害剤で以前に治療されなかった。例示的な実施形態では、小児癌は、チェックポイント阻害剤に対して不応性である。

【1623】

いくつかの実施形態では、小児癌は、1種以上の化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、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、シスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブレット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブレット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブレット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わせられている。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法剤で以前に治療されなかった。例示的な実施形態では、小児癌は、化学療法剤に対して不応性である。

【1624】

いくつかの実施形態では、小児癌患者は、抗PD-1/PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、小児癌患者は、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、小児癌患者は、治療ナীবのがんを有するか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、小児癌対象は、治療ナীবの小児癌であるか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীব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、小児癌対象は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、小児癌対象は、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、小児癌対象は、治療ナীবの小児癌であるか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীব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、対象は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、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、小児癌対象は、治療ナীবの小児癌を有するか、または化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、PD-L1の発現が低い、及び

10

20

30

40

50

／またはベースラインで巨大腫瘍病変を有する抗PD-1／PD-L1ナীব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、巨大腫瘍病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘍病変は、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、本明細書に開示される小児癌の標準治療の治療薬を含む。

【1625】

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、不応性小児癌を有する対象は、<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、不応性小児癌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、不応性黒色腫を有する対象は、抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性小児癌を有する対象は、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。

【1626】

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法と称される方法などの、図1及び／または図8に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるTILと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び／または増加したポリクローン性は、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效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、T細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたTILの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍、2倍、10倍、100倍、500倍、または1000倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、10倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、100倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、500倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1000倍増加する。

【1627】

2. ブドウ膜黒色腫を治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、患者におけるブドウ膜黒色腫または結膜悪性黒色腫を治療するために使用され得る。ブドウ膜黒色腫は、ブドウ膜の3つの部分のうちのいずれかから生じることがあり、時にはそれらの位置によって、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色

腫、または虹彩黒色腫と呼ばれる。いくつかの実施形態では、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫である。いくつかの実施形態では、ブドウ膜黒色腫は、毛様体黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫は、虹彩黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫は、結膜悪性黒色腫である。いくつかの実施形態では、ブドウ膜黒色腫または結膜悪性黒色腫は、BRAF遺伝子における変異に起因するBRAFタンパク質のV600変異を示す。いくつかの実施形態では、変異は、V600K変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600R変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600D変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600E2変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600M4変異である。Heinzerling, L.; Kuhnappfel, S.; Meckbach, D.; et al., Rare BRAF mutations in melanoma patients: implications for molecular testing in clinical practice, Br. J. Cancer, 2013, 108, 2164-2171 (その開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載の変異を含む、当該技術分野で知られている前述及び他のBRAFタンパク質変異のうちのいずれかを、本発明において使用することができる。

10

【1628】

3. 中皮腫を治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、それを必要とする患者における中皮腫を治療するために使用され得る。悪性中皮腫は、胸膜（肺）、腹膜（腹部）、心膜（心臓）、及び精巣を含む腫瘍位置に基づいて分類することができる。いくつかの実施形態では、治療される中皮腫は、胸膜中皮腫である。胸膜中皮腫は、肺の内膜（すなわち、胸膜）に形成され、最も一般的な悪性中皮腫である。いくつかの実施形態では、治療される中皮腫は、腹膜中皮腫である。腹膜中皮腫は、腹腔（すなわち、腹膜）の内膜に影響を及ぼし、中皮腫の2番目に一般的なタイプである。ある特定の実施形態では、治療される中皮腫は、心膜中皮腫である。心膜中皮腫腫瘍は、心臓の内膜（すなわち、心膜）に形成される。いくつかの実施形態では、治療される中皮腫は、精巣中皮腫である。

20

【1629】

中皮腫は、上皮様中皮腫、肉腫様中皮腫、及び二相性中皮腫を含む細胞型によって分類することもできる。いくつかの実施形態では、治療されるがんは、上皮様中皮腫、肉腫様中皮腫、または二相性中皮腫である。いくつかの実施形態では、治療される中皮腫は、上皮性または肉腫様中皮腫のまれなサブタイプである。例示的なまれな上皮性及び肉腫様中皮腫サブタイプには、腺腫様中皮腫、嚢胞性中皮腫、間質線維化中皮腫高分化乳頭状中皮腫、小細胞中皮腫が含まれるが、これらに限定されない。

30

【1630】

いくつかの実施形態では、中皮腫を有する患者は、中皮腫の治療を以前に受けていたか、または同時に治療を受けている。中皮腫の治療には、例えば、化学療法、放射線療法、手術、及び免疫療法が含まれる。いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫のための少なくとも1つの治療を以前に受けている。いくつかの実施形態では、患者は、2つ以上の治療を含むマルチモーダル治療計画を以前に受けていた。

40

【1631】

いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫の化学療法を以前に受けていた。例示的な実施形態では、化学療法は、白金系シスプラチンまたはカルボプラチンを含む。ある特定の実施形態では、化学療法は、ペメトレキセドを含む。例示的な実施形態では、化学療法は、白金系シスプラチンまたはカルボプラチンとペメトレキセドとの組み合わせを含む。ある特定の実施形態では、患者は、手術及び／または放射線療法と組み合わせた化学療法治療を以前に受けていた。いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫を治療するための手術前に化学療法治療を受けていた。いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫を治療するための手術後に化学療法治療を受けていた。

【1632】

50

いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫の放射線治療及び／または外科的治療を以前に受けていた。ある特定の実施形態では、患者は、中皮腫の外科的治療前に放射線療法を受けていた。いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫の手術後の二次治療として放射線治療を受けていた。いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫の緩和放射線療法を受けている。

【1633】

いくつかの実施形態では、患者は、中皮腫の免疫療法治療を以前に受けていたか、または同時に受けている。中皮腫の例示的な免疫療法には、本明細書に記載の抗PD-1抗体（例えば、ペムブロリズマブ及びニボルマブ）及び抗CTLA抗体（イピリムマブ）治療が含まれるが、これらに限定されない。

【1634】

4. 例示的なPD-L1試験方法

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、がんを有する対象は、＜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、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、がんを有する対象は、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、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、がんを有する対象は、抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗PD-L1抗体治療の前に決定された。

【1635】

いくつかの実施形態では、がんは、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。いくつかの実施形態では、がんは、＜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。いくつかの実施形態では、がんは、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。いくつかの実施形態では、がんは、0%～1%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.9%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.8%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.7%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.6%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.5%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.4%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.3%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.2%のTPSを示す。いくつかの実施形態では、がんは、0%～0.1%のTPSを示す。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

10

20

30

40

50

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。いくつかの実施形態では、がんは、小児癌、ブドウ膜黒色腫、または中皮腫である。

【1636】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ100%の膜染色を含む。

【1637】

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。

【1638】

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、予後の悪化と相関する。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、循環腫瘍細胞上に発現される。

【1639】

5. PD-1及びPD-L1阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、治療的TIL集合単独による治療を含んでもよく、またはTILならびに1つ以上のPD-1及び／またはPD-L1阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1640】

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に記載されるように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。PD-1は、T細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。PD-L1 (B7-H1またはCD274としても知られる) 及びPD-L2 (B7-DCまたはCD273としても知られる) は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、PD-1を発現する活性化T細胞が遭遇する可能性があり、T細胞の免疫抑制につながる。PD-L1は、ヒト第9染色体上のCd274遺伝子によってコードされる290アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Topalian, et al., N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443-54に記載される最近の臨床研究で実証されているように、PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤、及び／またはPD-L2阻害剤の使用による、PD-1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、免疫抵抗を克服することができる。PD-L1は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、PD-L2は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される。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。

【1641】

いくつかの実施形態では、TIL及びPD-1阻害剤は、NSCLCの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【1642】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、PD-1 阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、本明細書に記載の TIL と併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【1643】

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、バリエーション、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。

10

【1644】

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。

20

【1645】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 100 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 90 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 80 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 70 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 60 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 50 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 40 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 30 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 20 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 10 pM 以下の KD で結合する、またはヒト PD-1 に約 1 pM 以下の KD で結合するものである。

30

【1646】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $8 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $8.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $9 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $9.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 $1 \times 10^6 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合するものである。

【1647】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 $2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.1 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.4 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.5 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.6 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 $2.7 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.8 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.9 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 $3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合するものである。

40

50

【1648】

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。

10

【1649】

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、もしくはバリエーションである。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'における重鎖内ジスルフィド結合；23'-88'、134'-194'、23'-88'、及び134'-194'における軽鎖内ジスルフィド結合；127-214'、127'-214'における重鎖-軽鎖間ジスルフィド結合；219-219'及び222-222'における重鎖-重鎖間ジスルフィド結合；ならびに290、290'におけるN-グリコシル化部位(H-CH284.4)を有する。

20

30

40

【1650】

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)、バリエーション、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

50

列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1651】

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、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 99% 同一である 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。

【1652】

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。

【1653】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 PD-1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-1 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 PD-1 抗体であり、抗 PD-1 抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。抗 PD-1 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

10

20

30

40

50

【表 1 8】

表 1 8. 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 1 5 8 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGKSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPCCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440	10
配列番号 1 5 9 ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTEFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE 214	
配列番号 1 6 0 ニボルマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGKSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTTLVT VSS 113	
配列番号 1 6 1 ニボルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTEFGQ GTKVEIK 107	
配列番号 1 6 2 ニボルマブ 重鎖 CDR 1	NSGMH 5	20
配列番号 1 6 3 ニボルマブ 重鎖 CDR 2	VIWYDGSKRY YADSVKG 17	
配列番号 1 6 4 ニボルマブ 重鎖 CDR 3	NDDY 4	
配列番号 1 6 5 ニボルマブ 軽鎖 CDR 1	RASQSVSSYL A 11	
配列番号 1 6 6 ニボルマブ 軽鎖 CDR 2	DASNRAT 7	30
配列番号 1 6 7 ニボルマブ 軽鎖 CDR 3	QQSSNWPR 9	

【1 6 5 4】

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 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/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 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、3、4、または 5 日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、または 3 日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前 1、2、3、4、または 5 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前 1、2、または 3 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

20

30

40

50

【1655】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1656】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1657】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、約1mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240mgを2週間毎、または480mgを4週間毎に投与される。

30

【1658】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1659】

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

50

チナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約240mgまたは4週間毎に480mg投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1660】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1661】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、3週間毎に約360mg/kg、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1662】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約1mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約1mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240mgを2週間毎、480mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1663】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは

10

20

30

40

50

、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1664】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1665】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1666】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性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、40kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1667】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40 kg未満の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、2週間毎に約3 mg/kgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40 kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ1 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240 mg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、40 kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ1 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで480 mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1668】

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240 mg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480 mg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1 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240 mg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1 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで480 mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

30

【1669】

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240 mg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480 mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1670】

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、複合体、もしくはバリエーションを含む。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

50

マブは、免疫グロブリンG4、抗（ヒトタンパク質PD-1（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、Fuert, 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（GOF）である。

10

20

30

40

50

【1671】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号168によって与えられる重鎖及び配列番号169によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、それぞれ、配列番号168及び配列番号169に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、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168及び配列番号169に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号168及び配列番号169に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1672】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤重鎖可変領域（VH）は、配列番号170に示される配列を含み、PD-1阻害剤軽鎖可変領域（VL）は、配列番号171に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号170及び配列番号171に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号170及び配列番号

171に示される配列と少なくとも98%同一である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。

【1673】

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。

【1674】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-1抗体であり、抗PD-1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。抗PD-1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。

10

20

30

40

50

【表 19】

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	NYMYWVRQA	PGQGLEWMGG	INPSNGGTNF		60
	NEKFKNRVTL	TTDSSTTTAY	MELKSLQFDD	TAVYYCARRD	YRFDMGFDYW	GQGTTVTVSS		120
	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS		180
	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPPCP	APEFLGGPSV		240
	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY		300
	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK		360
	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG		420
	NVFSCSVME	ALHNHYTQKS	LSLSLGK					447
配列番号 169 ペムブロリズ マブ軽鎖	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASKGVS	TSGYSYLHWY	QKPGQAPRL	LIYLASYLES		60
	GVPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY	YCQHSRDLPL	TFGGGTKVEI	KRTVAAPSVF		120
	IFPPSDEQLK	SGTASVCLL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS		180
	STLTLSKADY	EKKHKVACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC				218
配列番号 170 ペムブロリズ マブ可変重鎖	QVQLVQSGVE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	NYMYWVRQA	PGQGLEWMGG	INPSNGGTNF		60
	NEKFKNRVTL	TTDSSTTTAY	MELKSLQFDD	TAVYYCARRD	YRFDMGFDYW	GQGTTVTVSS		120
配列番号 171 ペムブロリズ マブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASKGVS	TSGYSYLHWY	QKPGQAPRL	LIYLASYLES		60
	GVPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY	YCQHSRDLPL	TFGGGTKVEI	K		111
配列番号 172 ペムブロリズマ ブ重鎖 CDR1	NYMY							5
配列番号 173 ペムブロリズマ ブ重鎖 CDR 2	GINPSNGGTN FNEKFK							16
配列番号 174 ペムブロリズマ ブ重鎖 CDR 3	RDYRFDMGFD Y							11
配列番号 175 ペムブロリズマ ブ軽鎖 CDR 1	RASKGVSTSG YSYLH							15
配列番号 176 ペムブロリズマ ブ軽鎖 CDR 2	LASYLES							7
配列番号 177 ペムブロリズマ ブ軽鎖 CDR 3	QHSRDLPLT							9

【1675】

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 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/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 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、3、4、または 5 日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、または 3 日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前 1、2、3、4、または 5 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前 1、2、または 3 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1676】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1677】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1678】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1679】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1680】

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

50

ブは、SCLCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1681】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1682】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1683】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1684】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-Hま

たはdMMR癌を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-HまたはdMMR癌を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1685】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損結腸直腸癌（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、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1686】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1687】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1688】

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

50

に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1689】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（HCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1690】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（MCC）を治療するために、成人の場合、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1691】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（RCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、RCCを治療するために、6週間毎に約400mgで、経口で1日2回のアキシチニブ5mgとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1692】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、MSI-HまたはdMMRではない腫瘍に対して、6週間毎に約400mgで、経口で1日1回のレンパチニブ20mgとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1693】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高遺伝子変異量（TMB-H）癌を治療するために、成人の場合、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1694】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌（cSCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、cSCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1695】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TNBCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1696】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び6週間毎の400mgの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施

50

形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1697】

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）（Bio X 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。

10

【1698】

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2013/0108651 A1号、同第2013/0109843 A2号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,287,856号、同第8,580,247号、及び同第8,168,757号、ならびに米国特許出願公開第2009/0028857 A1号、同第2010/0285013 A1号、同第2013/0022600 A1号、及び同第2011/0008369 A1号に記載されている抗PD-1抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,735,553 B1号に開示されている抗PD-1抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、CT-011としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第8,686,119号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【1699】

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ンプリマブである。

30

40

【1700】

いくつかの実施形態では、TIL及びPD-L1阻害剤またはPD-L2阻害剤は、NSCLCの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【1701】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤またはPD-L2阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤またはPD-L2阻害剤

50

は、本明細書に記載の T I L と併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【1702】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 または P D - L 2 阻害剤は、当該技術分野で知られている任意の P D - L 1 もしくは P D - L 2 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 P D - L 1 もしくは P D - L 2 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、P D - L 1 及び P D - L 2 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 P D - L 1 または P D - L 2 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、バリエーション、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、P D - L 1 または P D - L 2 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。

10

【1703】

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、P D - L 1 または P D - L 2 阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、P D - L 1 または P D - L 2 阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、P D - L 1 または P D - L 2 阻害剤は、抗体（すなわち、抗 P D - 1 抗体）、F a b 断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（s c F v）である。いくつかの実施形態では、P D - L 1 または P D - L 2 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、P D - L 1 または P D - L 2 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、P D - L 1 または P D - L 2 阻害剤は、P D - L 1 もしくは P D - L 2 との結合について競合し、及び／または P D - L 1 もしくは P D - L 2 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、P D - L 1 もしくは P D - L 2 との結合について競合し、及び／または P D - L 1 もしくは P D - L 2 上のエピトープに結合する。

20

【1704】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される P D - L 1 阻害剤は、化合物が、P D - L 2 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 P D - L 1 と結合または相互作用するという点で、P D - L 1 に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、P D - L 2 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 P D - L 1 受容体に結合する。

30

【1705】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される P D - L 2 阻害剤は、化合物が、P D - L 1 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 P D - L 2 と結合または相互作用するという点で、P D - L 2 に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、P D - L 1 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 P D - L 2 受容体に結合する。

40

【1706】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞は P D - L 1 を発現し、T 細胞は P D - 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 P D - L 1 の発現は、P D - 1 または P D - L 1 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、P D - L 1 を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、P D - L 1 を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、T I L と組み合わせて、本明細書に記載されるものなどの P D - 1 及び P D - L 1 抗体の組み合わせを含むことができる。P D - 1 及び P D - L 1 抗体と T I L との組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

50

【1707】

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100 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約90 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約80 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約70 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約60 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約50 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び／またはPD-L2に約40 pM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30 pM以下のKDで結合するものである。

10

【1708】

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／もしくはPD-L2に約 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／もしくはPD-L2に約 $8 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／もしくはPD-L2に約 $8.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／もしくはPD-L2に約 $9 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトPD-L1及び／もしくはPD-L2に約 $9.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、またはヒトPD-L1及び／もしくはPD-L2に約 $1 \times 10^6 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合するものである。

20

【1709】

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 $2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1に約 $2.1 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1に約 $2.2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1に約 $2.3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1に約 $2.4 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1に約 $2.5 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1に約 $2.6 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトPD-L1もしくはPD-L1に約 $2.7 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 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 $3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合するものである。

30

【1710】

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10 nM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9 nM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8 nM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7 nM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6 nM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5 nM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4 nM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3 nM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2 nM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1 nM以下のIC50でのヒトPD-1へのヒトPD-L1もしくはヒトPD-L2の結合を遮断するものである。

40

【1711】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MED14736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MedImm

50

une, 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、もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、米国特許第 8,779,108 号または米国特許出願公開第 2013/0034559 号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Page, et al., Rev. Med., 2014, 65, 185-202、Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (補足、要約 8021)、及び 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'''、135'-195'、135'''-195'''、148-204、148'-204'、215'-224、215'''-224'''、230-230'、233-233'、265-325、265'-325'、371-429、及び 371'-429' におけるジスルフィド結合、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。

10

20

30

40

50

【1712】

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)、バリエーション、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。

【1713】

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。

【1714】

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。

【1715】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

10

20

30

40

50

【表 20】

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 IKQDGESEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEIAFDY WGQGTILTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNNH TQKSLSLSPG K 451
配列番号 179 デュルバルマブ軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQKVS SSVLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSIPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TSLKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK 265
配列番号 180 デュルバルマブ可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGESEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEIAFDY WGQGTILTVS 120 S 121
配列番号 181 デュルバルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQKVS SSVLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSIPWTFG QGTKVEIK 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	NIKQDGESEKY 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	QQYGSIPWT 9

【1716】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、MSB0010718C (Merck KGaA / 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、もしくはバリエーションである。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'-428' 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 (C23-C104)；223-215' 及び 223'-215' における重鎖-軽鎖内ジスルフィド結合 (h5-CL126)；229-229' 及び 232-232' における重鎖-重鎖内ジスルフィド結合 (h11、h14)；300、300' における N-グリコシル化部位 (HCH2N84.4)；フコシル化複合体二分性 CHO 型グリカン；ならびに 450 及び 450' における HCHSK2 C 末端リジンクリッピングを有する。

【1717】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号188によって与えられる重鎖及び配列番号189によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号188及び配列番号189に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scfv)、バリエーション、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。

10

20

30

40

50

【1718】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号190に示される配列を含み、PD-L1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号191に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号190及び配列番号191に示される配列と少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

【1719】

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。

【1720】

いくつかの複合体実施形態では、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。いくつかの複合体実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗PD-

L 1 抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合の E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

【表 2 1】

表 2 1. アベルマブに関連する P D - L 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 1 8 8 アベルマブ重鎖	EVOLLESGGG LVOPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVROA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTSLTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKHTTCP PCPAPPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 1 8 9 アベルマブ軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMY YDVSNRPSGV 60 SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
配列番号 1 9 0 アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVROA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTSLTVSS 120
配列番号 1 9 1 アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMY YDVSNRPSGV 60 SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGKVTVL 110
配列番号 1 9 2 アベルマブ 重鎖 C D R 1	SYIMM 5
配列番号 1 9 3 アベルマブ 重鎖 C D R 2	SIYPSGGITF YADTVKG 17
配列番号 1 9 4 アベルマブ 重鎖 C D R 3	IKLGTVTVD Y 11
配列番号 1 9 5 アベルマブ 軽鎖 C D R 1	TGTSSDVGKY NYVS 14
配列番号 1 9 6 アベルマブ 軽鎖 C D R 2	DVSNRPS 7
配列番号 1 9 7 アベルマブ 軽鎖 C D R 3	SSYTSSSTRV 10

【1 7 2 1】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、M P D L 3 2 8 0 A または R G 7 4 4 6 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 T E C E N T R I Q として市販されている)、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、米国特許第 8, 2 1 7, 1 4 9 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、P D - L 1 阻害剤は、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 0 3 0 5 6 A 1 号、同第 2 0 1 3 / 0 0 4 5 2 0 0 A 1 号、同第 2 0 1 3 / 0 0 4 5 2 0

1 A 1 号、同第 2 0 1 3 / 0 0 4 5 2 0 2 A 1 号、または同第 2 0 1 4 / 0 0 6 5 1 3 5 A 1 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 , 2 1 7 , 1 4 9 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 2 2 に示す。アテゾリズマブは、2 2 - 9 6、1 4 5 - 2 0 1、2 6 2 - 3 2 2、3 6 8 - 4 2 6、2 2 ' ' - 9 6 ' '、1 4 5 ' ' - 2 0 1 ' '、2 6 2 ' ' - 3 2 2 ' '、及び 3 6 8 ' ' - 4 2 6 ' ' における重鎖内ジスルフィド結合 (C 2 3 - C 1 0 4) ; 2 3 ' - 8 8 '、1 3 4 ' - 1 9 4 '、2 3 ' ' ' - 8 8 ' ' '、及び 1 3 4 ' ' ' - 1 9 4 ' ' ' における軽鎖内ジスルフィド結合 (C 2 3 - C 1 0 4) ; 2 2 1 - 2 1 4 ' 及び 2 2 1 ' ' - 2 1 4 ' ' ' における重鎖 - 軽鎖内ジスルフィド結合 (h 5 - C L 1 2 6) ; 2 2 7 - 2 2 7 ' ' 及び 2 3 0 - 2 3 0 ' ' における重鎖 - 重鎖内ジスルフィド結合 (h 1 1、h 1 4) ; ならびに 2 9 8 及び 2 9 8 ' における N - グリコシル化部位 (H C H 2 N 8 4 . 4 > A) を有する。

10

【1 7 2 2】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、配列番号 1 9 8 によって与えられる重鎖及び配列番号 1 9 9 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、P D - L 1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 1 9 8 及び配列番号 1 9 9 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、F a b 断片、一本鎖可変断片 (s c F v)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 9 8 及び配列番号 1 9 9 に示される配列と少なくとも 9 9 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 9 8 及び配列番号 1 9 9 に示される配列と少なくとも 9 8 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 9 8 及び配列番号 1 9 9 に示される配列と少なくとも 9 7 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 9 8 及び配列番号 1 9 9 に示される配列と少なくとも 9 6 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 9 8 及び配列番号 1 9 9 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

20

【1 7 2 3】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖 C D R または可変領域 (V R) を含む。いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 2 0 0 に示される配列を含み、P D - L 1 阻害剤軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 2 0 1 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 0 0 及び配列番号 2 0 1 に示される配列と少なくとも 9 9 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 0 0 及び配列番号 2 0 1 に示される配列と少なくとも 9 8 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 0 0 及び配列番号 2 0 1 に示される配列と少なくとも 9 7 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 0 0 及び配列番号 2 0 1 に示される配列と少なくとも 9 6 % 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、P D - L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 0 0 及び配列番号 2 0 1 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V H 及び V L 領域を含む。

30

40

【1 7 2 4】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 2 0 2、配列番号 2 0 3、及び配列番号 2 0 4 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 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 2 0 5、配列番号 2 0 6、及び配列番号 2 0 7 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 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

50

、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。

【1725】

いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリ
10
コシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾ
20
リズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテ
30
ゾリズマブである。

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2. アテゾリズマブに関連する P D - L 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 1 9 8 アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHVVRQA PGKGLEWVAV ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 1 9 9 アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
配列番号 2 0 0 アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHVVRQA PGKGLEWVAV ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
配列番号 2 0 1 アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 2 0 2 アテゾリズマブ 重鎖 C D R 1	GFTFSDSWIH 10
配列番号 2 0 3 アテゾリズマブ 重鎖 C D R 2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号 2 0 4 アテゾリズマブ 重鎖 C D R 3	RHWPGGFDY 9
配列番号 2 0 5 アテゾリズマブ 軽鎖 C D R 1	RASQDVSTAV A 11
配列番号 2 0 6 アテゾリズマブ 軽鎖 C D R 2	SASFLYS 7
配列番号 2 0 7 アテゾリズマブ 軽鎖 C D R 3	QQYLYHPAT 9

【1 7 2 6】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 4 / 0 3 4 1 9 1 7 A 1 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、P D - L 1 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 P D - L 1 抗体は、B M S - 9 3 5 5 5 9 としても知られる M D X - 1 1 0 5 であり、これは米国特許第 7 , 9 4 3 , 7 4 3 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 P D - L 1 抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7 , 9 4 3 , 7 4 3 号に開示されている抗 P D - L 1 抗体から選択される。

【1 7 2 7】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、I N V I V O M A B 抗 m - P D - L 1 クローン 1 0 F . 9 G 2 （カタログ番号 B E 0 1 0 1、B i o X C e l l , I n c . , W e s t L e b a n o n , N H , U S A ）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 P D - L 1 抗体は、A F F Y M E T R I X E B I O S C I E N C E （M I H 1）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 P D - L 1 抗体が、当業者に知られている。

【1728】

いくつかの実施形態では、PD-L2阻害剤は、BIOLEGEND 24F.10C12マウスIgG2a、κアイソタイプ（カタログ番号329602 Biolegend, Inc., San Diego, CA）、SIGMA抗PD-L2抗体（カタログ番号SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO）、または当業者に知られている他の市販のPD-L2抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【1729】

6. CTLA-4阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、治療的TIL集合単独による治療を含んでもよく、またはTIL及び1つ以上のCTLA-4阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1730】

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。

【1731】

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、バリエーション、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。

【1732】

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EP 1212422 B1号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるCTLA-4抗体は、米国特許第5,811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号、及び同第6,984,720号、PCT公開第WO01/14424号及び同第WO00/37504号、ならびに米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086

10

20

30

40

50

014号に記載されており、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で 사용할 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。

10

【1733】

さらなるCTLA-4阻害剤には、CD28抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、CTLA-4がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してT細胞応答を増強すること、B7がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、B7が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、CD80がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、CD80が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、CD86がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、CD86が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向するアドネクチン、他のCTLA-4阻害剤のなかでも共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4のRNAi阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）が必ず含まれる。

20

【1734】

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、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で、CTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのKdの10倍以下のKdでCTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い）のKdでCTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CD80またはCD86とのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれCD80またはCD86とのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介阻害より10倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、CD80またはCD86とのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれCD80またはCD86とのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下（例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い）である。

30

40

【1735】

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する。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、

50

少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%、例えば、50%～75%、75%～90%、または90%～100%の間でCTLA-4のCD80、CD86、またはその両方との結合を減少させることにより、CTLA-4の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象となる薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、対象となる薬剤、例えば、CTLA-4経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（または僅かな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的システム（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。

10

【1736】

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、もしくはバリエーションである。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。イムピリムマブは、静脈内（IV）投与され得る。

20

【1737】

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）、バリエーション、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。

30

40

【1738】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤重鎖可変領域（VH）は、配列番号210に示される配列を含み、CTLA-4阻害剤軽鎖可変領域（VL）は、配列番号211に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号210及び配列番号211に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号

50

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。

【1739】

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。

【1740】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認されたCTLA-4バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、抗CTLA-4抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表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バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。抗CTLA-4抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3. 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 2 0 8 イピリムマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSRLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNKKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
配列番号 2 0 9 イピリムマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTVKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL 180 TLSKADYEKH KVVACEVTHQ GLSSPVTKEF NRGEC 215
配列番号 2 1 0 イピリムマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSRLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNKKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 2 1 1 イピリムマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTVKVEIK 108
配列番号 2 1 2 イピリムマブ 重鎖 CDR 1	GFTTFSSYT 8
配列番号 2 1 3 イピリムマブ 重鎖 CDR 2	TFISYDGNKK 10
配列番号 2 1 4 イピリムマブ 重鎖 CDR 3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号 2 1 5 イピリムマブ 軽鎖 CDR 1	QSVGSSY 7
配列番号 2 1 6 イピリムマブ 軽鎖 CDR 2	GAF 3
配列番号 2 1 7 イピリムマブ 軽鎖 CDR 3	QQYGSSPWT 9

【1 7 4 1】

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 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/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 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/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。

【1 7 4 2】

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 200 mg ~ 約 500 mg 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。

【1743】

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。

10

【1744】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、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、6週間毎に約0.5mg/kg～3mg/kgで投与される。例示的な実施形態では、イピリムマブは、6週間毎に約1mg/kgで投与される。例示的な実施形態では、イピリムマブは、6週間毎に約1mg/kgで、ニボルマブとともに、3週間毎に約360mgで、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、中皮腫は、悪性胸膜中皮腫である。

20

【1745】

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。

【1746】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、約10mg/kgで3週間毎に4用量、続いて10mg/kgで12週間毎に最大3年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

30

【1747】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約1mg/kgで投与され、直後に同じ日にニボルマブ3mg/kgを3週間毎に4用量投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与される。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。

40

【1748】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与

50

される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約1mg/kgで静脈内に30分間にわたって投与され、直後に同じ日にイピリムマブ3mg/kgを静脈内に30分間にわたって3週間毎に4用量投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性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単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

10

【1749】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、約3mg/kgで静脈内に30分間にわたって投与され、直後に同じ日にニボルマブ1mg/kgを静脈内に30分間にわたって3週間毎に4用量投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

20

【1750】

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。

30

【1751】

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。

40

【1752】

トレメリムマブ（CP-675, 206としても知られる）は、完全ヒトIgG2モノクローナル抗体であり、CAS番号745013-59-6を有する。トレメリムマブは、米国特許第6,682,736号（参照により本明細書に組み込まれる）において抗体11.2.1として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号218及び219に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、0.01及び15mg/kgの用量範囲で4週間または12週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの

50

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。

【1753】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号218によって与えられる重鎖及び配列番号219によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、それぞれ、配列番号218及び配列番号219に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、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。

【1754】

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領域及びV_L領域を含む。

【1755】

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。

【1756】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗CTLA-4バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または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バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、抗CTLA-4抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表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バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。抗CTLA-4抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。

10

【表24】

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 VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWDGSKNYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPPSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVKRCCKVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAEWESNGQ PENNYKTPP MLDSDGSEFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNNH 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 LSASVGRVT ITCRASQSN SYLDWYQQKPK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	60 120 180 214
配列番号220 トレメリムマブ 可変重鎖	GVVQPGKSLR LSCAASGFTF SSGMHWVRQ APGKLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT ISRDNKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH	60 120 167
配列番号221 トレメリムマブ 可変軽鎖	PSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS GTDFTLTIS LQPEDFATYY CQYYSTPFT FGPSTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREKV	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 YGMDV	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	QYYSTPFT	9

20

30

40

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。

10

【1758】

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。

20

【1759】

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。

30

【1760】

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、もしくはバリエーションである。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US2020/0024350 A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【1761】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号228によって与えられる重鎖及び配列番号229によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(s c F v)、バリエーション、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、

50

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。

【1762】

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 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 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 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 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 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 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 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 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 領域及び V_L 領域を含む。

【1763】

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。

【1764】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認された CTLA-4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、抗 CTLA-4 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表 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バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。抗 CTLA-4 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。

【表 2 5】

表 2 5. 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 2 2 8 ザリフレリマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS 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 SLSPGK 448
配列番号 2 2 9 ザリフレリマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKPGAPRLIYG ASTRATGIPD 60 RFGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
配列番号 2 3 0 ザリフレリマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
配列番号 2 3 1 ザリフレリマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKPGAPRLIYG ASTRATGIPD 60 RFGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
配列番号 2 3 2 ザリフレリマブ 重鎖 C D R 1	GFTFSSYS 8
配列番号 2 3 3 ザリフレリマブ 重鎖 C D R 2	ISSSSSYI 8
配列番号 2 3 4 ザリフレリマブ 重鎖 C D R 3	ARVGLMGPF D I 11
配列番号 2 3 5 ザリフレリマブ 軽鎖 C D R 1	QSVSRY 6
配列番号 2 3 6 ザリフレリマブ 軽鎖 C D R 2	GAS 3
配列番号 2 3 7 ザリフレリマブ 軽鎖 C D R 3	QQYGSSPWT 9

10

20

30

【1 7 6 5】

さらなる抗 C T L A - 4 抗体の例には、A G E N 1 1 8 1、B M S - 9 8 6 2 1 8、B C D - 1 4 5、O N C - 3 9 2、C S 1 0 0 2、R E G N 4 6 5 9、及び A D G 1 1 6 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。

【1 7 6 6】

いくつかの実施形態では、抗 C T L A - 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 C T L A - 4 抗体である：U S 2 0 1 9 / 0 0 4 8 0 9 6 A 1、U S 2 0 2 0 / 0 2 2 3 9 0 7、U S 2 0 1 9 / 0 2 0 1 3 3 4、U S 2 0 1 9 / 0 2 0 1 3 3 4、U S 2 0 0 5 / 0 2 0 1 9 9 4、E P 1 2 1 2 4 2 2 B 1、W O 2 0 1 8 / 2 0 4 7 6 0、W O 2 0 1 8 / 2 0 4 7 6 0、W O 2 0 0 1 / 0 1 4 4 2 4、W O 2 0 0 4 / 0 3 5 6 0 7、W O 2 0 0 3 / 0 8 6 4 5 9、W O 2 0 1 2 / 1 2 0 1 2 5、W O 2 0 0 0 / 0 3 7 5 0 4、W O 2 0 0 9 / 1 0 0 1 4 0、W O 2 0 0 6 / 0 9 6 4 9、W O 2 0 0 5 / 0 9 2 3 8 0、W O 2 0 0 7 / 1 2 3 7 3 7、W O 2 0 0 6 / 0 2 9 2 1 9、W O 2 0 1 0 / 0 9 7 9 5 9 7、W O 2 0 0 6 / 1 2 1 6 8、及び W O 1 9 9 7 / 0 2 0 5 7 4（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 C T L A - 4 抗体は、米国特許第 5, 8 1 1, 0 9 7 号、同第 5, 8 5 5, 8 8 7 号、同第 6, 0 5 1, 2 2 7 号、及び同第 6, 9 8 4, 7 2 0 号、P C T 公開第 W O 0 1 / 1 4 4 2 4 号及び同第 W O 0 0 /

40

50

37504号、ならびに米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086014号、及び／または米国特許第5,977,318号、同第6,682,736号、同第7,109,003号、及び同第7,132,281号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗CTLA-4抗体は、例えば、WO98/42752、米国特許第6,682,736号及び同第6,207,156号、Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998 (95): 10067-10071 (1998)、Camacho et al., J. Clin. Oncol., 2004, 22, 145 (Abstract No. 2505 (2004) (抗体CP-675206)、またはMokyr, et al., Cancer Res., 1998, 58, 5301-5304 (1998)に開示されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1767】

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。

【1768】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、CTLA-4発現の核酸阻害剤である。例えば、抗CTLA-4RNAi分子は、PCT公開第WO1999/032619及びWO2001/029058、米国公開第2003/0051263号、同第2003/0055020号、同第2003/0056235号、同第2004/265839号、同第2005/0100913号、同第2006/0024798号、同第2008/0050342号、同第2008/0081373号、同第2008/0248576号、同第2008/055443号、及び／または米国特許第6,506,559号、同第7,282,564号、同第7,538,095号、及び同第7,560,438号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗CTLA-4RNAi分子は、欧州特許第EP1309726号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖RNAi分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗CTLA-4RNAi分子は、米国特許第7,056,704号及び同第7,078,196号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖RNAi分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、国際特許出願公開第WO2004/081021（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたアプタマーである。

20

30

【1769】

他の実施形態では、本発明の抗CTLA-4RNAi分子は、米国特許第5,898,031号、同第6,107,094号、同第7,432,249号、及び同第7,432,250号、ならびに欧州出願第EP0928290号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載されたRNA分子である。

【1770】

7. BRAF阻害剤との組み合わせ

上記の実施形態のうちのいずれかによれば、V600変異を有するがんを有する患者に提供されるTIL療法は、TIL単独の治療集団による治療を含んでもよく、またはTIL及び1種以上のBRAF阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。例示的な実施形態では、併用治療は、1種以上のMEK阻害剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有するがんである。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有する黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有する結腸癌である。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有する非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態では、変異は、V600E変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600K変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600R変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V600D変異である。

40

【1771】

例示的な実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、自家TIL治療薬が由来するソ

50

ース腫瘍の切除前に患者に提供される。いかなる特定の操作理論にも拘束されることなく、ソース腫瘍の切除前のBRAF治療は、腫瘍から取得されるTILの抗原リモデリングをもたらし、したがって、本明細書で提供されるTIL療法における拡張及び下流使用のためのより堅牢なTILを提供すると考えられる。いくつかの実施形態では、患者には、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日間、1種以上のBRAF阻害剤が提供される。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4週間、1種以上のBRAF阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月間、1種以上のBRAF阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年間、1種以上のBRAF阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、ソース腫瘍の切除後に提供される。

10

【1772】

いくつかの実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入により患者に提供される。いくつかの実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入と同時に患者に提供されない。いくつかの実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入と同時に患者に提供され、TIL注入後にも提供される。特定の実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、または24時間後に患者に提供される。ある特定の実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、または7日後に患者に提供される。ある特定の実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、または7日後に患者に提供される。例示的な実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入の約1、2、3、または4週間後に患者に提供される。特定の実施形態では、1種以上のBRAF阻害剤は、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、対象TIL治療を投与された患者は、1種以上のBRAF阻害剤を以前に投与され、治療後も1種以上のBRAF阻害剤を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象TIL治療を受けた後、少なくとも1、2、3、または4週間、BRAF阻害剤治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象TIL治療を受けた後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月間、BRAF阻害剤治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象TIL治療を受けた後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年間、BRAF阻害剤治療を受け続ける。

20

30

【1773】

BRAF遺伝子の活性化変異は、黒色腫において最も頻度の高い遺伝的改変である。BRAF変異は、皮膚黒色腫の約50%及び粘膜黒色腫の症例の10~20%において観察される。BRAF遺伝子は、成長シグナル形質導入タンパク質キナーゼのRafキナーゼファミリーのメンバーである、B-Rafをコードする。B-Rafは、766アミノ酸の、制御されたシグナル形質導入セリン／スレオニン特異的タンパク質キナーゼである。B-Rafは、一般に、3つの保存ドメインを含む：a) 保存領域1 (CR1)、Ras-GTP結合自己調節ドメイン；b) 保存領域2 (CR2)、セリンリッチヒンジ領域；及びc) 保存領域3 (CR3)、タンパク質基質上のコンセンサス配列をリン酸化する触媒タンパク質キナドメイン。その能動的確認では、B-Rafは、そのキナーゼドメインの水素結合及び静電相互作用を介して二量体を形成する。

40

【1774】

このタンパク質は、細胞分裂、分化、及び分泌に影響を与えるMAPキナーゼ／ERKシグナル伝達経路を調節する役割を果たす。BRAF遺伝子変異は、BRAFタンパク質の活性を増加させ、MAPK経路の下流シグナル伝達を増加させ、腫瘍の成長につながる。BRAF遺伝子変異を有する黒色腫のおよそ90%では、バリンは、600コドン (V

50

600E) のグルタミン酸で置換されており、リジン (V600K) アルギニン (V600R) またはアスパラギン酸 (V600D) で置換される頻度は低い。

【1775】

本明細書で使用される場合、「B-r a f 阻害剤」または「B R A F 阻害剤」は、B-r a f、ならびに他の野生型または変異体 R a f セリン／スレオニンタンパク質キナーゼファミリーメンバー (R a f-1 / c-R a f、及び／または A-R a f を含む) の生物学的活性を阻害する阻害剤を含む、野生型または B-r a f の任意の変異体形態の生物学的活性の任意の阻害剤である。B-r a f 阻害剤は、V E G F R-2 及び／または c-k i t をさらに阻害し得る。活性は、例えば、適切な対照と比較して、B-r a f の活性の少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、95 % または 100 % の減少を含む、統計的に有意な量で減少し得る。

10

【1776】

B R A F 阻害剤には、ベムラフェニブ (Z e l b o r a f (登録商標)、P L X 4 0 3 2、R G 7 2 0 4、及び R O 5 1 8 5 4 2 6)、ダブラフェニブ (T a f i n l a r (登録商標)、G S K 2 1 1 8 4 3 6)、エンコラフェニブ (L G X 8 1 8、B r a f t o v i (登録商標))、ソラフェニブ (N e x a v a r (登録商標))、G D C-0 8 7 9、P L X-4 7 2 0、及びその薬学的に許容される塩が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、B R A F 阻害剤は、B R A F の能動的確認のために A T P 結合ポケットに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、B R A F 阻害剤は、B R A F V 6 0 0 E に対する選好の増加を有する。ベムラフェニブ (例えば、T s a i e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U. S. A. 2 0 0 8, 1 0 5: 3 0 4 1-3 0 4 6 を参照)、ダブラフェニブ (例えば、R h e a u l t e t a l., A C S M e d. C h e m. L e t t. 2 0 1 3, 4: 3 5 8-3 6 2 を参照)、及びエンコラフェニブ (例えば、K o e l b l i n g e r e t a l., C u r r. O p i n. O n c o l. 2 0 1 8, 3 0: 1 2 5-1 3 3 を参照) は、変異体 B R A F におけるキナーゼドメインの例示的な阻害剤であり、それによって下流の M A P K 経路シグナル伝達を不活性化して、B R A F 変異体黒色腫を有する患者における腫瘍成長を防止する。

20

【1777】

いくつかの実施形態では、B R A F 阻害剤は、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、約 100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、400 mg、450 mg、500 mg、550 mg、600 mg、650 mg、700 mg、750 mg、800 mg、850 mg、900 mg、950 mg、1 日 1, 000 mg、1, 100 mg、1, 200 mg、1, 300 mg、1, 400 mg、1, 500 mg、1, 600 mg、1, 700 mg、1, 800 mg、1, 900 mg、または 2, 000 mg の投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、少なくとも 100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、400 mg、450 mg、500 mg、550 mg、600 mg、650 mg、700 mg、750 mg、800 mg、850 mg、900 mg、950 mg、1 日 1, 000 mg、1, 100 mg、1, 200 mg、1, 300 mg、1, 400 mg、1, 500 mg、1, 600 mg、1, 700 mg、1, 800 mg、1, 900 mg、または 2, 000 mg の投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、ベムラフェニブは、1 日 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回または 10 回摂取または提供される。例示的な実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1 日 2 回、約 950 mg の投与量で摂取または提供される。

30

40

【1778】

いくつかの実施形態では、B R A F 阻害剤は、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1 日約 100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、400

50

mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mgまたは1,000mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mgまたは1,000mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、ダブラフェニブは、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回摂取される。例示的な実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、約150mgの投与量で1日2回摂取される。いくつかの実施形態では、BRAF阻害剤は、メシル酸ダブラフェニブである。いくつかの実施形態では、メシル酸ダブラフェニブは、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、または1,000mgの投与量で提供される。いくつかの実施形態では、メシル酸ダブラフェニブは、1日少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、または1,000mgの投与量で提供される。いくつかの実施形態では、ダブラフェニブは、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回摂取される。例示的な実施形態では、メシル酸ダブラフェニブは、約150mgの投与量で1日2回提供される。

10

20

【1779】

ある特定の実施形態では、BRAF阻害剤は、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、または1,000mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、または1,000mgの投与量で摂取または提供される。例示的な実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約450mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブは、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回摂取または提供される。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約300mgの投与量で摂取または提供される。

30

【1780】

いくつかの実施形態では、BRAF阻害剤は、ソラフェニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、BRAF阻害剤は、GDC-0879またはその薬学的に許容される塩である。例示的な実施形態では、BRAF阻害剤は、PLX-4720またはその薬学的に許容される塩である。

40

【1781】

8. MEK阻害剤との組み合わせ

いくつかの実施形態では、BRAFタンパク質のV600変異を有するがんを有する患者に提供されるTIL療法は、治療的TIL集合単独による治療を含んでもよく、またはTIL及び1種以上のMEK阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。例示的な実施形態では、併用治療は、1種以上のBRAF阻害剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有するがんである。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有する黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、V600変異を有する結腸

50

癌である。いくつかの実施形態では、がんは、V 6 0 0 変異を有する非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態では、変異は、V 6 0 0 E 変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V 6 0 0 K 変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V 6 0 0 R 変異である。いくつかの実施形態では、変異は、V 6 0 0 D 変異である。

【1 7 8 2】

例示的な実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、自家 T I L 治療薬が由来するソース腫瘍の切除前に患者に提供される。いかなる特定の操作理論にも拘束されることなく、ソース腫瘍の切除前の M E K 治療は、腫瘍から取得される T I L の抗原リモデリングをもたらし、したがって、本明細書で提供される T I L 療法における拡張及び下流使用のためにより堅牢な T I L を提供すると考えられる。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも 1、2、3、4、5、6、または 7 日間、1 種以上の M E K 阻害剤を提供されている。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも 1、2、3、4 週間、1 種以上の M E K 阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 ヶ月間、1 種以上の M E K 阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 年間、1 種以上の M E K 阻害剤を受けた。いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、ソース腫瘍の切除後に提供される。

【1 7 8 3】

いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入により患者に提供される。いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入と同時に患者に提供されない。いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入と同時に患者に提供され、T I L 注入後にも提供される。特定の実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入の約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、または 24 時間後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入の約 1、2、3、4、5、6、または 7 日後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入の約 1、2、3、または 4 週間後に患者に提供される。特定の実施形態では、1 種以上の M E K 阻害剤は、T I L 注入の約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 ヶ月後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、対象 T I L 治療を投与された患者は、1 種以上の M E K 阻害剤を以前に投与され、治療後も 1 種以上の M E K 阻害剤を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象 T I L 治療を受けた後、少なくとも 1、2、3、または 4 週間、M E K 阻害剤治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象 T I L 治療を受けた後、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 12 ヶ月間、M E K 阻害剤治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象 T I L 治療を受けた後、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 年間、M E K 阻害剤治療を受け続ける。

【1 7 8 4】

M E K は、活性化に必要な E R K 1 及び 2 上のチロシン及びスレオニン残基をリン酸化する二重特異性キナーゼである。2 つの関連遺伝子は、M E K 1 及び M E K 2 をコードし、それらの E R K への結合及び恐らくそれらの活性化プロファイルが異なる。M E K は、R a f (c -、A - 及び B -)、M o s、T p l - 2、ならびに M E K K 1 を含むいくつかのタンパク質キナーゼの基質である。

【1 7 8 5】

本明細書で使用される場合、「M E K 阻害剤」は、M E K (M E K 1 及び / または M E K 2) の生物学的活性のうちの 1 つ以上を低減、阻害、または他の方法で減少させる分子である。活性は、例えば、適切な対照と比較して、M E K の活性の少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、6

10

20

30

40

50

0 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、95 %または100 %の減少を含む、統計的に有意な量で減少し得る。

【1786】

MEK阻害剤は、MEK1及び／またはMEK2を阻害し得る。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、MEKの非ATP競合的アロステリック結合阻害剤である。MEK阻害剤を使用して、黒色腫などのいくつかのがん、またはBRAFタンパク質のV600変異を有する他のがんにおいてしばしば過活性であるMAPK／ERK経路を阻害することができる。したがって、MEK阻害剤は、がん、特にBRAF変異黒色腫の治療に有用である。MEK阻害剤には、トラメチニブ（Mekinist（登録商標）、GSK1120212）、コビメチニブ（Cotellix（登録商標））、ビニメチニブ（Mektovi（登録商標）、MEK162、ARRY-162、ARRY-438162）、セルメチニブ、PD-325901、CI-1040、TAK-733、GDC-0623、ピマセルチニブ、レファメチニブ、BI-847325及びそれらの薬学的に許容される塩が含まれるが、これらに限定されない。

10

【1787】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、トラメチニブである（例えば、Flaherty et al., N. Engl. J. Med. 2012, 367:1694-1703）、アセトアミドとしても知られる、N-[3-[3-シクロプロピル-5-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-3,4,6,7-テトラヒドロ-6,8-ジメチル-2,4,7-トリオキソピリド[4,3-d]ピリミジン-1(2H)-イル]フェニル]、またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物である。いくつかの実施形態では、トラメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、トラメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10mgの投与量で摂取または提供される。例示的な実施形態では、トラメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約2mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、トラメチニブジメチルスルホキシドである。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、アセトアミド、N-[3-[3-シクロプロピル-5-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-3,4,6,7-テトラヒドロ-6,8-ジメチル-2,4,7-トリオキソピリド[4,3-d]ピリミジン-1(2H)-イル]フェニル]-1,1'-スルフィニルビス[メタン](1:1)との化合物である。いくつかの実施形態では、トラメチニブジメチルスルホキシドは、1日約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、トラメチニブジメチルスルホキシドは、1日0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10mgの投与量で摂取または提供される。例示的な実施形態では、トラメチニブジメチルスルホキシドは、1日約2mgの投与量で摂取または提供される。

20

30

40

【1788】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、コビメチニブ（例えば、Asciero et al., Lancet Oncol. 2016, 17:1248-1260を参照）またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、(S)-[3,4-ジフルオロ-2-(2-フルオロ-4-ヨードフェニルアミノ)フェニル][3-ヒドロキシ-3-(ピペリジン-2-イル)アゼチジン-1-イル]メタノンヘミフマレートである。いくつかの実施形態では、コビメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取または提供される。いくつかの実施形態では、コビメチニブまたはその薬学的に許容

50

される塩は、1日1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、コビメチニブは、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9または10回摂取される。例示的な実施形態では、コビメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約60mgの投与量で摂取される。

【1789】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、ビニメチニブ（例えば、Dummer et al. Lancet Oncol. 2018, 19:1315-1327を参照）またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、ビニメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、ビニメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、ビニメチニブは、1日1、2、3、4、5、6、7、8、9または10回摂取される。例示的な実施形態では、ビニメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、約45mgの投与量で1日2回摂取される。

【1790】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、セルメチニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、セルメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、セルメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、セルメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、約25mgの投与量で1日2回摂取される。

【1791】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、PD-325901またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、CI-1040またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、TAK-733またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、GDC-0623またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、ピマセルチニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、レファメチニブまたはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、BI-847325またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、ピマセルチニブまたはその薬学的に許容される塩である。

【1792】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤は、本明細書に記載のものを含むが、これらに限定されない任意のBRA F阻害剤との組み合わせである。

【1793】

例示的な実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、自家TIL治療薬が由来するソース腫瘍の切除前に患者に提供される。いかなる特定の操作理論にも拘束されることなく、ソース腫瘍の切除前のMEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせによる治療は、腫瘍から取得されたTILの抗原リモデリングにつながり、したがって、本明細書で提供されるTIL療法における拡張及び下流使用のためのより堅牢なTILを提供すると考えられる。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせを提供されている。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも

10

20

30

40

50

1、2、3、または4週間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせを受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせを受けた。いくつかの実施形態では、患者は、ソース腫瘍の切除前に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせを受けた。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、ソース腫瘍の切除後に提供される。

【1794】

いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入により患者に提供される。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入と同時に患者に提供されない。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、注入後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入と同時に患者に提供され、TIL注入後にも提供される。特定の実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、または24時間後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、または7日後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、または7日後に患者に提供される。例示的な実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入の約1、2、3、または4週間後に患者に提供される。特定の実施形態では、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせは、TIL注入の約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月後に患者に提供される。いくつかの実施形態では、対象TIL治療を投与された患者は、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせを以前に投与され、治療後もMEK阻害剤／BRA F阻害剤の組み合わせを受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象TIL治療を受けた後、少なくとも1、2、3、または4週間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の併用治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象TIL治療を受けた後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の併用治療を受け続ける。例示的な実施形態では、患者は、対象TIL治療を受けた後、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年間、MEK阻害剤／BRA F阻害剤の併用治療を受け続ける。

【1795】

例示的な実施形態では、BRA F阻害剤／MEK阻害剤の組み合わせは、ダブラフェニブ及びトラメチニブである（トラメチニブ（例えば、Flaherty et al., N. Engl. J. Med. 2012, 367:1694-1703）。いくつかの実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mgまたは1,000mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mgまたは1,000mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約300mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、ダブラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、約150mgの投与量で1日2回摂取される。いくつかの実施形態では、トラメチニブまたはその薬学的に許容される

塩は、1日0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、トラメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約2mgの投与量で摂取される。

【1796】

いくつかの実施形態では、BRAF阻害剤／MEK阻害剤の組み合わせは、ベムラフェニブ及びコビメチニブである（例えば、Asciero et al., Lancet Oncol. 2016, 17:1248-1260を参照）。いくつかの実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1日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の投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1日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の投与量で摂取される。例示的な実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約1,900mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、ベムラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、約850mgの投与量で1日2回摂取される。いくつかの実施形態では、コビメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、コビメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、コビメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約60mgの投与量で摂取される。特定の実施形態では、ベムラフェニブ及びコビメチニブは、28日サイクルで摂取され、ベムラフェニブは、約960mgの投与量で1日2回、28日間摂取され、コビメチニブは、1日約60mgの投与量で最初の21日間摂取される。

【1797】

いくつかの実施形態では、BRAF阻害剤／MEK阻害剤の組み合わせは、エンコラフェニブ及びビニメチニブである（例えば、Dummer et al., Lancet Oncol. 2018, 19:1315-1327を参照）。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mgまたは1,000mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日少なくとも100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mgまたは1,000mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約450mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、エンコラフェニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約300mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、ビニメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、1日約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。いくつかの実施形態では、ビニメチニブま

たはその薬学的に許容される塩は、1日1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100mgの投与量で摂取される。例示的な実施形態では、ピニメチニブまたはその薬学的に許容される塩は、約45mgの投与量で1日2回摂取される。

【1798】

9. 患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのTIL集団を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日で2日間（TIL注入の27日前及び26日前）、ならびにフルダラビン25mg/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で静脈内にIL-2（PROLEUKINとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。ある特定の実施形態では、TIL集団は、IL-2と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、IL-2は、TIL集団の後に投与される。いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇レジメンは、小児の使用に適合される。

【1799】

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

【1800】

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。

【1801】

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。

【1802】

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、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、 $100\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $175\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $225\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $275\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、または $300\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、i.v.）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $35\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 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、 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4～5日間i.v.投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4日間i.v.投与される。

10

【1803】

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と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、 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ でi.v.投与され、シクロホスファミドは、 $250\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4日間にわたってi.v.投与される。

【1804】

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 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与することによって行われる。

【1805】

20

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 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1806】

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 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1807】

30

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 $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1808】

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 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1809】

40

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 $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $15\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1810】

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 $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間、続いてフルダラビンを $25\text{mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で3日間投与することによって行われる。

【1811】

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

50

かの実施形態では、メスナは、 15 mg/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 3 mg/kg の速度で注入することができる。

【1812】

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。

【1813】

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。

【1814】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、5日間のプレコンディショニング治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、-5日から-1日、または0日から4日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）に 60 mg/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、 25 mg/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 25 mg/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 25 mg/m^2 の静脈内フルダラビンをさらに含む。

【1815】

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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与するステップを含む。

【1816】

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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で5日間投与するステップを含む。

【1817】

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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【1818】

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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【1819】

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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で1日間投与するステップを含む。

【1820】

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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25\text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【1821】

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 $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【1822】

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。

【表26】

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 $60 \text{ mg} / \text{kg}$	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$	X	X	X	X	X					
TIL注入						X				

10

20

【1823】

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。

【表27】

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 $60 \text{ mg} / \text{kg}$	X	X							
メスナ (必要に応じて)	X	X							
フルダラビン $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$	X	X	X	X					
TIL注入					X				

30

40

【1824】

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。

50

【表 2 8】

表 2 8. 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 60 m g / k g	X	X						
メスナ (必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25 m g / m ² / 日	X	X	X					
T I L 注入				X				

10

【1 8 2 5】

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 2 9 に従って投与される。

【表 2 9】

20

表 2 9. 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 60 m g / k g	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25 m g / m ² / 日			X	X	X					
T I L 注入						X				

30

【1 8 2 6】

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 3 0 に従って投与される。

40

50

【表 3 0】

表 3 0. 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 300 mg / kg	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30 mg / m ² / 日	X	X	X	X	X					
T I L 注入						X				

10

【1 8 2 7】

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 3 1 に従って投与される。

【表 3 1】

20

表 3 1. 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 300 mg / kg	X	X							
メスナ (必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30 mg / m ² / 日	X	X	X	X					
T I L 注入					X				

30

【1 8 2 8】

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 3 2 に従って投与される。

40

50

【表 3 2】

表 3 2. 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 300 mg ／k g	X	X						
メスナ（必要に応じて）	X	X						
フルダラビン 30 mg／m ² ／ 日	X	X	X					
T I L 注入				X				

10

【1 8 2 9】

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 3 3 に従って投与される。

【表 3 3】

20

表 3 3. 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 300 mg／k g	X	X								
メスナ（必要に応じて）	X	X								
フルダラビン 30 mg／m ² ／ 日			X	X	X					
T I L 注入						X				

30

【1 8 3 0】

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 T I L 注入は、本明細書に記載の任意の T I L 組成物であり得、また本明細書に記載されるような I L－2 レジメンの追加及び併用療法（P D－1 及び／または P D－L 1 阻害剤など）の投与であり得る。

【1 8 3 1】

1 0. I L－2 レジメン

40

いくつかの実施形態では、I L－2 レジメンは、高用量 I L－2 レジメンを含み、高用量 I L－2 レジメンは、治療的 T I L 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エーションを含み、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エーションは、許容範囲まで 8 時間毎に最大 1 4 用量にわたって、0. 0 3 7 mg／k g または 0. 0 4 4 mg／k g I U／k g（患者の体重）の用量で 1 5 分のボ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 1 4 用量、合計最大 2 8 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、I L－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、I L－2 は、最大 6 用量の最大投与量で投与される。

【1 8 3 2】

50

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エーション、続いて12時間にわたって静脈内投与される 18×10^6 IU/ m^2 、続いて24時間にわたって静脈内投与される 18×10^6 IU/ m^2 、続いて72時間かけて静脈内投与される 4.5×10^6 IU/ m^2 を含む。この治療サイクルは、28日毎に最大4サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドIL-2レジメンは、1日目の18,000,000 IU/ m^2 、2日目の9,000,000 IU/ m^2 、3日目及び4日目の4,500,000 IU/ m^2 を含む。

10

【1833】

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。Domínguez-Villar and Hafler, Nat. Immunology 2000, 19, 665-673、Hartemann, et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1, 295-305、及びRosenzweig, 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エーションを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エーションを静脈内にさらに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。

20

【1834】

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。

30

40

【1835】

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、ベンパガルデスロイキン、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【1836】

50

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、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【1837】

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、バリエーション、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。

【1838】

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、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【1839】

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。

【1840】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるTIL注入は、本明細書に記載の任意のTIL組成物であり得、また、TIL注入の代わりにMIL及びPBLの注入、ならびに本明細書に記載のIL-2レジメンの追加及び併用療法(PD-1及び/またはPD-L1阻害剤及び/またはCTLA-4阻害剤など)の投与を含み得る。

【実施例】

【1841】

本明細書に包含される実施形態は、これから以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【1842】

実施例1：REP前プロセス及びREPプロセス用の培地の調製

この実施例は、様々な固形腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製のための手順を説明する。この培地を、本出願及び他の実施例に記載のTILのうちのいずれかの調製に使用することができる。

【1843】

CM1の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、それらを37℃の水浴中で温めた(R

10

20

30

40

50

PMI 1640、ヒトAB血清、200mM L-グルタミン)。濾過される容量に適した0.2μmフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表34に従ってCM1培地を調製した。4℃で保存する。

【表34】

表34．CM1の調製

成分	最終濃度	最終体積500mL	最終体積1L
RPMI 1640	NA	450mL	900mL
ヒトAB血清、熱不活性化10%	50mL	100mL	
200mM L-グルタミン	2mM	5mL	10mL
55mM BME	55μM	0.5mL	1mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50μg/mL	0.5mL	1mL

10

【1844】

使用日に、37℃の水浴中で必要量のCM1を事前に温め、6000IU/mLのIL-2を追加した。

20

【1845】

表35に従って必要に応じて追加の補充を行った。

【表35】

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)	200mM	1:100	2mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000μg/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100μg/mL ストレプトマイシン
アンホテリシンB	250μg/mL	1:100	2.5μg/mL

30

【1846】

CM2の調製

調製したCM1を冷蔵庫から取り出すか、または新鮮なCM1を調製した。AIM-V (登録商標)を冷蔵庫から取り出し、調製したCM1を滅菌培地ボトル内で同等体積のAIM-V (登録商標)と混合することによって、必要な量の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、組織培養に必要なまで4℃で保存した。

40

【1847】

50

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℃で保管した。4℃で7日間保管した後、IL-2を補充した培地を廃棄した。

【1848】

CM4の調製

CM4は、CM3と同じであり、2mM GlutaMAX（商標）（最終濃度）を追加で補充した。1LのCM3毎に、10mLの200mM GlutaMAX（商標）を添加する。IL-2ストック溶液及びGlutaMAX（商標）ストック溶液をAIM-Vのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のCM4を調製する。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、AIM-Vに追加した直後に「3000IU/mL IL-2及びGlutaMAX」とラベル付けした。過剰なCM4が存在する場合、培地名、「GlutaMAX」、及びその有効期限（調製後7日）でラベル付けしたボトル内で4℃で保管した。4℃で7日間保管した後、IL-2を補充した培地を廃棄した。

【1849】

実施例2：IL-2、IL-15、及びIL-21サイトカインカクテルの使用

この実施例は、本明細書の実施例のうちのいずれかのTILプロセスと組み合わせた、追加のT細胞成長因子として機能するIL-2、IL-15、及びIL-21サイトカインの使用を説明する。

【1850】

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。

【1851】

結果は、IL-2、IL-15、及びIL-21処理条件でのCD4+及びCD8+細胞の両方で、IL-2のみの条件と比較して増強したTIL拡張(>20%)が観察できることを示し得る。IL-2単独培養物と比較して、IL-2、IL-15、及びIL-21で処理した培養物から取得されたTILには、歪んだTCR Vβレパートリーを伴う主にCD8+集団への歪みがあった。IFN-γ及びCD107aは、IL-2単独で処理したTILと比較して、IL-2、IL-15、及びIL-21で処理したTILで上昇した。

【1852】

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。

【1853】

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

10

20

30

40

50

。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、T I L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。

【1854】

T I LのR E Pには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたM N Cフィーダー細胞が必要である。フィーダーM N Cの膜受容体は、抗C D 3（クローンO K T 3）抗体に結合し、R E Pフラスコ内のT I Lに架橋し、T I Lを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、F i c o l l - H y p a q u e上で遠心分離し、洗浄し、照射し、G M P条件下で凍結保存した。

【1855】

T I L療法を受けた患者には、移植片対宿主病（G V H D）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D N A切断が起こり、M N C細胞の細胞生存性が喪失する。

【1856】

フィーダーロットを、2つの基準：1）共培養でT I Lを100倍超拡張する能力、及び2）複製不全で評価した。

【1857】

フィーダーロットを、直立したT 2 5組織培養フラスコ内で培養された2つの主要なR E P前 T I L株を利用して、m i n i - R E P形式で試験した。各T I L株は、R E P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T I L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M N Cフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。

【1858】

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R E P前T I L株の十分なストックが利用可能であった。

【1859】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計6つのT 2 5フラスコがあった：R E P前T I L株# 1（2フラスコ）、R E P前T I L株# 2（2フラスコ）、及びフィーダー対照（2フラスコ）。T I L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T I L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。

【1860】

A. 実験プロトコル

－2／3日目、T I L株の解凍C M 2培地を調製し、37℃の水浴中で温める。3000 I U／m LのI L－2を補充した40 m LのC M 2を調製する。使用まで保温する。I L－2を含まない20 m Lの予熱したC M 2を、使用したT I L株の名前がラベル付けされた2本の50 m Lコニカルチューブの各々に入れる。L N 2ストレージから2つの指定されたR E P前T I L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。

【1861】

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50 m Lのコニカルチューブ中の20 m LのC M 2に直ちに移した。細胞を洗浄し、400×C Fで5分間遠心分離するために、I L－2なしのC M 2を使用して40 m LにQ S。上清を吸引し、3000 I U／m LのI L－2で補充された5 m Lの温かいC M 2に再懸濁した。

【1862】

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（20 μ L）

10

20

30

40

50

を重複して取り出した。計数を記録した。カウントしながら、T I L細胞を含む50 mLのコニカルチューブを、加湿した37℃、5%CO₂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、T I Lを、3000 IU/mLのI L-2を補充したC M 2中で 1×10^6 細胞/mLに希釈した。

【1863】

mini-REPの0日目まで、加湿した37℃のインキュベーターに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2 mL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T I L株を培養した。

【1864】

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C M 2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、800 mLのC M 2培地を調製した）。上記で調製したC M 2の一部を分注し、それを細胞の培養のために3000 IU/mLのI L-2で補充した。（例えば、一度に4つのフィーダーロットを試験するために、3000 IU/mLのI L-2を含む500 mLのC M 2培地を調製する）。

【1865】

相互汚染を防ぐために各T I L株を別々に操作し、T I L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、B S Cに移した。

【1866】

無菌トランスファーピペットまたは100～1000 µLピペッター及びチップを使用して、約1 mLの培地を、使用されるT I L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。

【1867】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは100～1000 µL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T I Lと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁液を、T I Lロット名のラベルが付いた50 mLコニカルチューブに移し、容量を記録した。

【1868】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ50 mL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、3000 IU/mLのI L-2を含有する2～5 mLのC M 2培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、 1.3×10^6 細胞/mLを超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【1869】

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、200 µLを取り出した。カウントしながら、T I L細胞を含む50 mLのコニカルチューブを、加湿した5%CO₂、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。

【1870】

T I L細胞を含有する50 mLのコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、3000 IU/mLのI L-2で補充された温かいC M 2中、 1.3×10^6 細胞/mLの濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、50 mLのコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【1871】

第2のT I L株について、上記のステップを繰り返した。

【1872】

T I Lを実験用のT 25フラスコに入れる直前に、T I L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。

【1873】

10

20

30

40

50

MACS GMP CD3ピュア (OKT3) 作用溶液を調製するOKT3のストック溶液 (1 mg/mL) を 4°C 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 30 ng/mL のOKT3を使用した。

【1874】

実験の各T25フラスコ内の 20 mL に対して 600 ng のOKT3が必要であり、これは、 20 mL 毎に $60\text{ }\mu\text{L}$ の $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 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 $360\text{ }\mu\text{L}$ に相当する。

【1875】

試験した各フィーダーロットについて、 $400\text{ }\mu\text{L}$ の $1:100$ 希釈の 1 mg/mL OKT3を、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 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、 $1600\text{ }\mu\text{L}$ の $1:100$ 希釈の 1 mg/mL OKT3 : $16\text{ }\mu\text{L}$ の 1 mg/mL OKT3 + 3000 IU/mL のIL-2を含む 1.584 mL のCM2培地を作製する)。

【1876】

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°C 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。

【1877】

さらなる情報を表36に提供する。

【表36】

表36. 溶液情報

構成要素	共培養フラスコ内の容量	対照 (フィーダーのみ) フラスコ内の容量
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18 mL	19 mL
MNC : CM2 + 3000 IU IL-2 中 $1.3 \times 10^7/\text{mL}$ (最終濃度 $1.3 \times 10^7/\text{フラスコ}$)	1 mL	1 mL
OKT3 : CM2 中 $10\text{ }\mu\text{L/mL}$ = 3000 IU IL-2	$60\text{ }\mu\text{L}$	$60\text{ }\mu\text{L}$
TIL : 3000 IU のIL-2を含むCM2中の $1.3 \times 10^5/\text{mL}$ (最終濃度 $1.3 \times 10^5/\text{フラスコ}$)	1 mL	0

【1878】

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 1 mL 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 1 mL バイアルのフィーダー細胞を解凍して、各REPに推定 100×10^6 個の生細胞を与えることが推奨

された。あるいは、1.8 mL 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。

【1879】

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50 mL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ストレージ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。

【1880】

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、50 mLのコニカルチューブ中の30 mL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、3000 IU/mLのIL-2を加えた4 mL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、200 µLを取り出した。計数を記録した。

【1881】

3000 IU/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。

【1882】

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。4.5 mLのCM2培地を15 mL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、10 mL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0.5 mLの細胞を取り出し、15 mLのコニカルチューブ中の4.5 mL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。

【1883】

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。1 mL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1 mL (1.3×10^7 細胞) を移した。60 µLのOKT3作用ストック (10 µg/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。

【1884】

各TILロットの1 mL (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。

【1885】

5日目、培地変更3000 IU/mLのIL-2を含むCM2を調製した。各フラスコに10 mLが必要である。10 mLピペットを使用して、3000 IU/mLのIL-2を含む10 mL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。

【1886】

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10 mLの培地を取り出し、対照フラスコの各々から15 mLの培地を取り出した。

【1887】

10 mL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200 μ L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。

【1888】

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。

【1889】

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、3000 IU/mLのIL-2を含む15 mL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日まで直立位置でインキュベートした。

【1890】

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およそ17 mLの培地を取り出した。5 mL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。

【1891】

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200 μ L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。

【1892】

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。

【1893】

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。

【表37】

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 $\times 10^7$ 個の生細胞）

【1894】

30 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/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（T

V C) によって評価した。

【1895】

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。

【1896】

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）。

【1897】

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。

【1898】

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。

【1899】

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。

【1900】

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。

【1901】

手順。0.2%酢酸溶液(HAc)を調製した。29mLの滅菌水を、50mLのコニカルチューブに移した。1mLの1N酢酸を、50mLのコニカルチューブに追加した。チューブを2〜3回反転させながら十分に混合した。Steriflipフィルターを使用した濾過によってHAc溶液を滅菌した。

【1902】

PBS中の1%HSAを調製する。4mLの25%HSAストック溶液を、150mLの滅菌フィルターユニット内の96mLのPBSに追加した。溶液を濾過した。4℃で保管した。調製したrhIL-2の各バイアルについて、フォームに記入する。

【1903】

rhIL-2ストック溶液を調製した（最終濃度 6×10^6 IU/mL）。rhIL-2の各ロットは異なり、必要な情報は、以下のような製造業者の分析証明書(COA)に見出された：1) バイアル当たりのrhIL-2の質量(mg)、2) rhIL-2の比活性(IU/mg)、及び3) 推奨0.2%HAc再構成体積(mL)。

【1904】

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。

【数1】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量 (mg)} \times \text{生物活性} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc 体積 (mL)} = 1\% \text{HSA 体積 (mL)}$$

【1905】

例えば、r h I L - 2 ロット 1 0 2 0 0 1 2 1 (C e l l g e n i x) の C O A によると、1 m g バイアルの比活性は、 $25 \times 10^6 \text{ IU} / \text{mg}$ である。r h I L - 2 を 2 m L の 0.2 % H A c 中で再構成することが推奨される。

【数 2】

$$\left(\frac{1 \text{ mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2 \text{ mL} = 2.167 \text{ mL HSA}$$

10

【1906】

I L - 2 バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。3 m L シリンジに取り付けた 16 G 針を使用して、推奨体積の 0.2 % H A c をバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを 3 回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算された容量の 1 % H S A をバイアルに添加した。

【1907】

r h I L - 2 溶液の保管。短期保管（72 時間未満）の場合、4 °C でバイアルを保管した。長期保管（72 時間超）の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が整うまで -20 °C でクライオバイアル内で保管した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から 6 ヶ月後に有効期限が切れた。R h - I L - 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。

20

【1908】

実施例 5：凍結保存プロセス

この実施例では、C r y o M e d 制御速度冷凍庫、モデル 7 4 5 4 (T h e r m o S c i e n t i f i c) を使用して、本明細書に記載の手順で調製した T I L の凍結保存プロセス方法について説明する。

【1909】

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（C S 7 5 0 フリーザーバッグに対応）、750 m L バッグ用凍結保存カセット、低圧（22 p s i ）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 C r y o S t o r e C S 7 5 0 冷凍バッグ（O r i G e n S c i e n t i f i c ）。

30

【1910】

凍結プロセスは、核形成から -20 °C まで 0.5 °C の速度、及び -80 °C の終了温度まで毎分 1 °C 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 °C で待つ、ステップ 2：-4 °C まで 1.0 °C / 分（試料温度）、ステップ 3：-45 °C まで 20.0 °C / 分（チャンバ温度）、ステップ 4：-10.0 °C まで 10.0 °C / 分（チャンバ温度）、ステップ 5：-20 °C まで 0.5 °C / 分（チャンバ温度）、及び

40

【1911】

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、C M 1 培地及び C M 2 培地を、合成培地（例えば、C T S（商標）O p T m i z e r（商標）T - C e l l E x p a n s i o n S F M、T h e r m o F i s h e r、例えば、D M 1 及び D M 2 を含む）で置き換えることによって行われ得る。

【1912】

実施例 7：凍結保存 T I L 細胞療法の例示的 G E N 2 産生

この実施例は、I o v a n c e B i o t h e r a p e u t i c s , I n c . の c G M

50

P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-R E X フラスコ内のT I L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-R E X フラスコ内のT I L細胞療法プロセスの例示的なc G M P製造を説明する。

【表 3 8】

表 3 8. プロセス拡張の例示的な計画

推定日（播種後）	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積（mL）
0	腫瘍解剖	G-R E X-1 0 0 M C S 当たり $\leq 5 0$ 個の望ましい腫瘍断片	G-R E X-1 0 0 M C S 1 フラスコ	$\leq 1 0 0 0$
1 1	R E P 播種	G-R E X-5 0 0 M C S 当たり $5 \sim 2 0 0 \times 1 0^6$ 個の生細胞	G-R E X-5 0 0 M C S 1 フラスコ	$\leq 5 0 0 0$
1 6	R E P 分割	G-R E X-5 0 0 M C S 当たり $1 \times 1 0^9$ 個の生細胞	G-R E X-5 0 0 M C S ≤ 5 フラスコ	$\leq 2 5 0 0 0$
2 2	採取	全利用可能な細胞	3～4つのC S-7 5 0 バッグ	$\leq 5 3 0$

10

20

【表 3 9】

表 3 9. フラスコ容積

フラスコタイプ	作業体積／フラスコ（mL）
G-R E X-1 0 0 M C S	1 0 0 0
G-R E X-5 0 0 M C S	5 0 0 0

30

【1 9 1 3】

0日目のC M 1培地の調製B S C内で、試薬をR P M I 1 6 4 0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A B血清（1 0 0 . 0 m L）、G l u t a M a x（1 0 . 0 m L）、硫酸ゲンタマイシン、5 0 m g / m L（1 . 0 m L）、2-メルカプトエタノール（1 . 0 m L）を加熱する

40

【1 9 1 4】

B S Cから不要な材料を取り出した。B S C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H B S SをB S Cの中に残した。

【1 9 1 5】

I L-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 . 1 m LのI L-2 アリコート（ $6 \times 1 0^6$ I U / m L）（B R 7 1 4 2 4）を解凍した。I L-2：ロット番号及び有効期限を記録した。

【1 9 1 6】

I L-2 ストック溶液を培地に移した。B S C内で、1 . 0 m LのI L-2 ストック溶

50

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 (6×106 IU/mL) 1.0 mLを追加した。

【1917】

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。

【1918】

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。

【1919】

0日目の腫瘍洗浄培地の調製BSC内で、5.0 mLのゲンタマイシン (W3009832またはW3012735)を1本の500 mLのHBSS培地 (W3013128)ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：HBSS (500.0 mL)、硫酸ゲンタマイシン、50 mg/mL (5.0 mL)。1 Lの0.22ミクロンフィルターユニット (W1218810)をとお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。

【1920】

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%未満が壊死性及び／または脂肪性組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の30%未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死性／脂肪性組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片 (最大6つの中間断片) に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を、およそ3×3×3 mm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。

【1921】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を50 mL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。

【1922】

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℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5% CO₂。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。

【1923】

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のアリコート了解凍した。

【1924】

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。

【1925】

3本の1000 mLのRPMI 1640培地 (W3013112) ボトル及び3本の1000 mL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RPMI 1640培地を取り出した。RPMI 16

10

20

30

40

50

40 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。

【1926】

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。

【1927】

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。

【1928】

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℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5% CO₂。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。

【1929】

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。

【1930】

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。

【1931】

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。

【1932】

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。

【1933】

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。

【1934】

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。

【1935】

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。

【1936】

10

20

30

40

50

フローサイトメトリーのための計算：総生TIL細胞数が、 4.0×10^7 個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために 1.0×10^7 個の細胞を取得するための体積を計算した。

【1937】

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。

【1938】

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。

【1939】

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。

【1940】

バイアルを充填した。 1.0 mL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 ≤ 0.5 mLである場合、体積が 0.5 mLになるまでCS-10をバイアルに追加する。

【1941】

凍結保存のための 1×10^7 個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。TILをインキュベーターに入れた。

【1942】

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 0.5 mLのCS-10の体積を記録した。

【1943】

11日目－フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。LN2冷凍庫から少なくとも2つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の3つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはcryothermを準備した。 37.0 ± 2.0 °C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。

【1944】

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 3 mL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 4×1.0 mL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。

【1945】

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 °C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。

【1946】

10

20

30

40

50

必要に応じて希釈液を調製し、4.5 mLのAIM-V培地を4本の15 mL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3 mL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4×1.0 mL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。4.0 mLを差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。5×10⁹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。

10

【1947】

1.0 mLシリンジ及び16 G針を使用して、0.15 mL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。

【1948】

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。4.5 L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。

20

【1949】

インキュベーション時間帯を計算した。16日目にインキュベーターからG-REX500MCSを取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間+108時間。上限：インキュベーションの時間132時間。

【1950】

11日目 過剰TIL凍結保存。該当：過剰TILバイアルを凍結させた。凍結前にCRFが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをCRFから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。LN₂における保管場所を記録した。

30

【1951】

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10 L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10 L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10 LのLabtainerを設定し、ラベル付けした。上清用の10 L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。

40

【1952】

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 (6×10⁶ IU/mL) (BR71424)の5×1.1 mLアリコート解凍した。100.0 mL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℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5% CO₂。完全なCM4の16日目培地を温めた。希釈液

50

を調製した。

【1953】

16日目 REP分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度LEDディスプレイ： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。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。

【1954】

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。

【1955】

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。

【1956】

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。

【1957】

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。

【1958】

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 $4 \times 1.0\text{mL}$ の細胞計数試料を取り出した。

【1959】

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。

【1960】

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。

【1961】

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。

【1962】

二次培養用のフラスコの数と計算した。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

10

20

30

40

50

れ、温められている間に、続けて第1のG R E X - 5 0 0 M 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 - R E X 5 0 0 M C S を充填した。培地をポンプで注入するように準備し、4.5 L の培地をG - R E X 5 0 0 M C S 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 - R E X 5 0 0 M C S フラスコに追加するT I L 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 - R E X 5 0 0 M C S を取り出した。ポンプで注入するためのG - R E X 5 0 0 M C S 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T I L 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）「T I L 懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。T I L 懸濁液バッグを秤の上に置いた。

10

【1963】

フラスコにT I L 懸濁液を播種した。計算されたT I L 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。

【1964】

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L E D ディスプレイ：37.0 ± 2.0 °C、C O ₂ パーセンテージ：5.0 ± 1.5 % C O ₂ . フラスコをインキュベートした。

【1965】

22日目にインキュベーターからG - R E X 5 0 0 M C S を取り出す時間範囲を決定した。

20

【1966】

22日目 洗浄緩衝液の調製。10 L のL a b t a i n e r バッグを準備した。B S C 内で、ルアー接続を介して4インチ血漿移送セットを10 L のL a b t a i n e r バッグに取り付けた。10 L のL a b t a i n e r バッグを準備した。B S C 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 - R E X 5 0 0 M C S フラスコ毎に、1つの10 L L a b t a i n e r バッグを準備した。P l a s m a l y t e を3000 mL 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、3000 mL のO r i g e n バッグから空気を除去した。ヒトアルブミン25 % を3000 mL のバッグに追加した。120.0 mL の最終体積のヒトアルブミン25 % を取得する。

30

【1967】

I L - 2 希釈液を調製した。10 mL シリンジを使用して、L O V O 洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、5.0 mL のL O V O 洗浄緩衝液を取り出した。L O V O 洗浄緩衝液を50 mL のコニカルチューブに分注した。

【1968】

等分されたC R F ブランクバッグL O V O 洗浄緩衝液。100 mL のシリンジを使用して、無針注入ポートから70.0 mL のL O V O 洗浄緩衝液を引き上げた。

【1969】

すべての氷が融解するまで、1つの1.1 mL のI L - 2 (6 × 10⁶ I U / mL) を解凍した。50 μ L のI L - 2 ストック (6 × 10⁶ I U / mL) を「I L - 2 希釈液」とラベル付けされた50 mL のコニカルチューブに追加した。

40

【1970】

凍結保存調製。5つのクライオカセットを2 ~ 8 °C に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【1971】

細胞計数希釈液を調製した。B S C 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4.5 mL のA I M - V 培地を、4本の別個の15 mL 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

50

ベル付けした。使用される B S C の下でバイアルを保存した。

【1972】

22日目 T I L 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 L E D ディスプレイ：37±2.0℃、C O 2 パーセンテージ：5%±1.5%。インキュベーターから G - R E X 500 M C S フラスコを取り外した。T I L 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4.5 L の上清を G - R E X 500 M C S から上清バッグに移した。

【1973】

T I L 採取用のフラスコを準備した。T I L 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。T I L の収集を開始した。T I L 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。T I L 採取。G a t h e R e x を使用して、T I L 懸濁液を3000 mL 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 - R e x 500 M C S 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 L O V O 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。4×1.0 mL の細胞計数試料を取り出した。

【1974】

細胞計数を行った。N C - 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、0.5 mL の細胞懸濁液を調製された4.5 mL の A I M - 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。L O V O ソースバッグの重量を量った。総生 T I L 細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【1975】

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10.0 mL を取り出し、15 mL コニカルに入れた。

【1976】

「T I L G - R E X 採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。P l a s m a l y t e を取り付けした。P l a s m a l y t e が取り付けられていることを検証し、P l a s m a l y t e 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。P l a s m a l y t e が動いていることを確認した。

【1977】

最終製剤及び充填。標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するための C S - 10 及び L O V O 洗浄緩衝液の体積を計算した。C R F ブランクを調製した。

【1978】

最終製品に追加する I L - 2 の体積を計算した。所望される最終 I L - 2 濃度 (I U / m L) - 300 I U / m L 。 I L - 2 作業ストック：6×10⁴ I U / m L 。接続装置を組み立てた。4 S - 4 M 60 を C C 2 細胞接続に滅菌溶接した。C S 750 クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。C S - 10 バッグを4 S - 4 M 60 のスパイクに溶接した。I L - 2 とともに T I L 調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「I L - 2 6×10⁴」アリコートから決定された I L - 2 の量を取り出した。配合された T I L バッグをラベル付けした。配合された T I L バッグを装置に追加した。C S 10 を追加した。シリンジを交換した。約10 mL の空気を100 mL のシリンジに引き込み、装置上の60 mL シリンジを交換した。C S 10 を追加した。C S - 750 バッグを準備した。細胞を分注した。

【1979】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填される

と、すべてのクランプを閉じた。10 mLの空気を新しい100 mL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50 mL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。

【1980】

目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または2～8℃で保持した。

【1981】

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、2.0 mLの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように15 mLコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：1つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。IFN- γ を計算した。最終製品バッグを熱融着した。

【1982】

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。

10

20

30

40

50

【表 4 0】

表 4 0. 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 m L	1 5 m L コニ カル
内毒素	2	1. 0 m L	2 m L クライ オバイアル
グラム染色	1	1. 0 m L	2 m L クライ オバイアル
I F N- γ	1	1. 0 m L	2 m L クライ オバイアル
フローサイトメトリー	1	1. 0 m L	2 m L クライ オバイアル
** B a c - T 無菌性	2	1. 0 m L	B a c - T ボ トル
Q C 保持	4	1. 0 m L	2 m L クライ オバイアル
サテライトバイアル	1 0	0. 5 m L	2 m L クライ オバイアル

10

20

30

【1 9 8 3】

無菌性及び B a c T 試験。試験試料採取。B S C 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. 0 m L 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。

【1 9 8 4】

最終製品の凍結保存。制御速度冷凍庫（C R F）を準備した。C R F が設定されていることを検証した。C R F プローブを設定した。最終製品及び試料を C R F に入れた。4 °C $\pm$ 1. 5 °C に達し、C R F 実行を進めるために必要な時間を決定した。C R F が完了し、保管された。実行の完了後に C R F を停止させた。カセット及びバイアルを C R F 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 L N 2 に移した。保管場所を記録した。

40

【1 9 8 5】

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：（2 2 日目）フローサイトメトリーによる 2 2 日目 R E P の C D 3 + 細胞の決定、（2 2 日目）グラム染色法（G M P）、（2 2 日目）ゲルクロット L A L アッセイ（G M P）による細菌内毒素試験、（1

50

6日目) B a c T滅菌アッセイ (GMP)、(16日目) T D - P C R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) B a c T滅菌アッセイ (GMP) (22日目)、(22日目) I F N - 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、T I L製品を分析するために用いられる。

【1986】

実施例8：G E N 3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。5 mLのゲンタマイシン (50 mg / mL) を500 mLボトルのH B S Sに添加した。5 mLの腫瘍洗浄培地を、O K T 3希釈に使用する15 mLのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで37℃で保管するか、または凍結させた。37℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞をカウントした。

【1987】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / mLである。4.5 mLのA I M - 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0.5 mL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。

【1988】

p 1 0 0 0マイクロピペットを使用して、900 μ Lの腫瘍洗浄培地をO K T 3アリコート (100 μ L) に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、0.6 mLのO K T 3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2 L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。

【1989】

O K T 3製剤の詳細：O K T 3は、100 μ Lアリコート中のバイアル (1 mg / 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。1 mLバイアル当たり約10 $\times$ アリコート。-80℃で保管した。0日目：15 μ g / フラスコ、すなわち500 mL中30 ng / mL $\sim$ 60 μ L最大約1アリコート。

【1990】

5 mL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。50 mLの腫瘍洗浄培地を、各100 mmペトリ皿に追加した。

【1991】

解剖皿のふたの下の定規を参照として使用して、腫瘍を27 mm³断片 (3 $\times$ 3 $\times$ 3 mm) 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 - R E X - 1 0 0 M C S 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)。

【1992】

断片チューブ1 $\sim$ 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 - R E X - 1 0 0 M C S フラスコの数进行計算した。

【1993】

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 - R E X - 1 0 0 M C S を播種する。D 0 (0日目) とラベル付けする。

【1994】

G - R E X - 1 0 0 M C S 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 (D 0) 1 とラベル付けしたG - R E X - 1 0 0 M C S 及び断片チューブとラベル付

10

20

30

40

50

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-R E X 100 M C S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-R E X 100 M C Sに追加した。G-R E X 100 M C Sに移送された断片の数を記録した。

【1995】

断片がG R E Xフラスコの底に配置された時点で、7mLの培地を吸引し、7つの1mLアリコートを作製した（拡張された特徴付け用に5mL、滅菌試料用に2mL）。拡張された特徴付け用の5つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで-20℃で保管した。

【1996】

1本の嫌気性B a c T / A l e r tボトル及び1本の好気性B a c T / A l e r t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。

【1997】

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、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLである。4.5mLのA I M - 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。

【1998】

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。

【1999】

p1000マイクロピペットを使用して、900μLのH B S Sを100μLのO K T 3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。

【2000】

O K T 3製剤の詳細：O K T 3は、100μLアリコート中のバイアル（1mg/mL）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。1mLバイアル当たり約10×アリコート。-80℃で保管した。7日目／8日目：30μg／フラスコ、すなわち500mL中60ng/mL～120μL最大約2アリコート。

【2001】

シリンジ及び滅菌技法を使用して、0.6mLのO K T 3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O K T 3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。

【2002】

フィーダー細胞懸濁液を含むG-R E X 100 M C Sフラスコの準備。0日目に生成されたG-R E Xフラスコの数に従って処理するためにG-R E X - 100 M C Sフラスコの数記録した。G-R E X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。

【2003】

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-R E X 100フラスコに接続し、5mLの培地を引き上げた。5つの1mLアリコート（拡張された特徴付け用に5mL）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特徴付け用に5つのアリコート（最終断片培養上清）を-20℃で保管した。各G-R E X 100フラスコにラベル付けし、繰り返した。

【2004】

10

20

30

40

50

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

【2005】

フィーダー細胞をG-REX100 MCSに播種し続け、G-REX100 MCS フラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各G-REX-100MCSフラスコに重量で500mLの第2のフィーダー細胞バッグを重力移送し（1g = 1mLと想定）、量を記録した。7日目培養とラベル付けし、G-REX100フラスコ毎に繰り返した。G-REX-100MCSフラスコをインキュベーターに移した。

10

【2006】

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）。

【2007】

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。

【2008】

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。

20

- 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

【2009】

合計40mLをすべてのフラスコから取り出し、「10 / 11日目QC試料」とラベル付けした50mLのコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保管すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

30

【2010】

必要になるまで-20℃以下で拡張された特徴付けのために5つのアリコート（前処理培養上清）を保管した。1本の嫌気性BacT / Alertボトル及び1本の好気性BacT / Alertボトルに各々1mLの前処理培養上清を接種した。

【2011】

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。

【2012】

40

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つのフラスコの場合：2つのシリンジを使用して合計20mLを取り出した。フラスコが2つの場合：1フラスコ当たり10mLを取り出した。フラスコが3つの場合：1フラスコ当たり7mLを取り出した。フラスコが4つの場合：1フラスコ当たり5mLを取り出した。細胞懸濁液を1本の一般的な50mLのコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及びQC試料までインキュベーター内で保管する。QCに必要な細胞の総数は、約20e6細胞であった：4×0.5mLの細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。

【2013】

アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

50

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

【2014】

G-REX-500MCSフラスコをインキュベーターに移した。

【2015】

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 $\sim 1 \times 10^6$ 細胞を含み、 $8 \sim 10 \times 10^6$ 細胞が、IFN- γ アッセイに必要であ
る。

【2016】

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。

【2017】

16~17日目

洗浄緩衝液の調製(1% HSA Plasmalyte A)。HSA及びPlasm
alyte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)。

【2018】

Plasmalyte+1%HSAに添加する再構成IL-2の量を計算した：再構成
IL-2の量=(IL-2の最終濃度 $\times$ 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、40m
Lであった。

【2019】

再構成IL-2に必要なIL-2の計算された初期体積を取り出し、「IL-2 $6 \times$
 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100 μ LのIL
-2 6×10^6 IU/mLを、10mLのLOVO洗浄緩衝液を含有する「IL-2
 6×10^4 IU/mL」とラベル付けしたチューブに追加した。

【2020】

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-500MC
Sフラスコで繰り返した。

【2021】

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。 $+2 \sim 8^\circ\text{C}$ で保管した。

【2022】

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
ープを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適な範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times$
 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4500 μ LのAIM-Vに、500 μ LのCFを追加する。希釈倍率を記録した。

【2023】

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

10

20

30

40

50

ソースバッグの体積

【2024】

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

【2025】

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。 $5 \times 10^8 \div$ 平均TC濃度（ステップ14.44）＝取り
出す体積

【2026】

総細胞（TC）数が $\leq 5 \times 10^9$ 以下であった場合、 4×10^6 細胞を取り出して、M
DA保持試料として凍結保存する。 $4 \times 10^6 \div$ 平均TC濃度＝取り出す体積。

【2027】

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。

【2028】

バッグに残っている残りの総細胞を計算した。TC（総細胞）LOVO前を計算した。
[平均総細胞濃度×残りの体積＝残りのTC LOVO前]を計算した。

【2029】

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。

【表41】

表41. セルの総数。

総細胞：	保持液（mL）
$0 < \text{総細胞} \leq 31 \times 10^9$	115
$31 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 71 \times 10^9$	165
$71 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 110 \times 10^9$	215
$110 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 115 \times 10^9$	265

【2030】

使用したプロセスに対応して添加するIL-2の量を選択する。次のように計算された
体積：保持量 $\times 2 \times 300 \text{ IU} / \text{mL}$ ＝必要とされるIL-2のIU。必要なIL-2の
IU $/ 6 \times 10^4 \text{ IU} / \text{mL}$ ＝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。

【2031】

細胞製品を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべ
てのバッグを密封した。

【2032】

得られたクライオバイアル試料に対して、内毒素、IFN- γ 、無菌性、及び必要に応

じて他のアッセイを行った。

【2033】

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、エクスピボで拡張された自己TILで構成されている。Gen3プロセスのプライミングによる第1の拡張ステップは、インターロイキン-2（IL-2）及びモノクローナル抗体OKT3の存在下での細胞培養であり、放射線照射された末梢血単核細胞（PBMC）の足場上のT細胞共受容体CD3を標的とする。

【2034】

Gen2 TIL製品の製造は、2つの相からなる：1）急速拡張前（REP前）及び2）急速拡張プロトコル（REP）。REP前中に、切除腫瘍を、各寸法2～3mmの50個以下の断片に切断し、血清含有培養培地（10%HuSABを補充したRPMI1640培地）及び6,000IU/mLのインターロイキン-2（IL-2）で11日間培養した。11日目にTILを採取し、大規模二次REP拡張に導入した。REPは、5日間の3000IU/mLのrhIL-2を補充した5L体積のCM2中の150µgのモノクローナル抗CD3抗体（OKT3）を装填した5×10⁹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200×10⁶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1×10⁹個以上の生リンパ球で複数のG-REX-500フラスコに分割し、CM4で5LにQSする。TILをさらに6日間インキュベートする。REPを22日目に採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に-150℃で発送する。

【2035】

Gen3 TIL製品の製造は、3つの相からなる：1）プライミングによる第1の拡張プロトコル、2）急速な第2の拡張プロトコル（急速拡張相またはREPとも称される）、及び3）継代培養分割。プライミングによる第1の拡張TIL増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法2～3mm以下の120個以下の断片に切断した。プライミングによる第1の拡張の0日目に、OKT-3を装填したおよそ2.5×10⁸個の放射線照射された同種異系PBMCフィーダー細胞のフィーダー層を、3つの100MCS容器の各々内のおよそ100cm²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15µgのOKT-3を含む3つの100MCS容器に分布し、その中で7日間培養した。7日目に、OKT-3を負荷したおよそ5×10⁸個の同種異系の照射されたPBMCフィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、3つの100MCS容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、500mLの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送を使用して、同じ容器内のプライミングによる第1の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Gen3の場合、TILのスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移送によってより大きい容器にスケールアップし、移し（100Mフラスコから500Mフラスコに）、追加の4LのCM4培地を添加するプロセスステップを含めた。16日目にREP細胞を採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に-150℃で発送する。

【2036】

全体として、Gen3プロセスは、より短く、よりスケラブルであり、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。

10

20

30

40

50

【表 4 2】

表 5 0 . 例示的な G e n 2 及び例示的な G e n 3 製造プロセスの比較

ステップ	プロセス (G e n 2)	プロセス (G e n 3)
REP 前 - 0 日目	最大 5 0 個の断片、1 つの G - R E X - 1 0 0 M C S 1 1 日 1 L の C M 1 培地 + I L - 2 (6 0 0 0 I U / m L)	全腫瘍最大 1 2 0 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 ~ 6 0 個の断片 2 つのフラスコ：6 1 ~ 8 9 個の断片 3 つのフラスコ：9 0 ~ 1 2 0 個の断片 5 0 0 m L の C M 1 培地 + I L - 2 (6 0 0 0 I U / m L) 2 . 5 × 1 0 ⁸ 個のフィーダー細胞 / フラスコ 1 5 u g O K T - 3 / フラスコにおいて 7 日間
REP 開始	REP に誘導する、1 1 日目、 < 2 0 0 × 1 0 ⁶ T I L (1) 5 L C M 2 培地中の G - R E X - 5 0 0 M C S I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) 5 × 1 0 ⁹ フィーダー細胞 1 5 0 u g O K T - 3	REP に誘導する、7 日目、すべての細胞、同じ G - R E X - 1 0 0 M C S 5 0 0 C M 2 培地を添加する I L - 2 (6 0 0 0 I U / m L) 5 × 1 0 ⁸ フィーダー細胞 / フラスコ 3 0 u g の O K T - 3 / フラスコ
T I L 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 - R E X - 5 0 0 M C S に分割する 4 . 5 L C M 4 培地 + I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) ≥ 1 × 1 0 ⁹ T V C / フラスコ 1 6 日目に分割する	各 G - R E X - 1 0 0 M C S (1 L) が 1 つの G - R E X - 5 0 0 M C S に移行する 4 L の C M 4 培地 + I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) を添加する 9 ~ 1 1 日目にスケールアップする
採取	2 2 日目に採取する L O V O - 自動細胞洗浄機	1 6 日目に採取する L O V O 自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存した製品 L N ₂ 中の 3 0 0 I U / m L の I L 2 - C S 1 0 、複数のアリコート	凍結保存した製品 L N ₂ 中 3 0 0 I U / m L の I L - 2 - C S 1 0 複数のアリコート
プロセス時間	2 2 日	1 6 日

【 2 0 3 7 】

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) 。 G e n 2 プロセスの場合、断片を、6 , 0 0 0 I U / m L の r h I L - 2 を含有する 1 L の C M 1 培地を含む 1 つの G R E X 1 0 0 M C S フラスコに移した。 G e n 3 プロセスでは、断片を、6 , 0 0 0 I U / m L の r h I L - 2 、1 5 u g の O K T - 3 及び 2 . 5 × 1 0 ⁸ 個のフィーダー細胞を含有する 5 0 0 m L の C M 1 を含む 1 つの G - R E X - 1 0 0 M C S フラスコに移した。 R e p 開始日の T I L の播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。 G - R E X G - R E X - 1 0 0 M C S フラスコを 9 0 % 減容させた G e n 2 プロセスの場合、収集した細胞懸濁液を新たな G - R E X - 5 0 0 M C S に移して、 I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) + 5 × 1 0 ⁹ フィーダー細胞及び O K T - 3 (3 0 n g / m L) を含有する C M 2 培地中で 1 1

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 (3000 IU/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 (6000 IU/mL) 及び 5×10^8 個のフィーダー細胞を30 µgのOKT-3とともに含有する500 mL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(1 L)をG-REX-500MCSに移し、IL-2 (3000 IU/mL) を含有する4 L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。

10

【2038】

比較には、2つの肺腫瘍(L4054及びL4055)と1つの黒色腫瘍(M1085T)の3つの異なる腫瘍を含めた。

【2039】

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。

【2040】

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。

20

【2041】

結果達成された生細胞の総数について、Gen3の結果はGen2の30%以内であった。Gen3最終製品は、再刺激後により高いINF-γ産生を示した。Gen3最終製品は、存在する固有の全CDR3配列によって測定される、増加したクローンの多様性を示した。Gen3最終製品は、より長い平均テロメア長を示した。

【2042】

Gen2及びGen3プロセスでのREP前及びREP拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、2つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、1フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総REP前細胞(TVC)を採取し、Gen2プロセスの場合は11日目に、Gen3プロセスの場合は7日目に計数した。2つのREP前群を比較するために、細胞計数を培養物中に提供された断片の数で割り、1断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表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。

30

40

50

【表 4 3】

表 5 1 . R E P 前の細胞数

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5 *		M 1 0 8 5 T	
プロセス	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3
R E P 前 T V C	1 . 4 2 E + 0 8	4 . 3 2 E + 0 7	2 . 6 8 E + 0 7	1 . 3 8 E + 0 7	1 . 2 3 E + 0 7	3 . 5 0 E + 0 6
断片数	2 1	2 1	2 4	2 4	1 6	1 6
R E P 前における断片 当たりの平均 T V C	6 . 6 5 E + 0 6	2 . 0 6 E + 0 6	1 . 1 2 E + 0 6	5 . 7 5 E + 0 5	7 . 6 6 E + 0 5	2 . 1 8 E + 0 5
1 1 日目の R E P 前における G e n 3 外挿値	N / A	6 . 7 9 E + 0 7	N / A	2 . 1 7 E + 0 7	N / A	5 . 4 9 E + 0 6

* L 4 0 5 5、濾過されていない培地。

【 2 0 4 3 】

G e n 2 及び G e n 3 プロセスの場合、T V C 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、2 2 日目 (G e n 2) 及び 1 6 日目 (G e n 3) の細胞を収集し、T V C 数を確立した。その後、T V C 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 T V C を R E P 開始 T V C で割ることによって計算した。表 5 2 に示されるように、G e n 2 と G e n 3 を比較すると、倍率拡張は L 4 0 5 4 の場合では同様であり、L 4 0 5 5 の場合、倍率拡張は G e n 2 プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地を R E P 開始日の前に 2 4 温めた。M 1 0 8 5 T の場合の G e n 3 でもより高い倍率拡張が観察された。R E P T V C を 1 6 で割り、その後、2 2 を掛けて計算した、2 2 日目に G e n 3 プロセスで予想される T V C 数の外挿計算。

10

20

30

40

50

【表 4 4】

表 5 2. T I L 最終製品の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5		M 1 0 8 5 T	
プロセス	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3
断片数	2 1	2 1	2 4	2 4	1 6	1 6
T V C / 断片 (採取時)	3 . 1 8 E + 0 9	8 . 7 7 E + 0 8	2 . 3 0 E + 0 9	3 . 6 5 E + 0 8	7 . 0 9 E + 0 8	4 . 8 0 E + 0 8
R E P 開始	1 . 4 2 E + 0 8	4 . 3 2 E + 0 7	2 . 6 8 E + 0 7	1 . 3 8 E + 0 7	1 . 2 3 E + 0 7	3 . 5 0 E + 0 6
スケールアップ	3 . 3 6 E + 0 9	9 . 3 5 E + 0 8	3 . 4 9 E + 0 9	8 . 4 4 E + 0 8	1 . 9 9 E + 0 9	3 . 2 5 E + 0 8
採取	6 . 6 7 E + 1 0	1 . 8 4 E + 1 0	5 . 5 2 E + 1 0	8 . 7 6 E + 0 9	1 . 1 3 E + 1 0	7 . 6 8 E + 0 9
倍率拡張 採取 / R E P 開始	4 6 8 . 4	4 2 5 . 9	2 0 5 6 . 8	6 3 4 . 6	9 2 5 . 0	2 1 9 7 . 2
2 2 日目の R E P 採取における G e n 3 外挿値	N / A	2 . 5 3 E + 1 0	N / A	1 . 2 0 E + 1 0	N / A	1 . 0 6 E + 1 0

* L 4 0 5 5、濾過されていない培地。

【2 0 4 4】

表 5 3 : T I L 最終製品の生存率 % : 採取時に、最終 T I L R E P 製品を生存率 % の放出基準と比較した。G e n 2 及び G e n 3 プロセスのすべての条件は、7 0 % 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。

【2 0 4 5】

採取時に、最終 T I L R E P 製品を生存率 % の放出基準と比較した。G e n 2 及び G e n 3 プロセスのすべての条件は、7 0 % 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。

【表 4 5】

表 5 3. R E P の生存率 (T I L 最終製品)

腫瘍 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5		M 1 0 8 5 T	
プロセス	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3	G e n 2	G e n 3
R E P 開始	9 8 . 2 3 %	9 7 . 9 7 %	9 7 . 4 3 %	9 2 . 0 3 %	8 1 . 8 5 %	6 8 . 2 7 %
スケールアップ	9 4 . 0 0 %	9 3 . 5 7 %	9 0 . 5 0 %	9 5 . 9 3 %	7 8 . 5 5 %	7 1 . 1 5 %
採取	8 7 . 9 5 %	8 9 . 8 5 %	8 7 . 5 0 %	8 6 . 7 0 %	8 6 . 1 0 %	8 7 . 4 5 %

10

【2 0 4 6】

1 フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞計数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が 0 日目に 2 つまたは 3 つのフラスコに播種するのに十分な大きさであるという予想に基づいた。

【表 4 6】

20

表 5 4. G e n 3 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 I D	L 4 0 5 4		L 4 0 5 5		M 1 0 8 5 T	
G e n 3 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 . 6 8 E + 1 0	5 . 5 2 E + 1 0	1 . 7 5 E + 1 0	2 . 6 3 E + 1 0	1 . 5 4 E + 1 0	2 . 3 0 E + 1 0

30

【2 0 4 7】

免疫表現型決定 - T I L 最終製品の表現型マーカー比較。3 つの腫瘍 L 4 0 5 4、L 4 0 5 5、及び M 1 0 8 5 T は、G e n 2 及び G e n 3 プロセスの両方で T I L 拡張を受けた。採取時に、R E P T I L 最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、T C R a / b + 細胞パーセンテージは 9 0 % 超であった。

【2 0 4 8】

G e n 3 プロセスから採取した T I L は、G e n 2 プロセスから採取した T I L と比較して、より高い C D 8 及び C D 2 8 発現を示した。G e n 2 プロセスは、より高い C D 4 + パーセンテージを示した。

40

【2 0 4 9】

G e n 3 プロセスから採取した T I L は、G e n 2 プロセス由来の T I L 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。

【2 0 5 0】

活性化及び疲弊マーカーを 2 つの腫瘍 L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 由来の T I L で分析して、G e n 2 及び G e n 3 T I L 拡張プロセス由来の最終 T I L 製品を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、G e n 2 プロセスと G e n 3 プロセスとの間で同等であった。

【2 0 5 1】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌。採取日、G e n 2 の場合は 2 2 日目、G e n 3 の場合は 1 6 日目に、T I L は、L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 の場合、コーティングした

50

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IFN γ 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IFN γ のより高い産生が観察された。

【2052】

培養培地中のIL-2レベルの測定。Gen2プロセスとGen3プロセスとの間のIL-2消費量を比較するために、腫瘍L4054及びL4055で、REPの開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中のIL-2の量を、R&D製の定量化ELISAキットによって測定した。一般的な傾向は、Gen2プロセスと比較して、Gen3プロセスではIL-2濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まってGen3のREP開始時のIL-2濃度がより高い(6000 IU/mL)ことに起因する可能性がある。

10

【2053】

代謝基質及び代謝物分析。D-グルコース及びL-グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、ATPの形態でエネルギーを産生するためにミトコンドリアによって利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される(乳酸塩は乳酸のエステルである)。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

20

【2054】

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。

【2055】

L-グルタミンは、細胞培養培地製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。L-グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。L-グルタミンの分解に対抗するために、Gen2及びGen3プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないGlutamax(商標)を補充した。2つの腫瘍株では、Gen3アームは、プロセス中のL-グルタミン及びGlutamax(商標)の減少、ならびにREP全体でアンモニアの増加を示した。Gen2アームでは、L-グルタミン及びGlutamax(商標)の濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Gen2及びGen3のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、L-グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

30

【2056】

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。

40

【2057】

CD3分析各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、L4054及びL4055の採取したTIL最終製品をサンプリングし、T細胞受容体のCDR3部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

【2058】

表55は、採取したTIL細胞製品のL4054における共有される固有のCDR3配

50

列パーセンテージに関する Gen 2 と Gen 3 との比較を示す。199 個の配列が Gen 3 最終製品と Gen 2 最終製品との間で共有され、Gen 3 最終製品と共有される Gen 2 由来の固有の CDR 3 配列の上位 80% の 97.07% に相当する。

【表 47】

表 55. L4054 の Gen 2 プロセスと Gen 3 プロセスとの間で共有される uCDR 3 配列の比較。

uCDR 3 の数 (重複%)	すべての uCDR 3		uCDR 3 の上位 80%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	—	18130	—	223

10

【2059】

表 56 は、採取した TIL 細胞製品の L4055 における共有される固有の CDR 3 配列パーセンテージに関する Gen 2 と Gen 3 との比較を示す。1833 個の配列が Gen 3 最終製品と Gen 2 最終製品との間で共有され、Gen 3 最終製品と共有される Gen 2 由来の固有の CDR 3 配列の上位 80% の 99.45% に相当する。

20

【表 48】

表 56. L4055 の Gen 2 プロセスと Gen 3 プロセスとの間で共有される uCDR 3 配列の比較。

uCDR 3 の数 (重複%)	すべての uCDR 3		uCDR 3 の上位 80%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	—	27246	—	2616

30

【2060】

CM1 及び CM2 培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍 L4055 の場合、Gen 2 及び Gen 3 プロセスで使用するまで 4℃ で保持した。

【2061】

Gen 2 及び Gen 3 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。

40

【2062】

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。

【2063】

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。

【2064】

腫瘍 M1085T では、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用の TIL 製品、テロメア長、及び CD3-TCR α b 分析などの試料は入手できなかった。

50

【2065】

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Gen 2プロセス及びGen 3プロセス間の培地消費に関して比較する。

【2066】

Gen 2とGen 3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、Gen 2（22日）とGen 3（16日）との間で同等ではなかった。Gen 3細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約40%であり、Gen 2よりも低かった。

【2067】

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、Gen 3プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、Gen 3は、Gen 2プロセスと比較してTVCの数値に近いことを示し、初期活性化により、TILの成長が増強したことを示す。

【2068】

Gen 3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Gen 2プロセスと比較して、Gen 3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。

【2069】

Gen 2とGen 3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、Gen 2（22日）とGen 3（16日）との間で同等ではなかった。Gen 3細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約40%であり、Gen 2よりも低かった。

【2070】

表現型特徴付けに関して、Gen 2プロセスと比較してGen 3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。

【2071】

Gen 3プロセスは、Gen 2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。

【2072】

Gen 2プロセス及びGen 3プロセスは、Gen 3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。

【2073】

IFNガンマ（IFN γ ）産生は、分析した3つの腫瘍において、Gen 2と比較してGen 3最終製品において3倍高かった。このデータは、Gen 3プロセスがGen 2プロセスと比較して高機能でより強力なTIL製品を生成したことを示し、Gen 3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、Gen 2プロセスと比較して3つの腫瘍でCD8+、CD28+発現へのGen 3の肯定的な傾向を示唆した。

【2074】

Gen 2とGen 3との間のTIL最終製品のテロメア長は同等であった。

【2075】

グルコース及び乳酸塩レベルは、Gen 2最終製品とGen 3最終製品との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びGen 2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、Gen 3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。

【2076】

全体として、Gen 3プロセスは、Gen 2プロセスと比較してほぼ2倍の処理時間の

10

20

30

40

50

短縮を示し、これにより、Gen 3 プロセスによって拡張された T I L 製品の売上原価 (COG) の有意な削減がもたらされるであろう。

【2077】

I L - 2 消費は、Gen 2 プロセスでの I L - 2 消費の一般的な傾向を示しており、Gen 3 プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、I L - 2 が高かった。

【2078】

Gen 3 プロセスは、C D R 3 T C R a b 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。

【2079】

Gen 3 プロセスを使用して、R E P 前の 0 日目のフィーダー及び O K T - 3 の追加により、T I L の初期活性化が可能になり、T I L 成長が可能になった。

10

【2080】

表 5 7 は、現在の Gen 2 プロセスと比較した Gen 3 プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。

20

30

40

50

【表 4 9】

表 5 7. 例示的なG e n 3プロセス特徴。

ステップ	プロセスG e n 2の実施形態	プロセスG e n 3の実施形態
REP前－ 0日目	50個以下の断片 1 X G－R E X－1 0 0 M C S 1 L培地 I L－2（6 0 0 0 I U／m L） 1 1 日	2 4 0 個以下の断片 6 0 個以下の断片／フラスコ 4つ以下のフラスコ ≤ 2 L培地（5 0 0 m L／フラスコ） I L－2（6 0 0 0 I U／m L） 2．5 × 1 0 ⁸ 個のフィーダー細胞／ フラスコ 1 5 u g のO K T 3／フラスコ
REP開始	REPに誘導した新鮮なT I L 1 1 日目 2 0 0 e ⁶ 個以下の生細胞 5 × 1 0 ⁹ フィーダー細胞 G－R E X－5 0 0 M C S 5 LのCM2培地＋I L－2（3 0 0 0 I U／m L） 1 5 0 μ g のO K T 3	REPに誘導した新鮮なT I L 7 日目 培養物全体を活性化する 5 × 1 0 ⁸ フィーダー細胞 3 0 μ g のO K T 3／フラスコ G－R E X－1 0 0 M C S 5 0 0 m L培地＋I L－2（6 0 0 0 I U／m L）
T I L継代 培養または スケールア ップ	5以下のG－R E X－5 0 0 M C S 1 × 1 0 個以下の生細胞／フラス コ 5 L／フラスコ 1 6 日目	4以下のG－R E X－5 0 0 M C S 培養物全体をスケールアップする 4 L／フラスコ 1 0 ～ 1 1 日目
採取	2 2 日目に採取 L O V O－自動細胞洗浄機 2回の洗浄サイクル	1 6 日目に採取する L O V O自動細胞洗浄機 5回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存した製品 L N ₂ 中の3 0 0 I U／m LのI L－2－C S 1 0、複数のアリコート	凍結保存した製品 L N ₂ 中3 0 0 I U／m LのI L－2 －C S 1 0 複数のアリコート
プロセス時 間	2 2 日	1 6 日

10

20

30

40

【2 0 8 1】

実施例 1 0：例示的なG E N 3プロセス（G E N 3．1とも称される）

この実施例は、「T I L拡張のためのG e n 2プロセスとG e n 3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。G e n 3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（T V C）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、G e n 3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G e n 3．1と称する。

【2 0 8 2】

50

いくつかの実施形態では、Gen 3.1 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-R EX 100 MCS フラスコ内で培養した。各フラスコは、最大60個の断片、6,000 IUのrhIL-2、15 µgのOKT3、及び2.5×10⁸個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充した500 mL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6,000 IUのrhIL-2、30 µgのOKT3、及び5×10⁸個の放射線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-R EX 100 MCSの全内容物を、いずれの場合も3,000 IU/mLのIL-2を補充した4 LのCM4またはDM2を含むG-R EX 500 MCS フラスコに移した。採取するまでフラスコを37℃で5～6日間インキュベートした。

4. 採取／洗浄／製剤化：16～17日目に、フラスコを減容させ、プールする。細胞を濃縮し、1% HSAを含有するPlasmaLyte A pH 7.4で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、CryoStor 10と1:1の比で配合し、300 IU/mLの最終濃度までrhIL-2を補充した。

【2083】

DPを制御された速度の凍結で凍結保存し、気相液体窒素中で保管した。＊完全標準TIL培地1、2、または4（CM1、CM2、CM4）は、上記のように、合成培地（DM1またはDM2）と称されるCTS（商標）OpTmizer（商標）T細胞無血清拡張培地の代用となり得た。

【2084】

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。

【2085】

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。

【2086】

CM1完全培地1：2 mM GlutaMax（商標）、10% ヒトAB血清、ゲンタマイシン（50 µg/mL）、2-メルカプトエタノール（55 µM）を補充したRPMI+グルタミン。6000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地製剤

【2087】

CM2完全培地2：50% CM1培地+50% AIM-V培地。6000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地製剤

【2088】

CM4完全培地4：GlutaMax（商標）（2 mM）を補充したAIM-V。3000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地製剤

【2089】

CTS（商標）OpTmizer（商標）T-Cell Expansion Supplement（26 mL/L）を補充したCTS（商標）OpTmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Medium。

【2090】

10

20

30

40

50

DM1: CTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement (26mL/L)、及びCTS (商標) Immune Cell SR (3%)をGlutaMax (2mM)とともに補充したCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Basal Medium。6, 000 IU/mLのIL-2を補充した最終製剤。

【2091】

DM2: CTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement (26mL/L)、及びCTS (商標) Immune Cell SR (3%)をGlutaMax (2mM)とともに補充したCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Basal Medium。3, 000 IU/mLのIL-2を補充した最終製剤。

10

【2092】

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。

【2093】

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。

【2094】

達成した結果Gen3.0プロセス及びGen3.1プロセスの細胞計数及び生存率%を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

20

【2095】

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。

【2096】

7日目及び10/11日目の細胞計数をFIOで測定した。倍率拡張を、16/17日目の採取時のTVCを7日目の再活性化日のTVCで割ることによって計算した。3つの群を比較するために、採取日のTVCを、0日目の培養物中に添加した断片の数で割って、1断片当たりの生細胞の平均を計算した。

30

【2097】

L4063及びL4064について、細胞計数及び生存率アッセイを行った。Gen3.1-試験プロセスは、両方の腫瘍でGen3.0プロセスよりも多くの1断片当たりの細胞数をもたらした。

【2098】

総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。

40

【2099】

免疫表現型決定-TIL最終製品の表現型特徴付け。最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、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。

【2100】

REP TILの拡張表現型分析を行った。TIL製品は、両方の腫瘍でGen3.0と比較してGen3.1条件でより高いCD4+細胞パーセンテージを示し、両方の条件でGen3.1条件と比較してGen3.0でより高いCD8+集団由来のCD28+細胞

50

胞パーセンテージを示した。

【2101】

Gen 3. 0プロセス及びGen 3. 1プロセスから採取したTILは、CD4+細胞及びCD8+細胞でのCD27及びCD56発現、ならびにCD4+ゲート細胞集団での同等のCD28発現と同等の表現型マーカーを示した。TIL最終製品のメモリーマーカーの比較：

【2102】

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、Gen 3. 0プロセスとGen 3. 1プロセスとの間で同等であった。TIL最終製品の活性化及び疲弊マーカーの比較：

【2103】

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Gen 3. 0プロセスとGen 3. 1プロセスとの間で同等であった。

【2104】

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。Gen 3. 0プロセスと比較して、分析した2つの腫瘍で、より高いGen 3. 1プロセスからのIFN γ 産生が観察された。

【2105】

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。

【2106】

全体的なGen 3プロセス及びGen 3. 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。

【2107】

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。

【2108】

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Gen 3. 0プロセス及びGen 3. 1プロセスにおいて同等であった。

【2109】

乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Gen 3. 0条件とGen 3. 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。

【2110】

いくつかの場合において、標準基礎培地は、2mMのL-グルタミンを含有し、培養条件下でL-グルタミンのL-グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、2mMのGlutaMax（商標）で補充された。

【2111】

いくつかの場合において、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にL-グルタミンを含有せず、最終濃度が2mMになるまでGlutaMax（商標）のみで補充された。GlutaMax（商標）は、L-アラニンとL-グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でL-グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分

10

20

30

40

50

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。

【2112】

いくつかの場合において、グルタミン濃度及びG l u t a M a x（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。L 4 0 6 4の場合、グルタミン濃度及びG l u t a M a x（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。

【2113】

アンモニア濃度は、2 mMのG l u t a M a xを含有する合成培地中で成長させた試料よりも、2 mMのグルタミン+2 mMのG l u t a M a x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。

【2114】

F l o w - F I S Hによるテロメア反復：F l o w - F I S H技術を使用して、G e n 3プロセス及びG e n 3. 1プロセス下でのL 4 0 6 3及びL 4 0 6 4のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（R T L）の決定を、D A K O製のフローサイトメトリ分析用T e l o m e r e P N Aキット／F I T C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G e n 3プロセス及びG e n 3. 1プロセスは、同等のテロメア長を示した。

【2115】

T C R V β レパートリー分析

各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、T I L最終製品をT細胞受容体のC D R 3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。

【2116】

3つのパラメータを3つの条件間で比較した。

●固有のC D R 3（u C D R 3）の多様性指数

●u C D R 3共有%

●u C D R 3の上位80%の場合：

○共有されるu C D R 3コピーの%を比較する

○固有のクローノタイプの頻度を比較する

【2117】

対照及びG e n 3. 1試験、T I Lで採取した細胞製品で共有される固有のC D R 3配列パーセンテージ：975個の配列がG e n 3試験最終製品とG e n 2試験最終製品との間で共有され、G e n 3. 1と共有されるG e n 3由来の固有のC D R 3配列の上位80%の88%に相当する。

【2118】

対照及びG e n 3. 1試験、T I Lで採取した細胞製品で共有される固有のC D R 3配列パーセンテージ：2163個の配列がG e n 3試験最終製品とG e n 2試験最終製品との間で共有され、G e n 3. 1と共有されるG e n 3由来の固有のC D R 3配列の上位80%の87%に相当する。

【2119】

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C D 3配列の数。G e n 3. 1試験条件は、試料内の固有のペプチドC D Rの数に基づいて、G e n 3. 0と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。

【2120】

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G e n 3. 1条件は、G e n 3. 0プロセスよりもわずかに高

10

20

30

40

50

い多様性を示し、Gen 3.1 試験条件のTCR V β レパートリーがGen 3.0 プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【2121】

加えて、Gen 3.1 試験条件のTCR V β レパートリーは、腫瘍L4063及びL4064の両方でGen 3.0 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。

【2122】

再活性化日のGen 3.1 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（Gen 3.1 対照及びGen 3.0 条件と同様であった）。

【2123】

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。

【2124】

結論0日目のフィーダー及びOKT-3を含むGen 3.1 試験条件は、Gen 3.0 及びGen 3.1 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。Gen 3.1 試験条件のTVC最終製品は、Gen 3.0 よりも約2.5倍高かった。

【2125】

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Gen 3.1 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 $\times$ 10⁹ TILである可能性があった。

【2126】

最終TIL製品の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Gen 3.1 試験とGen 3.0 プロセスとの間で維持された。

【2127】

最終TIL製品のIFN- γ 産生は、分析した2つの腫瘍において、Gen 3.0と比較して、0日目にフィーダー及びOKT-3を添加したGen 3.1で3倍高く、Gen 3.1 プロセスが強力なTIL製品を生成したことを示唆する。

【2128】

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、Gen 3.0 プロセスとGen 3.1 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。

【2129】

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、Gen 3.0 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。

【2130】

0日目にフィーダー及びOKT-3を添加したGen 3.1 プロセスは、Gen 3.0と比較して、CDR3 TCR α b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。

【2131】

図32は、Gen 3 プロセス（Gen 3 最適化プロセス）の実施形態を説明する。標準培地及びCTS Optimizer無血清培地を、Gen 3 最適化プロセスTIL拡張に使用することができる。CTS Optimizerの場合、培地のGlutaMax（商標）を最終濃度4mMに増加させるために無血清培地が推奨される。

10

20

30

40

50

【2132】

実施例11：小児薬物動態研究

この実施例は、有効な治療法が知られていない再発または不応性の固形腫瘍タイプを有する小児、青年、及び若年成人患者における骨髓非破壊的リンパ球枯渇（NMA-LD）準備レジメン後の自家TIL及びIL-2の注入によるACTの安全性、忍容性、及び予備的有効性を評価するための多施設、非盲検第1相研究であることが計画されている研究に関する。

【2133】

この研究のプロトコルには、各患者の年齢層に適した用量、投与、及び用量修正の指示を含めることによって、レジメン（NMA-LD、TIL、及びIL-2）の安全な投与を確保するための措置が含まれる。

10

【2134】

TILレジメンによる養子細胞移植療法は、NMA-LD調製レジメン（すなわち、シクロホスファミド及びフルダラビン）に続いて、TIL注入及びIL-2のTIL注入後の投与からなる。この治療レジメンは、TIL注入前のNMA-LD調製レジメン、及び切除不能または転移性黒色腫を有する患者におけるTIL注入後のIL-2の投与を含み、有意義な臨床応答を示した、TILベースのACT療法のほぼ30年間の第1/2相研究に基づいている（Rosenberg et al. 2011、Dudley et al. 2003、Rosenberg et al. 1988）。移送されたTILの生着、拡張、及び活性化をサポートするためだけに、NMA-LD及びIL-2をレジメンに含めた。これらの追加の薬剤は、TILレジメン内での投与の条件下で、それら自体で抗腫瘍効果を有しない（Goff 2016）。

20

【2135】

NMA-LDレジメンは、幹細胞移植及びCAR-T療法による小児白血病の治療で一般的に使用されるものと類似している（Mahadeo et al. 2019）。IL-2誘導毒性及び抗腫瘍リンパ球活性に対するTreg再構成の阻害効果の潜在的な誘導を制限しながら、低用量のIL-2（最大6用量まで、8～12時間毎に600,000国際単位[IU]/kg）を使用して、医薬品生着をサポートする（Jiang et al. 2016）。提案されているものと同様またはより高い用量での固形腫瘍を有する小児におけるIL-2投与で毒性が観察されているが、IL-2に関連する有害作用は、概して管理可能であり、可逆的である（Dahger et al. 2002、Nasr et al. 1989、Schwinger et al. 2005）。

30

【2136】

成人患者は、製造される製品の全用量、すなわち、事前に指定された放出基準を満たす $1 \times 10^9 \sim 150 \times 10^9$ 生細胞の用量を受容する。成人患者の上限を、黒色腫の治療におけるTILの臨床試験において安全に注入された細胞の既知の公開された上限に基づいて選択した（Radvanyi et al. 2012）。この研究及び他のTIL研究からの継続的なデータが進展したため、下限は経時的に変化した。製造プロセスは、可変数のTILをもたらし、用量は、ロットで製造された細胞の数に基づいており、ロット全体が投与される。

40

【2137】

自家TILは、体重及び体表面積に基づく投与で、リンパ枯渇、TIL注入、及びIL-2投与を含む10日間レジメンの一部として1回投与される。

【2138】

患者は、TIL注入の前に、シクロホスファミド（1日60mg/KG IV）をメスナ（15mg/kg）とともに2日間、及びフルダラビン（1日25mg/m² IV 5日間）を投与される。このNMA-LDレジメンは、TILの進行中のIovance及びMDACC臨床研究で使用され、幹細胞移植及び小児白血病の治療で一般的に使用されるものと同様である（Kymriah SmPC、Mahadeo et al. 2019）。

50

【2139】

IL-2誘導毒性及び抗腫瘍リンパ球活性に対するTreg再構成の阻害効果の潜在的な誘導を制限しながら、低用量のIL-2（最大6用量まで、8～12時間毎に600,000国際単位[IU]/kg）を使用して、医薬品生着をサポートする（Jiang et al., 2016）。同様またはより高い用量での固形腫瘍を有する小児におけるIL-2投与で毒性が観察されているが、IL-2に関連する有害作用は、概して管理可能であり、可逆的である（Dahger et al., 2002、Nasr et al., 1989、Schwinger et al., 2005）。40kg未満の患者へのIL-2投与及び送達、プロトコルにおいてさらに指定される。

【2140】

この研究では、高い変異負荷を有する腫瘍を濃縮するために、肉腫（RMS、PNETを含むEWS、及びOS）ならびにミスマッチ修復欠損腫瘍を有する患者を含む原発性CNS悪性腫瘍を有する患者を登録する。当初、研究は、8kg以上18歳未満の最大14人の患者を登録し、肉腫コホートでは最大5人の患者を治療し、原発性CNSコホートでは最大9人の患者を治療する。肉腫群の最初の5人の患者が治療された後、コホートは、無益性に基づいて閉じられるか、またはさらに拡大されて、以下に記載されるように臨床的に有意な応答を示した肉腫サブタイプを有する最大12人の患者を治療する。原発性CNS悪性腫瘍コホートでは、登録は、以下に記載されるように、9人の患者の後に停止されるか、または特定の腫瘍タイプにおいて最大16人の患者まで拡大される。

【2141】

拡大コホートには、8kg以上18歳未満の年齢群に加えて、18歳以上21歳以下の患者が含まれ得、したがって、小児腫瘍学者によって管理され得る、研究中の再発または不応性の小児腫瘍を有するより高齢の患者へのアクセスを提供する。

【2142】

小児患者におけるTILレジメンの安全性を確立するために、最初により高齢の群（12歳以上18歳未満）で最大5人の患者が異なるコホートにわたって登録される。より若い（8kg以上12歳未満）群の登録は、データ安全性モニタリング委員会（DSMB）が、治療された最初の5人の患者（12歳以上18歳未満）の累積安全性データをレビューし、研究を変更なしに進めることができることを確認するまで開始しない。第2のDSMBは、この年齢群の5人の患者が治療されたときに、より若い年齢群（8kg以上12歳未満）における安全性を評価する。

【2143】

原発性CNS悪性腫瘍コホートについて、計画される最大試料サイズは、16人の患者である。Simonのminmax 2段階デザイン（Simon 1989）を使用して、その片側代替仮説に対して、5%以下のORR（臨床的に意味がないと考えられる）の帰無仮説を試験する。Simonのデザインの段階1では、9人の患者が登録され、TILを注入される。これらの9人の患者の間で確認された応答がない場合、コホートへの登録は停止する。それ以外の場合、追加の7つの特許が登録され、ステージ2でTILが注入され、結果として合計16人の患者の試料サイズとなる。合計16人の患者のうち少なくとも3人の治療された患者が奏効を確認した場合、帰無仮説は却下され、TILが腫瘍タイプに有望であることを支持する。この2段階デザインは、0.05の片側アルファレベルでのTIL療法について26%ORRの仮定に基づいて、5%ORRの帰無仮説を却下するために80%のパワーを提供する。

【2144】

肉腫コホートには、ステージ1の合計5人の患者が含まれる。肉腫腫瘍タイプのうちの1つで確認された応答がある場合、ステージ2でその腫瘍タイプに追加の患者が登録され、合計12人の治療された患者が登録される。合計12人の患者のうち少なくとも2人の治療された患者が奏効を確認した場合、帰無仮説は却下され、TILが腫瘍タイプに有望であることを支持する。この2段階デザインは、0.1の片側アルファレベルでのTIL療法について30%ORRの仮定に基づいて、5%ORRの帰無仮説を却下するために8

10

20

30

40

50

0 % のパワーを提供する。

【2145】

帰無仮説が却下された腫瘍タイプは、第2の研究でさらなる開発のために考慮される。
2つの帰無仮説が却下される場合、1つの腫瘍タイプが優先され、考慮される。

【2146】

この研究における安全性及び有効性のシグナルに基づいて、必要に応じて拡大された小児研究が続く。

【2147】

主な包含基準は以下を含む。

●患者は、インフォームド Consent / 同意時に 8 kg 以上～21 歳以下でなければならず、初期段階には、8 kg 以上～18 歳未満の患者が含まれる。最初の決定ポイントの後に基準が満たされた場合、18 歳以上21 歳以下の患者を、コホートパート1及び2を併せて治療された合計12人までの患者に含めることができる。

●再発または不応性肉腫（横紋筋肉腫、PNETを含むユーイング、骨肉腫）または原発性 CNS 悪性腫瘍の診断。

●患者は、TIL 切除の候補であり、12～21 歳以下の患者では70 % 以上のカルノフスキーパフォーマンスステータス、または8 kg 以上12 歳未満の小児では70 % 以上の Lansky プレイスケールを有していなければならない。

●患者は、奏効評価に使用される測定可能な疾患とは別に、またそれに加えて、TIL の生成のために、切除生検に適した腫瘍（患者当たりおよそ 1 cm³ の凝集腫瘍物質が推奨される）を有していなければならない。

●患者は、標準療法後に再発し、利用可能なすべての治療法に失敗した、組織学的または細胞学的に確認された固形腫瘍を有していなければならない。

【2148】

主な排除基準は以下を含む。

●既知の活動性中枢神経系転移及び／またはがん性髄膜炎の病歴（非 CNS 腫瘍を有する患者の場合）。以前に治療された脳転移を有する患者は、安定している（治験治療の最初の投与前の少なくとも4週間のイメージングによる進行の証拠がなく、任意の神経学的症状がベースラインに戻っている）、新規または拡大した脳転移の証拠がなく、リンパ球枯渇の開始前の少なくとも7日間ステロイドを使用していない場合、参加することができる。

●全身治療を必要とする活動性自己免疫疾患の病歴または証拠、

●臨床的に有意な免疫抑制の証拠、

●副腎不全のために生理学的置換を必要とする患者を除く（CNS 悪性腫瘍を有する患者を除く）慢性ステロイド療法、

●登録前28日以内に生ワクチン接種を受けた、

●女性患者は、妊娠中もしくは授乳中であるか、または研究治療中及びTIL から3ヶ月後に妊娠を計画している。

●出産可能性のある女性患者は、研究治療中及びTIL 後3ヶ月間に許容される有効な避妊方法（複数可）を使用することを望まない。

●研究中に、局所緩和放射線治療を除いて、他のがん治療を必要とすると予想される。

【2149】

全体的な研究期間は、以下の期間を含む、最後に登録された患者からおよそ2年間である。

●スクリーニング：インフォームド Consent フォーム（ICF）への署名から最大28日

●登録：TIL 生成のために腫瘍切除時に

●治療期間：NMA-LD 調製レジメン（最大7日）、自己TIL 注入（1日）、IL-2 投与（最大4日）。患者は、14日目及び28日目に安全性評価来院のために戻る（28日目は、治療終了 [EOT] 来院に対応する）。

10

20

30

40

50

●評価期間：E O T来院後、有効性（例えば、腫瘍応答）評価は、注入後6週目（42日目）に、次いで6ヶ月目（24週目）まで6週毎に実施する。患者は、0日目（T I L注入）から最大2年間、または疾患の進行もしくは新しい抗がん療法の開始まで、3ヶ月（12週間）毎に応答について評価され続ける。その時点で、評価終了（E O A）来院が完了する。

●全生存フォローアップ期間：最後の研究評価の完了後に開始し、登録から最大2年間、または研究の中止まで継続し、生存状況及びその後の抗がん療法情報を得るために3ヶ月毎に電話で連絡する。腫瘍切除を受けたが、何らかの理由でT I Lを受けなかった患者は、E O A来院を行い、全生存フォローアップ期間に直接移行する。

【2150】

主要評価項目は、重症度及びT I L〔時間枠：最大24ヶ月〕との関係による治療下で発現した有害事象（T E A E）及び重篤な有害事象（S A E）の発生率である。初期段階では、12歳以上の患者が最初に登録され、利用可能な安全性データのレビューは、最初の5人の患者が登録された後、及び12歳未満の患者が登録される前に、D S M Bによって実施される。利用可能な安全性データの追加レビューは、12歳未満の最初の5人の子供が登録された後にD S M Bによって行われる。副次的評価項目は、R E C I S T v 1.1及び／または他の腫瘍特異的奏効基準を使用して治験責任医師によって決定されるように、O R R、C R、またはP Rとなる〔時間枠：疾患進行、または別の抗がん治療の開始、または任意の原因による死亡のいずれか早い方までのベースライン（最大24ヶ月まで）〕。

【2151】

副次的評価項目は、特定の腫瘍タイプに基づいてプロトコルに指定されている抗腫瘍活性である。

【2152】

提案された患者集団は、有効な療法が知られていない再発または不応性の転移性固形小児腫瘍タイプを有する小児、青年、及び若年成人患者であるため、適切な実対照薬は利用できない。したがって、対照群は計画されていない。

【2153】

統計計画の主要要素は以下のとおりである。

【2154】

患者の性質は、頻度及びパーセンテージを使用して要約される。ベースラインの人口統計学的及び臨床（疾患）的特徴を記述的に要約する。

【2155】

安全性データの評価は記述的であり、研究の中止、バイタルサイン、及び臨床検査につながるT E A E、S A E、及びA Eの要約に基づく。T E A Eには、自家T I L注入の開始から最大30日後に生じるA Eが含まれる。

【2156】

O R R及びD C Rは、二項比例として表され、点推定及びC l o p p e r - P e a r s o n厳密法に基づくその両側95%信頼限界を使用して要約される。P F S、O S、及びD O Rは、右側打ち切りを受ける事象発生までの時間変数である。事象までの時間曲線全体について、K a p l a n - M e i e r確率及び関連する要約統計が提供される。

【2157】

実施例12：G e n 2またはG e n 3プロセスを使用した小児腫瘍からのT I Lの生成

この実施例は、G e n 2 T I L製造プロセスを使用した、n = 5人の小児患者（4～18歳のドナー）から切除された腫瘍組織からのT I Lの産生を実証する研究に関する。腫瘍は、2～8℃で出荷され、切除後96時間以内に処理される。

【2158】

T I Lは、以下の表40、ならびに図34～37に例示されるように、小児腫瘍から生成され得る。

10

20

30

40

50

【表 5 0】

表 4 0 : データの要約

腫瘍 ID	REP 前 TVC ($\times 10^6$)	TVC を 採取 ($\times 10^9$)	同一性 (CD45 ⁺ CD3 ⁺ %)	IFN γ (pg/mL)	GzmB (pg/mL)	表現型
Ped25001	332	25	97.5	2,329	8,715	Gen2 TIL 製品 に典型的
Ped25002	9	26	82.6*	1,335	8,345	より高い NK 細胞 含有量が観察 された
Ped25003	2	4	94.5	6,689	18,188	Gen2 TIL 製品 に典型的、IFN γ 及び GzmB の 高生産性
Ped ¹ W329019188991	-	69	99.7	16,532	利用不可	利用不可

¹ Gen 3 製造プロセスを使用した臨床ロットからのデータ。

【2 1 5 9】

実施例 1 3 : 凍結保存 T I L 細胞療法 の 例示 的 生 産

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-R E X フラスコ内の T I L 細胞療法プロセスの例示的な c G M P 製造を説明する。

【表 5 1】

表 4 1 - プロセス拡張例示的計画

推定日 (播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定される合計 容量 (mL)
0	腫瘍解剖	G-REX100MCS 当たり ≤ 50 個の望ましい腫瘍断片	G-REX100MCS 1 フラ スコ	≤ 1000
11	REP 播種	G-REX500MCS 当たり 5~ 200×10^6 個の生細胞	G-REX500MCS 1 フラ スコ	≤ 5000
16	REP 分割	G-REX500MCS 当たり 1×10^9 個の生細胞	G-REX500MCS ≤ 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

10

20

30

40

50

【表 5 2】

表 4 2 フラスコ容積

フラスコタイプ	作業体積／フラスコ (mL)
G-R E X 1 0 0 M C S	1 0 0 0
G-R E X 5 0 0 M C S	5 0 0 0

10

【2 1 6 0】

主要なプロセス情報

0 日目の C M 1 培地の調製

B S C 内で、試薬を R P M I 1 6 4 0 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 A B 血清 (1 0 0 . 0 m L)、G l u t a M a x (1 0 . 0 m L)、硫酸ゲンタマイシン、5 0 m g / m L (1 . 0 m L)、2 -メルカプトエタノール (1 . 0 m L) を加熱した。

【2 1 6 1】

B S C から不要な材料を取り出した。B S C 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 H B S S を B S C の中に残した。

20

【2 1 6 2】

I L - 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 . 1 m L の I L - 2 アリコート (6 × 1 0 6 I U / m L) (B R 7 1 4 2 4) を解凍した。I L - 2 : ロット番号及び有効期限を記録した。

【2 1 6 3】

I L - 2 ストック溶液を培地に移した。B S C 内で、1 . 0 m L の I L - 2 ストック溶液を、調製された C M 1 の 0 日目培地ボトルに移した。C M 1 の 0 日目培地 1 ボトル及び I L - 2 (6 × 1 0 6 I U / m L) 1 . 0 m L を追加した。

【2 1 6 4】

G - R E X 1 0 0 M C S を B S C の中に通過させた。無菌的に G - R E X 1 0 0 M C S (W 3 0 1 3 1 3 0) を B S C の中に通過させた。

30

【2 1 6 5】

すべての完全な C M 1 の 0 日目培地を G - R E X 1 0 0 M C S フラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形または G R e x 1 0 0 M C S 。

【2 1 6 6】

0 日目の腫瘍洗浄培地の調製

B S C 内で、5 . 0 m L のゲンタマイシン (W 3 0 0 9 8 3 2 または W 3 0 1 2 7 3 5) を 1 本の 5 0 0 m L の H B S S 培地 (W 3 0 1 3 1 2 8) ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：H B S S (5 0 0 . 0 m L)、硫酸ゲンタマイシン、5 0 m g / m L (5 . 0 m L)。1 L の 0 . 2 2 ミクロンフィルターユニット (W 1 2 1 8 8 1 0) をとおして調製されたゲンタマイシンを含有する H B S S を濾過した。

40

【2 1 6 7】

0 日目の腫瘍処理

腫瘍を取得した。Q A R から腫瘍検体を取得し、即時に処理のために 2 ~ 8 °C における部屋に移した。

【2 1 6 8】

腫瘍洗浄培地を等分した。

【2 1 6 9】

8 インチ鉗子 (W 3 0 0 9 7 7 1) を使用した腫瘍洗浄 1、検体ボトルから腫瘍を取り出し、調製された「洗浄 1」皿に移した。腫瘍洗浄 2 及び腫瘍洗浄 3 が続いた。

50

【2170】

腫瘍を測定した。腫瘍を評価した。腫瘍領域全体の30%未満が壊死及び／または脂肪性組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合：クリーンアップ解剖。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性／脂肪性組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。

【2171】

メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍を解剖し、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。腫瘍断片をサイズが約3×3×3mmの切片に解剖した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。

10

【2172】

中間断片解剖を繰り返した。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。

【2173】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を50mLコニカルチューブに移した。G-R E X 1 0 0 M C S のために B S C を準備した。インキュベーターから G-R E X 1 0 0 M C S を取り出した。無菌的に G-R E X 1 0 0 M C S フラスコを B S C の中に通過させた。腫瘍断片を G-R E X 1 0 0 M C S フラスコに追加した。切片を均等に分配した。

20

【2174】

以下のパラメータにおいて G-R E X 1 0 0 M C S をインキュベートした：G-R E X フラスコをインキュベートした：温度 L E D ディスプレイ：37.0±2.0℃、CO2パーセンテージ：5.0±1.5% CO2。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。

【2175】

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、I L - 2 のアリコート を解凍した。

【2176】

11日目－培地の調製

インキュベーターを監視した。インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度 L E D ディスプレイ：37.0±2.0℃、CO2パーセンテージ：5.0±1.5% CO2。

30

【2177】

3本の1000mLのR P M I 1 6 4 0 培地（W3013112）ボトル及び3本の1000mLのA I M - V （W3009501）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R P M I 1 6 4 0 培地を取り出した。R P M I 1 6 4 0 培地を調製した。培地を濾過した。3つのI L - 2 の1.1mLのアリコート（6×106 I U / m L ）（B R 7 1 4 2 4 ）を解凍した。インキュベーターからA I M - V 培地を取り出した。I L - 2 をA I M - V に追加した。10LのL a b t a i n e r バッグ及びリピータポンプ移送セットをB S C の中に無菌的に移した。

40

【2178】

10LのL a b t a i n e r 培地バッグを準備した。B a x a ポンプを準備した。10LのL a b t a i n e r 培地バッグを準備した。培地を10LのL a b t a i n e r にポンプで注入した。L a b t a i n e r バッグからポンプマティックを取り出した。

【2179】

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コニカルチューブに入れた。B S C 内で細胞計数希釈チューブを準備し、「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A I M - V 培地を4本の15mLコニカルチューブに追加した。

50

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。

【2180】

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℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5%CO₂。インキュベーターからG-R EX 100MCSを取り出した。300mL移送パックを準備した。移送パックをG-R EX 100MCSに溶接した。

【2181】

TIL採取及びTIL採取の開始のためにフラスコを準備した。TILが採取された。Gatherexを使用して、血液フィルターをとおして300mL移送パックの中に細胞懸濁液を移した。付着した細胞について膜を点検した。

【2182】

フラスコ膜をすすいだ。G-R EX 100MCS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。

【2183】

Bac-T試料を引き出した。BSC内で、1L「上清」移送パックから約20.0mLの上清を引き上げ、滅菌50mLコニカルチューブに分注する。

【2184】

試料計画に従ってBac-T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Bac-T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。

【2185】

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。

【2186】

TIL懸濁液の体積を調節した。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)。除去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。

【2187】

総生TIL細胞を計算した。平均総細胞濃度*：総体積、総生細胞：C=A×B。

【2188】

フローサイトメトリーのための計算：総生TIL細胞数が 4.0×10^7 個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために 1.0×10^7 個の細胞を取得するための体積を計算した。

【2189】

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： 1.0×10^7 個の細胞Aで除算された生細胞濃度。

【2190】

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。

【2191】

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。

【2192】

バイアルを充填した。1.0 mL 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、SOP-00242 当たり適切なサイズの凍結バイアルに等分した。体積が ≤ 0.5 mL である場合、容量が 0.5 mL になるまで CS-10 をバイアルに追加する。

【2193】

試料の TIL 凍結保存

凍結保存のための 1×10^7 個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。TIL をインキュベーターに入れた。

試料の凍結保存。

【2194】

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 0.5 mL の CS-10 を記録した。

【2195】

11日目-フィーダー細胞

フィーダー細胞を取得した。LN2 冷凍庫から少なくとも2つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の3つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴または Cryotherm を準備した。 $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 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。

【2196】

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。

【2197】

細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の3 mL 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 4×1.0 mL 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。

【2198】

フィーダー細胞懸濁液の体積を調整した。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。全生存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、 $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 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。

【2199】

必要に応じて希釈液を調製し、4.5 mL の AIM-V 培地を4本の15 mL コニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に別個の3 mL 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 4×1.0 mL 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、細胞計数試料を除去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。4.0 mL 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 個の生存フィーダー細胞を取得するために必

10

20

30

40

50

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。

【2200】

1. 0 mL シリンジ及び16 G 針を使用して、0.15 mL 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。

11日目のG-R EX 充填及び播種

G-R EX 500 MCS を設定した。「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-R EX 500 MCS にポンプで注入した。4.5 L の培地をG-R EX 500 MCS 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-R EX 500 MCS に溶接した。フィーダー細胞をG-R EX 500 MCS 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-R EX 500 MCS に追加した。熱融着した。G-R EX 500 MCS を $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。CO₂ パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。

【2201】

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-R EX 500 MCS 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。

【2202】

11日目の過剰TIL凍結保存

該当：過剰TILバイアルを凍結させた。凍結前にCRFが設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルをCRFから適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。LN₂における保管場所を記録した。

【2203】

16日目の培地の調製

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10 L の Lab tainer 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10 L の Lab tainer 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10 L の Lab tainer を設定し、ラベル付けした。上清用の10 L の Lab tainer 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為得るTIL採取中に使用された。

【2204】

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つのバッグ当たりIL-2 (6×10^6 IU/mL) (BR71424) の 5×1.1 mL アリコート解凍した。100.0 mL の GlutaMax を等分した。IL-2 を GlutaMax 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 + 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： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。完全なCM4の16日目培地を温めた。希釈液を調製した。

【2205】

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： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。インキュベーターからG-R EX 500 MCS を取り出した。1 L の移送パックを準備し、TIL 懸濁液としてラベル付けし、1 L の重量を量った。

【2206】

G-R E X 5 0 0 M C S の減容。約 4.5 L の培養上清を G-R E X 5 0 0 M C S から S O P - 0 1 7 7 7 当たり 1 0 L の L a b t a i n e r に移した。

【2207】

T I L 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。

【2208】

T I L 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。

【2209】

T I L 採取。T I L 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。G a t h e R e x を使用して、細胞懸濁液を T I L 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-R E X 5 0 0 M C S 上のクランプを閉じた。T I L を含む移送パックを熱融着した。上清を含む 1 0 L の L a b t a i n e r 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。

【2210】

無菌性及び B a c T 試験試料採取：調製された B a c T とラベル付けされた 1 5 m L のコニカルから 1.0 m L の試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。B S C 内で、各試料に別個の 3 m L シリンジを使用して、「T I L 懸濁液」移送パックから 4 × 1.0 m L の細胞計数試料を取り出した。

【2211】

マイコプラズマ試料を取り出した。3 m L シリンジを使用して、T I L 懸濁液移送パックから 1.0 m L 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 1 5 m L コニカルに入れた。

【2212】

播種用の移送パックを準備した。T I L をインキュベーターに入れた。細胞懸濁液を B S C 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、0.5 m L の細胞懸濁液を調製された 4.5 m L の A I M - 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 : 1 0 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。T I L 懸濁液の体積を調整した。細胞計数試料を取り出した後の T I L 懸濁液の調整された体積を計算した。5.0 m L を差し引いた総 T I L 細胞体積が試験のために取り出された。

【2213】

総生 T I L 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-R E X 5 0 0 M C S 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。

【2214】

二次培養用のフラスコの数进行計算した。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-R E X - 5 0 0 M フラスコ毎に「C M 4 の 1 6 日目培地」の 1 つの 1 0 L 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 G R E X - 5 0 0 M 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-R E X 5 0 0 M C S を充填した。培地をポンプで注入するように準備し、4.5 L の培地を G-R E X 5 0 0 M C S 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-R E X 5 0 0 M C S フラスコに追加する T I L 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

10

20

30

40

50

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-R E X 5 0 0 M C S を取り出した。ポンプで注入するための G-R E X 5 0 0 M C S 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 T I L 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)「T I L 懸濁液」移送バックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。T I L 懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【2215】

フラスコに T I L 懸濁液を播種した。計算された T I L 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。

【2216】

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 L E D ディスプレイ：37.0 ± 2.0 °C、C O 2 パーセンテージ：5.0 ± 1.5 % C O 2。フラスコをインキュベートした。

【2217】

22 日目にインキュベーターから G-R E X 5 0 0 M C S を取り出す時間範囲を決定した。

【2218】

22 日目の洗浄緩衝液の調製

10 L の L a b t a i n e r バッグを準備した。B S C 内で、ルアー接続を介して 4 インチ血漿移送セットを 10 L の L a b t a i n e r バッグに取り付けた。10 L の L a b t a i n e r バッグを準備した。B S C 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-R E X 5 0 0 M C S フラスコ毎に、1 つの 10 L L a b t a i n e r バッグを準備した。P l a s m a l y t e を 3 0 0 0 m L 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、3 0 0 0 m L の O r i g e n バッグから空気を除去した。ヒトアルブミン 25 % を 3 0 0 0 m L バッグに追加した。120.0 mL の最終体積のヒトアルブミン 25 % を取得した。

【2219】

I L - 2 希釈液を調製した。10 mL シリンジを使用して、L O V O 洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、5.0 mL の L O V O 洗浄緩衝液を取り出した。L O V O 洗浄緩衝液を 50 mL コニカルチューブに分注した。

【2220】

C R F ブランクバッグ L O V O 洗浄緩衝液が等分された。100 mL シリンジを使用して、無針注入ポートから 70.0 mL の L O V O 洗浄緩衝液を引き上げた。

【2221】

I L - 2 を解凍した。すべての氷が融解するまで、1 つの 1.1 mL の I L - 2 (6 × 106 I U / mL) を解凍した。I L - 2 の調製。50 μ L の I L - 2 ストック (6 × 106 I U / mL) を、「I L - 2 希釈液」とラベル付けされた 50 mL コニカルチューブに追加した。

【2222】

凍結保存調製。5 つのクライオカセットを 2 ~ 8 °C に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【2223】

細胞計数希釈液を調製した。B S C 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 4.5 mL の A I M - V 培地を 4 本の別個の 15 mL 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 B S C の下でバイアルを保存した。

【2224】

22 日目の T I L 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 L E D ディスプレイ：37 ± 2.0 °C、C O 2 パーセンテージ：5 % ± 1.5 %。インキュベーターから G-R

10

20

30

40

50

E X 5 0 0 M C S フラスコを取り外した。T I L 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 . 5 L の上清を G - R E X 5 0 0 M C S から上清バッグに移した。

【 2 2 2 5 】

T I L 採取用のフラスコを準備した。T I L 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。T I L の収集を開始した。T I L 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。T I L 採取。G a t h e R e x を使用して、T I L 懸濁液を 3 0 0 0 m L 収集バッグの中に移した。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 - R e x 5 0 0 M C S 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 L O V O 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 . 0 m L の細胞計数試料を取り出した。

【 2 2 2 6 】

細胞計数を行った。N C - 2 0 0 及びプロセス注記 5 . 1 4 を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、0 . 5 m L の細胞懸濁液を調製された 4 . 5 m L の A I M - V 培地の中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 : 1 0 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。L O V O ソースバッグの重量を量った。総生 T I L 細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【 2 2 2 7 】

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 1 0 . 0 m L を取り出し、1 5 m L コニカルに入れた。

【 2 2 2 8 】

L O V O

「T I L G - R E X 採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。P l a s m a L y t e を取り付けした。P l a s m a L y t e が取り付けられていることを検証し、P l a s m a L y t e 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。P l a s m a L y t e が動いていることを確認した。

【 2 2 2 9 】

最終製剤及び充填

標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するための C S - 1 0 及び L O V O 洗浄緩衝液の体積を計算した。C R F ブランクを調製した。

【 2 2 3 0 】

最終製品に追加する I L - 2 の体積を計算した。所望される最終 I L - 2 濃度 (I U / m L) - 3 0 0 I U / m L 。 I L - 2 作業ストック：6 × 1 0 ⁴ I U / m L 。接続装置を組み立てた。4 S - 4 M 6 0 を C C 2 細胞接続に滅菌溶接した。(プロセス注記 5 . 1 1 に従って) C S 7 5 0 クライオバッグを準備されたハーネスに滅菌溶接した。C S - 1 0 バッグを 4 S - 4 M 6 0 のスパイクに溶接した。I L - 2 を用いて T I L を調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「I L - 2 6 × 1 0 ⁴」アリコートから決定された I L - 2 の量を取り出した。配合された T I L バッグをラベル付けした。配合された T I L バッグを装置に追加した。C S 1 0 を追加した。シリンジを交換した。約 1 0 m L の空気を 1 0 0 m L シリンジに引き込み、装置上の 6 0 m L シリンジを交換した。C S 1 0 を追加した。C S - 7 5 0 バッグを準備した。細胞を分注した。

【 2 2 3 1 】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。1 0 m L の空気を新しい 1 0 0 m L のシリンジに引き込み、装置上のシリンジを交換した。保持液を 5 0 m L コニカルチューブに分注し、チュー

10

20

30

40

50

ブを「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。

【2232】

目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または2～8℃で保持した。

【2233】

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、2.0 mLの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるために15 mLコニカルチューブに入れた。細胞計数及び計算を行った。注記：1つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。IFN-γを計算した。最終製品バッグを熱融着した。

【2234】

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。

【表53】

表43：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	15 mLコニカル
内毒素	2	1.0 mL	2 mLクライオバイアル
グラム染色	1	1.0 mL	2 mLクライオバイアル
IFN-g	1	1.0 mL	2 mLクライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0 mL	2 mL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	2 mLクライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5 mL	2 mLクライオバイアル

【2235】

無菌性及びBac-T。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1.0 mL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。

【2236】

最終製品の凍結保存

速度制御された冷凍庫を準備した。CRFが設定されていることを検証した。CRFプローブを設定した。最終製品及び試料をCRFに入れた。4℃±1.5℃に達し、CRF実行を進めるために必要な時間を決定した。CRFが完了し、保管された。実行の完了後にCRFを停止させた。カセット及びバイアルをCRFから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相LN₂に移した。保管場所を記録した。

【2237】

後処理の概要

後処理：最終医薬品

(22日目) フローサイトメトリーによる22日目のREPでのCD3+細胞の決定

【2238】

(22日目) グラム染色方法 (GMP)

【2239】

(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

【 2 2 4 0 】

(1 6 日 目) B a c T 無 菌 性 ア ッ セ イ (G M P)

【 2 2 4 1 】

(1 6 日 目) T D - P C R (G M P) に よ る マ イ コ プ ラ ズ マ D N A 検 出

【 2 2 4 2 】

許 容 さ れ る 外 観 属 性

【 2 2 4 3 】

(2 2 日 目) B a c T 無 菌 性 ア ッ セ イ (G M P) (2 2 日 目)

【 2 2 4 4 】

(2 2 日 目) I F N - ガ ン マ ア ッ セ イ

10

【 2 2 4 5 】

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 。

【 2 2 4 6 】

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 。

20

【 2 2 4 7 】

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 。

【 2 2 4 8 】

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 。

30

40

50

【図面】

【図 1】

プロセス 2 A : ステップ A ~ E から約 2 2 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 ~ 1 4 日

3. ステップ C

第 1 の拡張 ~ 第 2 の拡張への

移行ストレージなし及び閉鎖系

4. ステップ D

第 2 の拡張 IL-2、OKT-3、
及び抗原提示フィーダー細胞閉鎖系

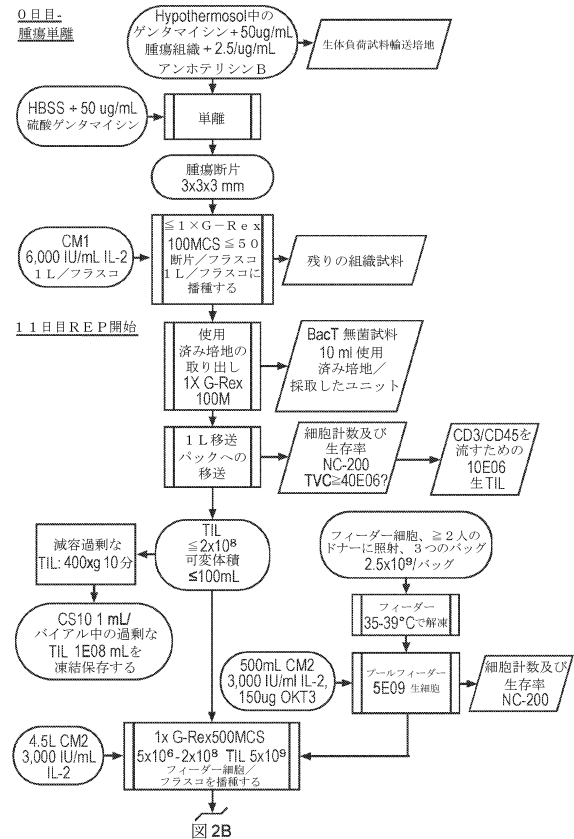
5. ステップ E

ステップ D からの TIL を採取する閉鎖系

6. ステップ F

最終製剤及び/または注入バッグに移す
(任意選択で凍結保存する)

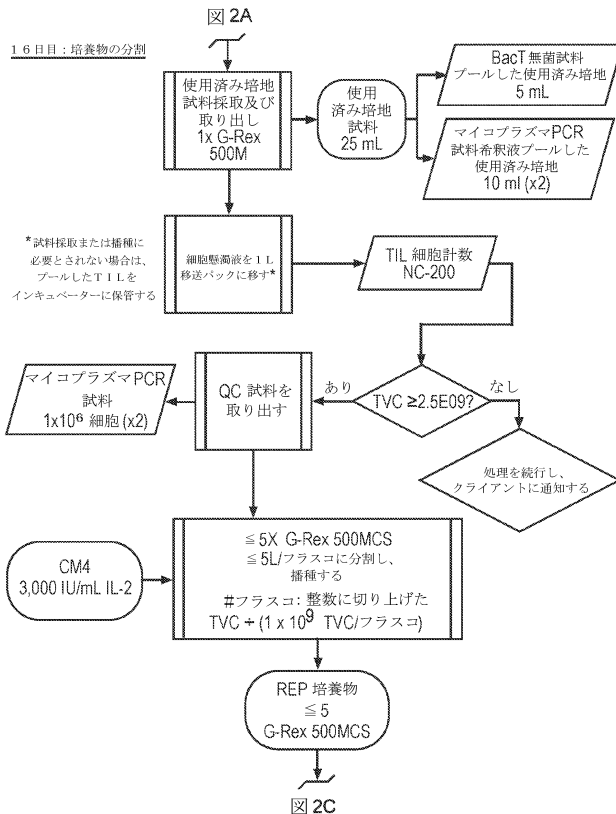
【図 2 A】



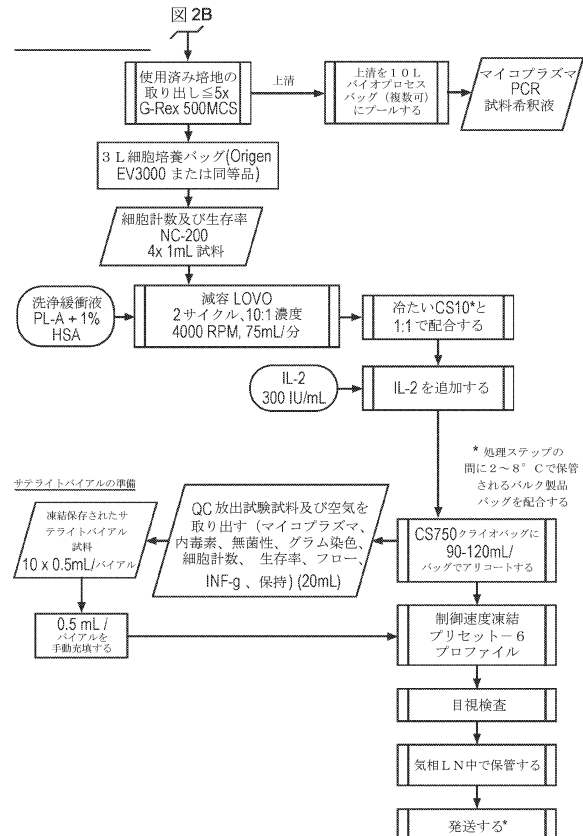
10

20

【図 2 B】



【図 2 C】

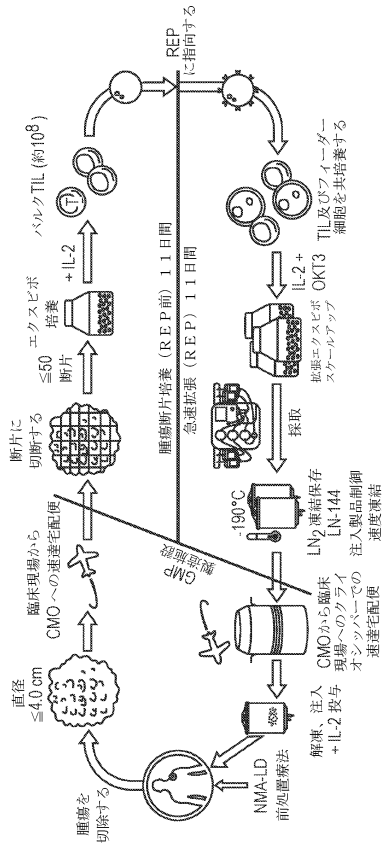


30

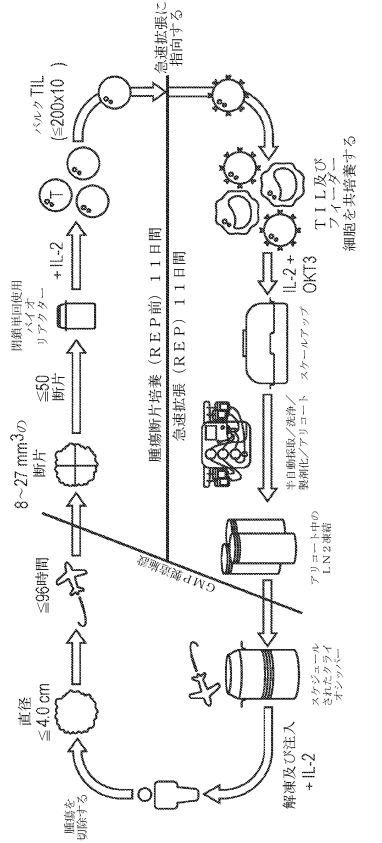
40

50

【図 3】



【図 4】



【図 5】

プロセス 1 C : ステップ A ~ E について 43 ~ 55 日	プロセス 2 A : 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 の拡張への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 ~ 第 2 の拡張への移行ストレージなし及び閉鎖系
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、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	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 1 C 実施形態	プロセス 2 A 実施形態	利点
REP 前	10 個の GREX-10 フラスコ当たり 4 個の断片 11 ~ 21 日間	1 つの GREX-100M フラスコ当たり 40 個の断片 11 日間	- フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 - 培養時間の短縮 - ステップ数の削減 - 閉鎖系に達している
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)	REP 前 TIL は、11 日目に直接 REP に移動する	- 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 - 閉鎖系に達している
REP	- REP 0 日目に 6 つの GREX-100M フラスコ - REP 0 日目に 5 × 10⁶ TIL 及び 5 × 10⁶ 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 × 10⁶ TIL 及び 5 × 10⁶ PBMC フィーダー 16 日目に 6 個以下の GREX-500M フラスコに分割する 11 日間	- ステップ数の削減 - REP 期間の短縮 - フラスコ間の TIL の閉鎖系移送 - 閉鎖系増地交換
採取	遠心分離によって採取した TIL	LOVO 自動細胞洗浄システムを介して採取した TIL	- ステップ数の削減 - 自動細胞洗浄 - 閉鎖系 - 洗浄中の製品損失の低減
最終製剤化	- Hypothermosol 中の新鮮な製品 - 単回注入バッグ - 限定された発送安定性	- LN₂ 中で保管された PlasmaLytic-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

10

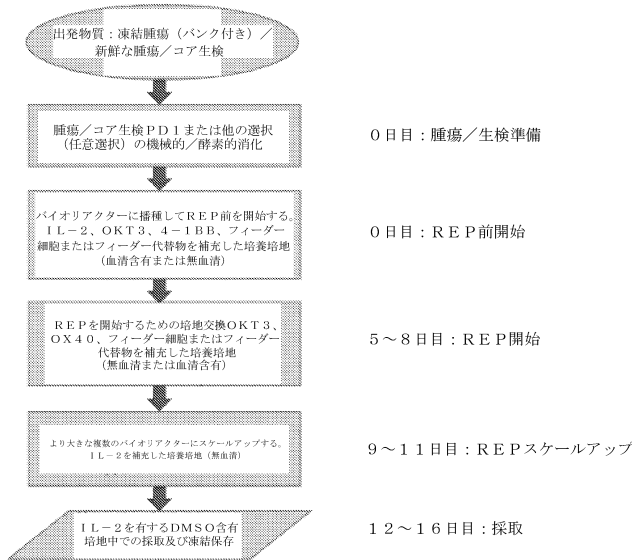
20

30

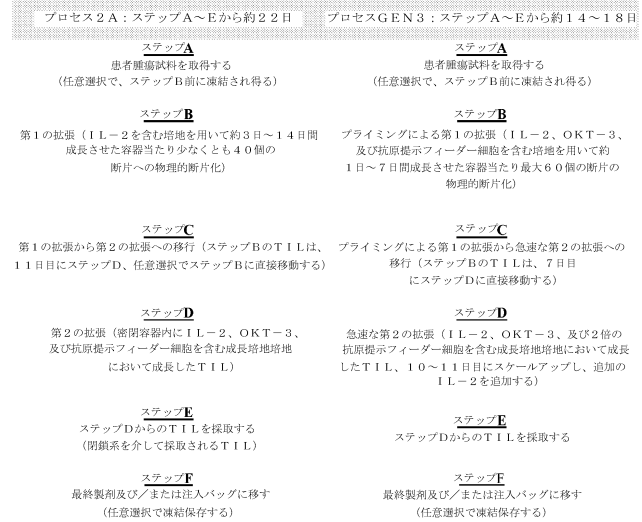
40

50

【図 7】

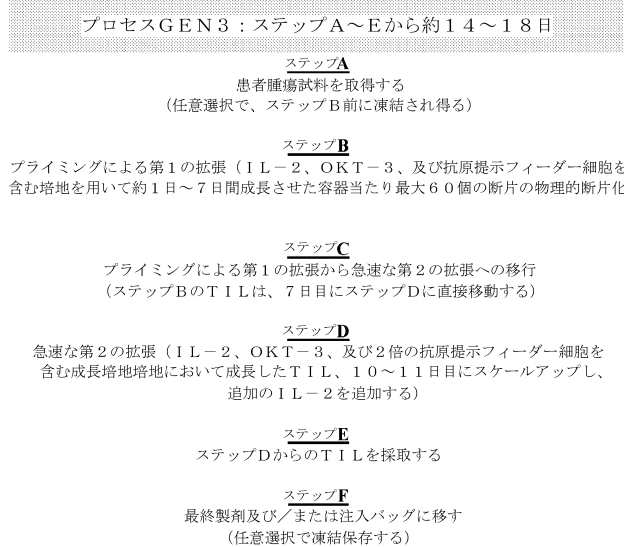


【図 8 A】



10

【図 8 B】



【図 8 C】



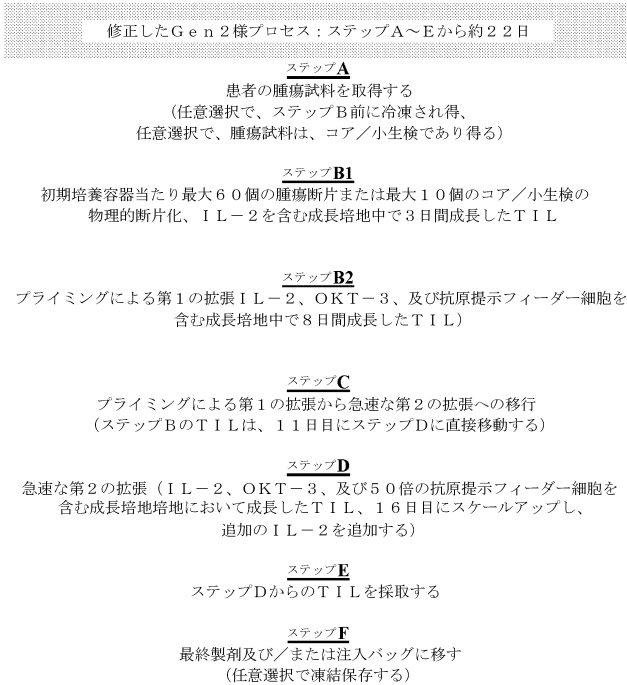
20

30

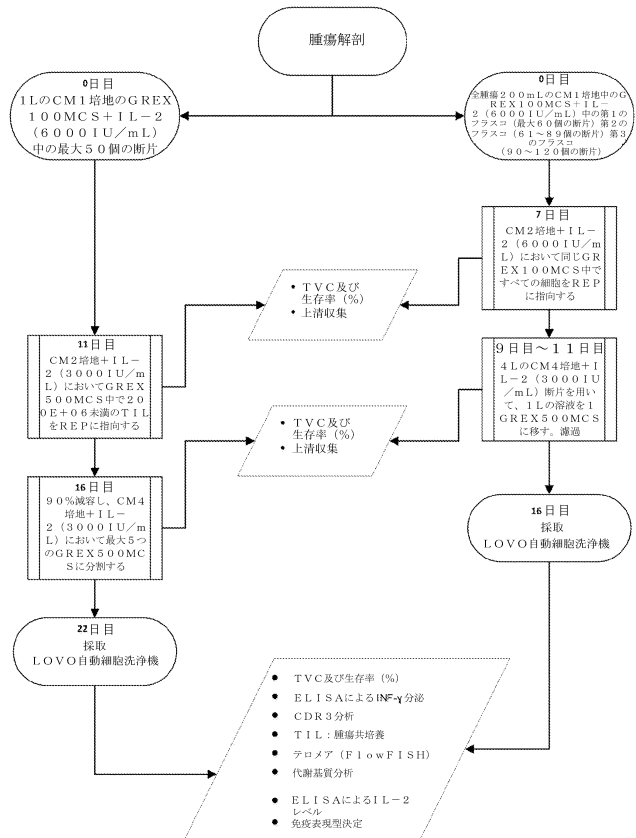
40

50

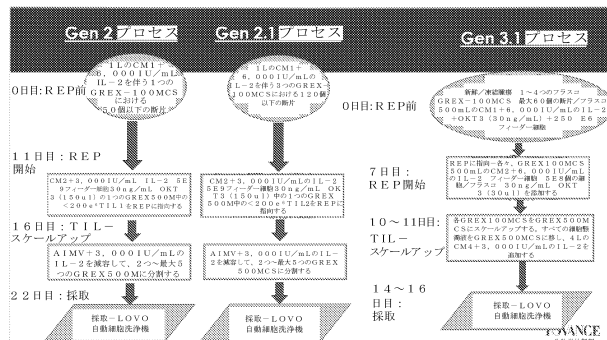
【図 8 D】



【図 9】



【図 10】



【図 11】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化されたGen 3.0
REP前-0日目	≤50個の断片/1つのG-Rex 100MCS-11日	≤180個の断片/3つのG-Rex、事前に配合されたCM1加温培地100MCS-11日	新鮮または凍結腫瘍1G-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(最大4つのG-Rex)、事前に配合された加温培地-7日。REP前、フィーダー-2.5E8細胞+O K T-3(30ng/mL)
REP開始	REPに指向-11日目<200E6TIL1つのG-Rex500MCS	REPに指向-11日目<200E6TIL1つのG-Rex500MCS中の事前に配合されたCM2加温培地	REPに指向-7日目-すべての細胞TIL-同じG-Rex100MCS(100MCS最大4つのG-Rex)、標準培地または合成培地(無血清)。追加のフィーダー-5E8細胞+O K T-3(30ng/mL)
TILの増殖またはスケールアップ	1～8つのG-REX500MCS事前に配合されたCM4加温培地16日目に分割する	2～5つのG-REX500MCS事前に配合されたCM4加温培地16日目に分割する	G-REX100MCSから、TIL懸濁液をG-REX500MCS、最大4つのGREX500MCSに移す-標準培地または合成培地(無血清)10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、LOVO自動細胞洗浄機(5回の洗浄サイクル)	14日目または16日目に採取するLOVO自動細胞洗浄機(5回の洗浄サイクル)
最終製剤	凍結保存した製品LN ₂ 中の300IU/mLのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品LN ₂ 中の300IU/mLのIL2-CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品LN ₂ 中の300IU/mLのIL2-CS10、複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

10

20

30

40

50

【図 1 2】

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×08)	+
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 E08
	日数での総フィーダー	750 E×06
プロセス日	条件	Gen 3.1
9 ~ 1 1 日目 スケールアップ	G-REX100MCSから、TIL懸濁液を1つのG-REX500MCS (最大5つのGREX500MCS) に移す	あり
1 6 日目 採取	LOVO自動細胞洗浄機	あり

【図 1 3】

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-R e x 5 0 0 M C S 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 T I L レポ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 1 4 ~ 1 6 日のプロセス (2 2 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 OK T 3 - 断片で開始した REP 1 0 0 M C S スケールから 5 0 0 M C S - 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)	- 増加した効力 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間 - 低減した試験試験 - 低下したプロセス変動 - 定義された試験 - 増加したレポートリー - 純度を低減する (フィーダー) - 同等またはより高い用量。

【図 1 4】

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	1 4 ~ 1 6 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	- 増加した効力 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間	- INF-γにより測定されるように効力を増加する - 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	- Gen 2 を上回って増加した効力 - CD 8 細胞における CD 2 8 の改善した発現 - Gen 3. 1 における 1 6 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 1 5】

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 Optimizer (無血清培地)

10

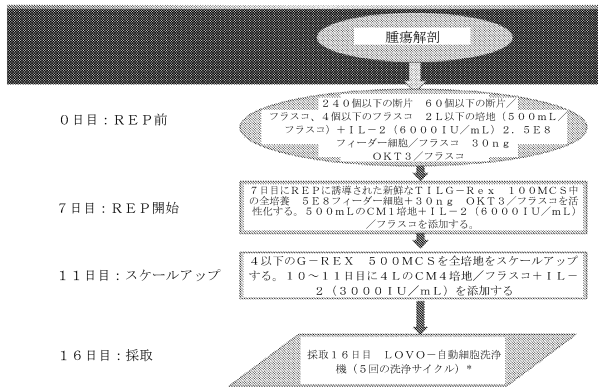
20

30

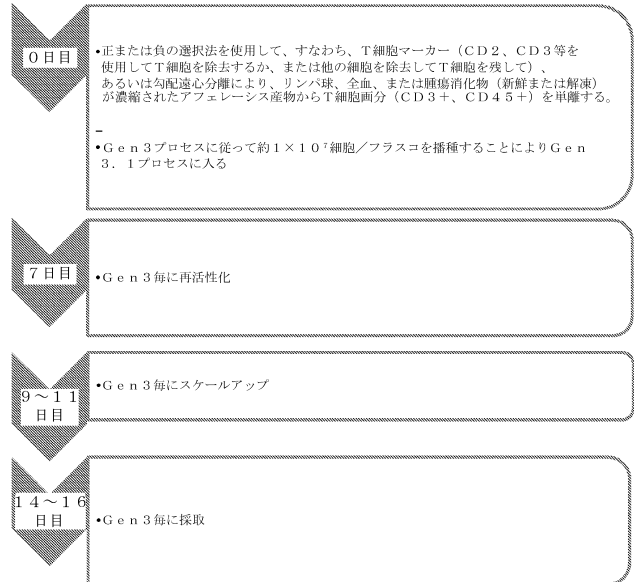
40

50

【図 16】



【図 17】



10

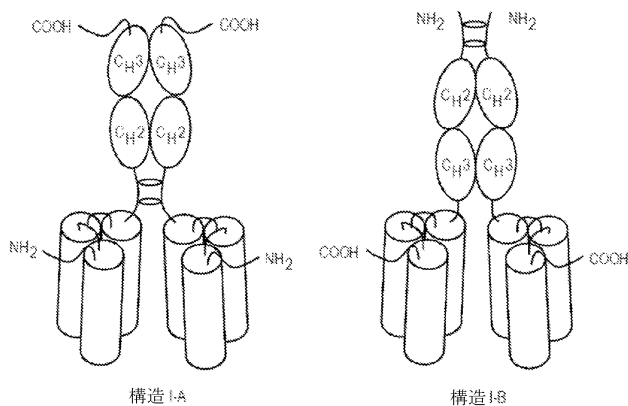
20

30

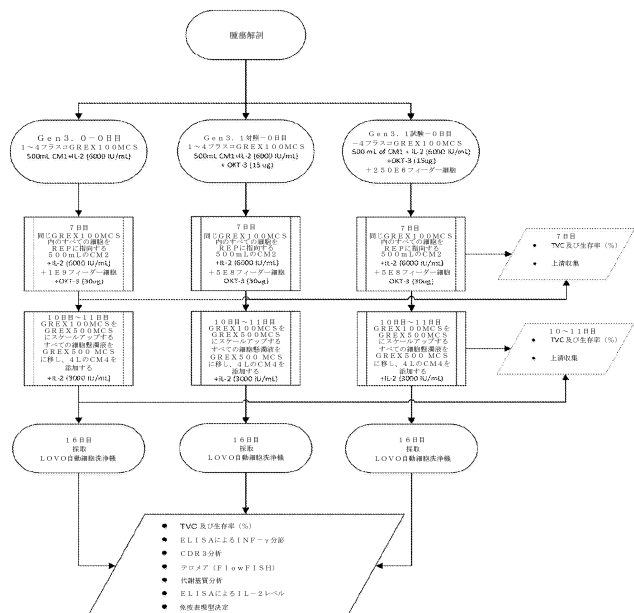
40

50

【図 18】



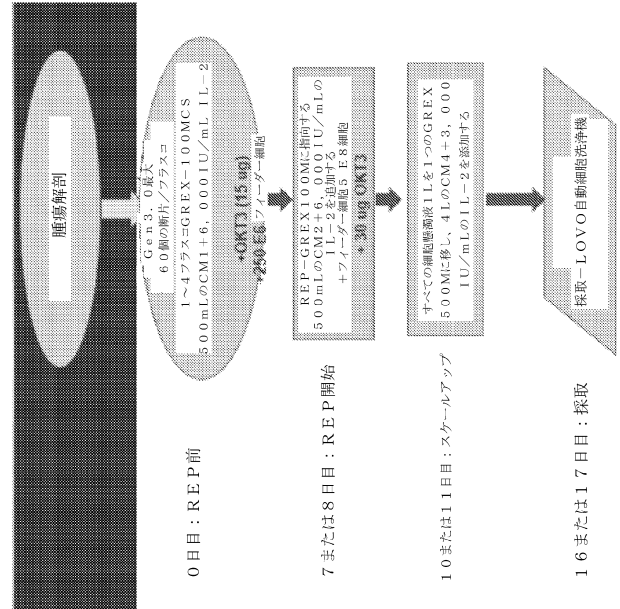
【図 19】



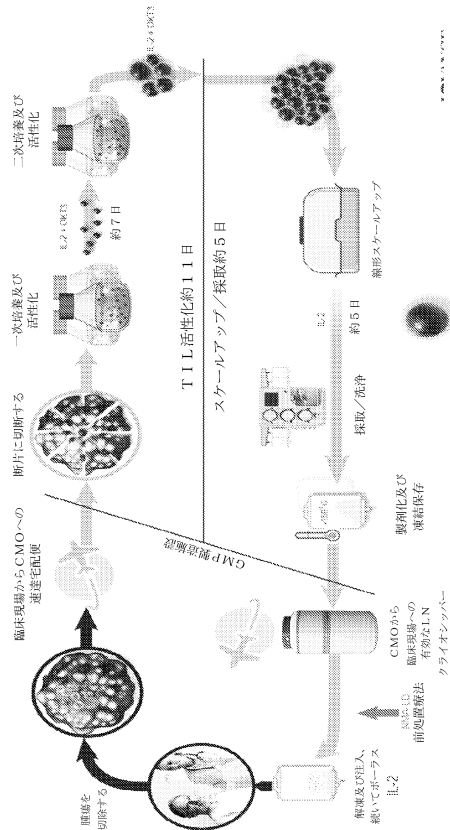
【圖 20】

プロセス日	条件	Gen 3.1 試験
0 日目 - REP 開始前	培地 CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT3 (15 ug)	+
	フィーダー (250 E+06)	+
プロセス日	条件	Gen 3.1 試験
7 日目 - REP 開始	培地 CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	7 日目に添加された OKT-3 (30 ug)	+
	7 日目に追加された フィーダー	500 E06
	日数でのフィーダー	750 E+06
プロセス日	条件	Gen 3.1 試験
9-11 日目 - スケールアップ	G-REX100MCS から、TIL 懸濁液を 1 つの G-REX500MCS (最大 3 つの GREX500MCS) に移す	あり
16 日目 - 採取	LOYO - 自動配流分機	あり

【図 2 1】



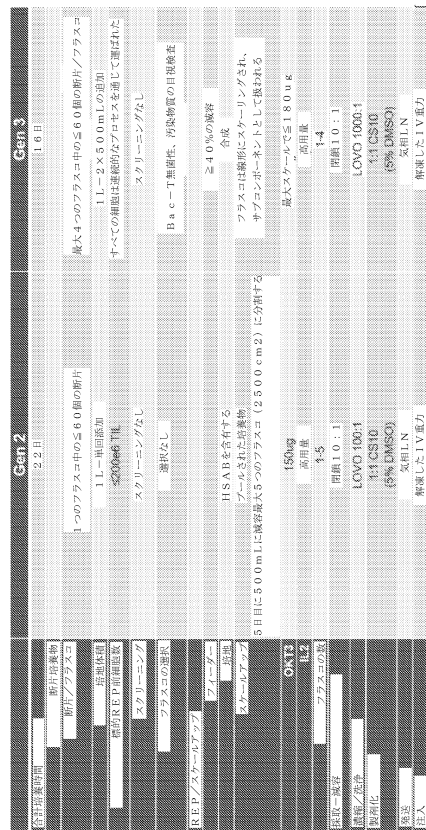
【図 22】



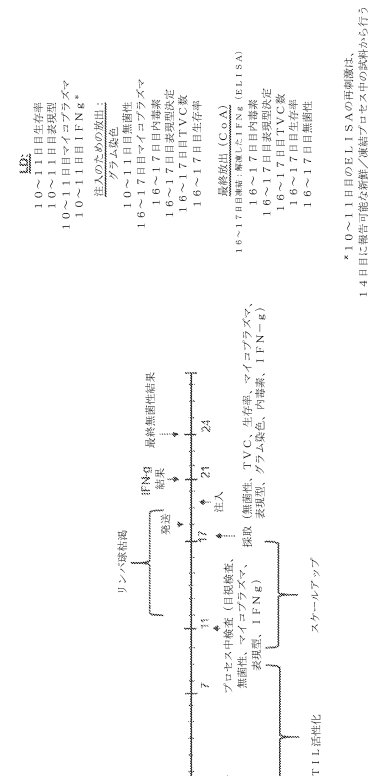
【図 23 A】

Gen 2	Gen 3
1つ2つのフラスコ中の 50.0gの断片 1 L 2-2×50.0mLの追加 520666 TL スクリーニングなし 選択なし	16~17日 最大4つのフラスコ中の 50.0gの断片、フラスコ 1 L 2-2×50.0mLの追加 すべてで細胞の運動の観察を通じて選ばれた スクリーニングなし Bacard 20無菌性、内容物質の目録検査
HSAPを含む プールの追加物 5日目に50.0 mLに減容 最大5つの追加物 (250.0 cm²) に分離する 1500g 減用量 10:1 100% DMSO 気相 LN	±4.0%の減少 合成 フラスコは断片にスクリーニングされ、 スクリーニングなしとして扱われる 最大スクリーンで±18.0 g 減用量 14 100% DMSO 100% DMSO 100% DMSO 気相 LN
1つ2つのフラスコ 50.0gの断片 1 L 2-2×50.0mLの追加 520666 TL スクリーニングなし 選択なし	16~17日 最大4つのフラスコ中の 50.0gの断片、フラスコ 1 L 2-2×50.0mLの追加 すべてで細胞の運動の観察を通じて選ばれた スクリーニングなし Bacard 20無菌性、内容物質の目録検査

【図 23 B】



【図 24】

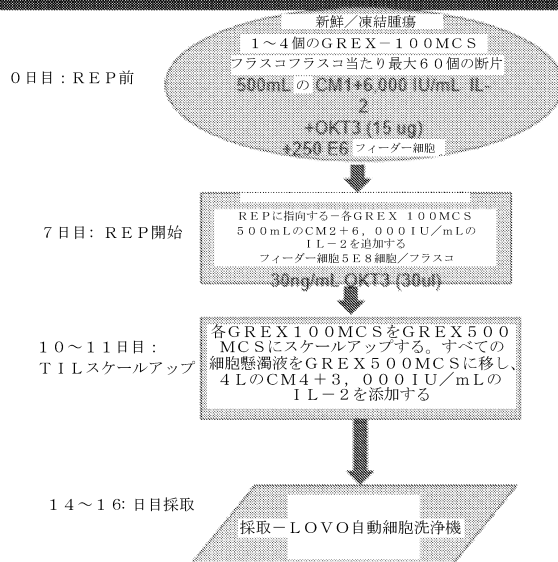


* 10~11日目のELISAの再刺激は、
14日目に報告可能な新鮮/凍結プロセス中の試料から行う

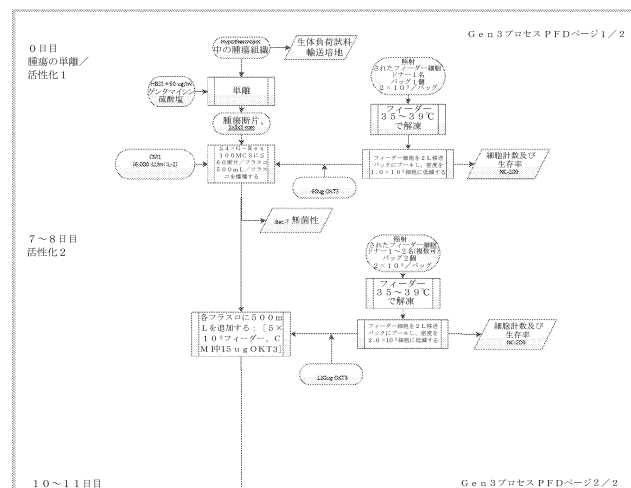
10

20

【図 25】



【図 26 A】

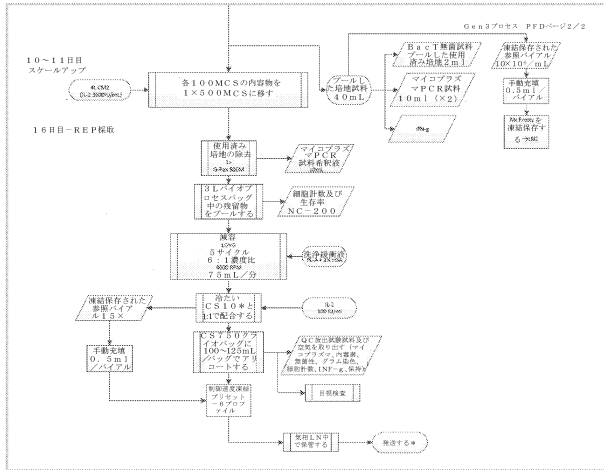


30

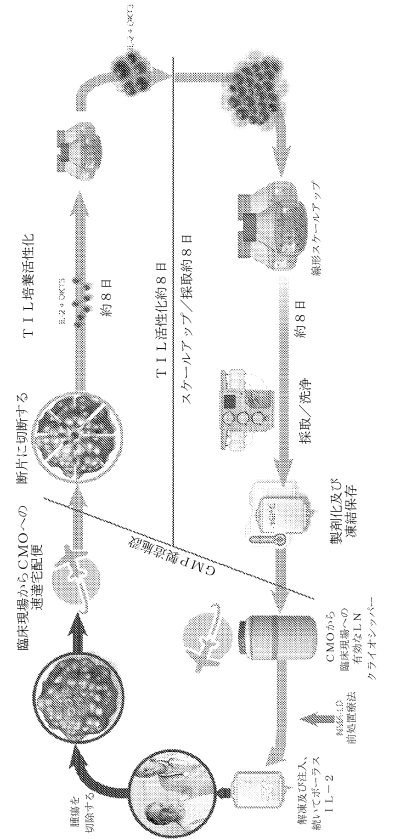
40

50

【図 26 B】



【圖 27】



【図 28】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
REP前- 0日	≤50個の断片 / 1 G R×100MCS - 11日	≤180個の断片 / 3 G -Re x、事前に配合され CM+1追加地 100M CS +11日	新築または拡張風通 1 G-Rexまたは3.0以下の断片から最大600の 断片を有する風通 000CSに於ける(G-Re x)、 2500CSに於ける(7日 REP前、フィーダー 車輪)と同等距離 - 7日 REP前、フィーダー 車輪 + CM + OKT - 3 (15 x)
REP開始	REPに指向 - 11日目 - <200 x TIL 1 G-Rx, 500MCS	REPに指向 - 11日目 - <200 x TIL 1つのG - REX 500MCS中の 事前に配されたCM2追加地増設	REPに指向 - 7日目 - すべての断片が TILと同じ 長さの CXI CS (15 x) の断片である。この G-REX 断片はすべては合法的な (無効化) フィーダー - 500 x 6 追加 + OKT - 3 (30 x) の添加
REP終了時 ケルアップ	REPに指向 - 11日目 - <200 x TIL 1 G-Rx, 500MCS	REPに指向 - 11日目 - <200 x TIL 1つのG - REX 500MCS中の 事前に配されたCM4追加地増設	G-REX 100MCSから、TIL長さをG-REX 500 MCS、最大4 x のG-REX 500 MCSに移す標準増地 または合法地 (無効化) 10日目までは11日目にスケールアップする
採取	22日に採取する、 LOVO自動地面分析機	22日に採取する、 LOVO自動地面分析機 (5回の洗浄サイクル)	LOVO目または16日に採取する LOVO自動地面分析機 (5回の洗浄サイクル)
最終期間	凍結保存した製品 LN ₂ +3000 U/m lの LL-2-CS10、複数のワークシート	凍結保存した製品 LN ₂ +3000 U/m lの LL-2-CS10、複数のワークシート	凍結保存した製品 LN ₂ +3000 U/m lの LL-2-CS10、複数のワークシート
プロセス時間	22日	22日	16日

【圖 29】

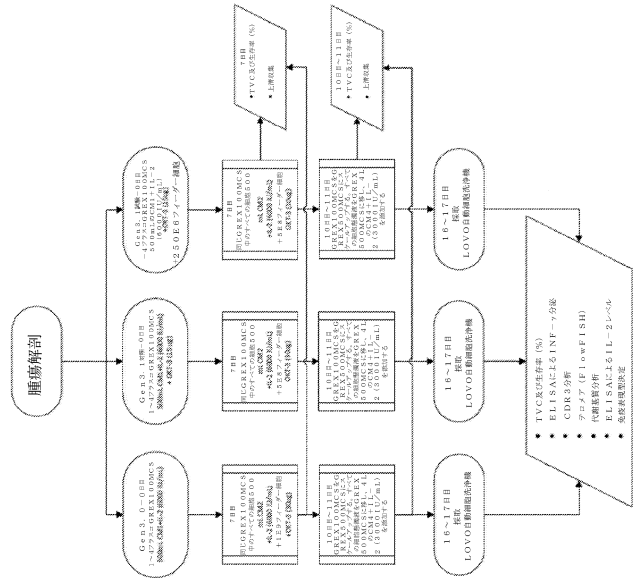
プロセス比較	プロセス変更	差異
Gen 2 : Gen 2.1	1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する 2つのG-Rex 500MCS フラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する - 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	- 増加したTILレパトリーを用いた最終細胞計数（用量）倍加の可能性。 - プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1 : Gen 3.1	- 新鮮または凍結腫瘍 14～16日のプロセス（22日から） - プロセス中の全フィーダー層を低減する 0目目に存在するフィーダー層及びOKT3 - 断片で開始したREP 100MCSスケールから500MCS - 複製数の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 - 低減した試験試験 - 低下したプロセス変動 - 合成された試験 - 増加したレパ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】

プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1 試験
0 日目:	培地 (*)	500 mL	500 mL	500 mL
腫瘍切片の単離及び活性化	IL-2	8000 IU/mL	8000 IU/mL	8000 IU/mL
	OKT-3	-	15 ug	15 ug
	フィードー	-	-	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:	培地 (*)	500 mL	500 mL	500 mL
T I L培養再活性化	IL-2	8000 IU/mL	5000 IU/mL	8000 IU/mL
	OKT-3	30 ug	30 ug	30 ug
	フィードー	1 E+08	500 E+06	500 E+06
	7 日目までに添加 されたフィードーの 合計	1 E+09	500 E+06	750 E+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:				
培養スケールアップ				GREX100から、IL-2 (3000 IU/mL) を含む 4 L培地を含有する1つのGREX500に、全TIL細胞数を移す。
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CTS無血清培地であり得る。

【圖 3 1】



【図 3 2】

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個の断片、 ≤60個の断片/フラスコ、 ≤4個のフラスコ、 ≤2Lの培地 (500mL/フラスコ) IL-2 (6000IU/mL) 2. 5×10⁸フィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT3/フラスコ
7~8日目 再有効化	新鮮なTILをREPに指向する。 培養物全体5×10⁸ フィーダー細胞、30ug OKT3/フラスコ G-Rex 100MCSを活性化する。 500mL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 G-REX500MCS GREX100MCSからILを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-自動細胞洗浄機から採取する Plasmalyte上の凍結保存 1% HSA:CS10

【圖 3 3】

試験	合格判定基準	Gen 3. 1 試験対 Gen 3. 0 プロセス
細胞計数 (TVC)	Gen 3.1 > 30% からプロセス Gen 3.0	Met
生存率 (%)	≧ 70 % の生存率	Met
免疫表現型決定 (%CD3+ / %CD45+)	Gen 3. 1 と Gen 3. 0 プロセスとの間の ≦ 5 % の差	Met
IFN γ 分泌	Gen 3. 1 ≧ からプロセス Gen 3. 0	Met

【圖 3 4】

特徴	Ped15001	Ped125002	Ped125003*	Ped4 [†] W32501518891
組織学 サイズ (直径の長さ)	扁平上皮癌 15 cm	骨肉腫 15 cm	骨肉腫 1 cm	骨肉腫 10.1 cm
外観/テクスチャ	血管浸潤なし、 白色不透明組織、 固体	血管系、壊れて かりりした 組織	主に骨、軟骨、 組織が骨組織を 取り囲んでいる	血管系
REP前TIL	異常なし	異常なし	低いREP 前TIVC	異常なし
REP後TIL	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
観察	異常なし	異常なし	異常なし	異常なし
切除場所	上顎骨切除	上腕骨	下腿	右後部皮下結節

*G.O.3を用いた顕微鏡ロットからのデータ

2例の腫瘍の形状は大きく異なっていたが、形状はほぼ円形・1.2個であった。この骨肉腫は、ほとんどが脂肪成分であり、軟骨切片に断片化され、残りの大きな骨質をアラスカに直接配置した。

1 Gen 3 を使用した臨床ロボットからのデータ
2 腫瘍は適切な大きさであったが、断片はわずか12個であった。この骨肉腫は、ほとんどが固形骨であり、軟骨切片に断片化され、残りの大きな骨塊をプラスチック内に直接配置した。

IGen 3を使用した臨床ロットからのデータ

2 腫瘍は適切な大きさであったが、断片はわず

れ、残りの大きな骨塊をツラスコ内に直接配置

【圖 3 5】

REP前 活性化	Gap 2 標的	Genet-2 プロセス			Genet-3 プロセス		
		Ped25001	Ped25002	Ped25003	W32901618891		
採取された断片 TVCの数 (11日目)	N/A	17	19	12 + 骨	157		
播種されたTVC	5 - 200e0	332e6	9e0	2e6	--		
採取されたTVC (LOVO前)	N/A	40.5e9	35.4e9	1,1e9	7.2e10		
採取されたTVC (LOVO後)	1-150e9	25.2e9	25.8e9	3.9e9	6.9e10		
LOVO回収率(%)	N/A	62%	73%	94%	98%		
細胞倍加数	N/A	7.5	6.5	9.9	--		
生存率(%)	> 70%	82.8%	90.2%	87%	80.2%		
%CD45+CD3+	> 90%	97.5%	92.6%	94.2%	90.9%		
FNγ (pg/mL)	> 500	2329	1335	6689	5062		
(刺激 - 非刺激)**							
グランザインB (pg/mL)**	N/A	8715	8354	18188	--		
% CD4+CD107A (刺激)	N/A	82.4%	82.4%	保留中	--		
% CD8+CD107A (刺激)	N/A	90.6%	94.3%	保留中	--		

（別添）
以下に、本邦の主要な産品を、その生産地、生産額、輸出額、輸入額、及びその増減率を、昭和二十一年の統計を基に、昭和二十二年の推定値を併記する。

【図 3 6】

採取物	Gen 2 範囲 (ボート 2 in 64)	PED5001	PED5002	Pea25003
	68 ± 9.7	98.2	71.7	90.4
TCRβ+				
TCRγδ+	0.05 ± 1.2	2	2.9	0.1
CD4+	68.9	7	7	34.1
CD8+	5.67 ± 0.94	21.3	53.6	50.2
CD4+CD8+	ND	7.3	20	5.8
CD4+CD8+	ND	2.6	20	0.7
血球	0.0 ± 0	0.2	0.5	0.6
B 細胞	0.0 ± 0	0	0	1.6
NK 細胞	0.15 ± 0.92	0.1	11.2	0.6
TN	0.10	0	0	1.4
TCM	1.16 ± 3.4	0.1	0	0.8
TEM	3.23 ± 9.8	97.1	99.5	87.3
TEMRA	0.01 ± 3	2.5	0.4	10.4
CD27+	0.567 ± 85	0.2	7.2	2.7
CD28+	20.78 ± 2	97.9	98.2	50.3
CD57+	5.52 ± 56	7.9	2.7	4.3
KLRG1+	8.5 ± 4.7	5.9	17.8	11.1
CD27+	0.3 ± 0.7	0.4	1.5	5.1
CD28+	0.51 ± 2.2	98.1	98.8	46.1
CD57+	0.03 ± 0.8	1.8	1.2	3.7
KLRG1+	0.54 ± 6.4	11.7	47.9	26.9
不純物 (生細胞の%)				
メソリー (CD3 + の%)				
分化 (生/CD3 + /CD4 +、 CD4 + の%)				
分化 (生/CD3 + /CD8 +、 CD8 + の%)				

定。

$$T_N: \text{ナイーブ}, T_{CM}: \text{セントラルメモリー}, T_{EM}: \text{エフェクターメモリー}, T_{EMRA}: \text{エフェクターメモリー-RA+}$$

【図 37】

採取物	Gen 2 範囲	PED25001	PED25002	PED25003
活性化 (生/CD 3 + /CD 4 +、CD 4 + の%)	2B4+	5.6	21.4	24.1
	BTLA4+	32.638	98.9	99.7
	CD25+	10.4-36.6	21.1	70.4
	CD69+	15.3-48.8	83.9	33.2
	CD95+	61.7-100	91.9	90.1
	LAG-3+	1.62-28.3	3.1	24.8
	PD-1+	5.67-85.6	9.4	10.6
	TIGIT+	16.6-52.1	76.0	14.9
	TIM-3+	55.7-91.3	99.9	99.9
	2B4+	4.24-79.5	55.1	57.2
活性化 (生/CD 3 + /CD 4 +、CD 4 + の%)	BTLA4+	26.7-85.7	98.2	98.6
	CD25+	0.75-98.8	4.8	2.9
	CD69+	10.6-35.4	72.7	87.1
	CD95+	81.7-100	90.8	97.4
活性化 (生/CD 3 + /CD 8 +、CD 8 + の%)	LAG-3+	3.66-57.2	28.4	20.1
	PD-1+	3.08-86.1	6.1	6.7
	TIGIT+	17.7-97.0	97.6	54.7
	CD8+ の%	25.0-100	90.2	90.2

【配列表】

2024500403000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/063922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **A61K35/17 A61K31/675 A61K38/20 A61K39/395 C12N5/0783**
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 C12N C07K A61P

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/061429 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 26 March 2020 (2020-03-26) paragraphs [0438] - [0440], [0486], [0687] - [0697]; claims 51-75 -----	1-85
X	WO 2020/131547 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 25 June 2020 (2020-06-25) paragraphs [1340] - [1396], [1467] - [1474], [1649], [1654] - [1665]; claims 103-109 ----- -/--	1-85

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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

31 March 2022

Date of mailing of the international search report

12/04/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Böhmerova, Eva

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/063922

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 2021/207091 A1 (WARDELL SETH [US] ET AL) 8 July 2021 (2021-07-08) paragraphs [0053] - [0069], [0072] - [0074], [0369], [0424], [0426], [0464]; claims 1-16; figure 119 paragraphs [0443] - [0446], [0726], [2634], [2786] -----	1-8, 24, 28, 29, 48-82, 85
X,P	WO 2021/123832 A1 (INSTIL BIO UK LTD [GB]) 24 June 2021 (2021-06-24) paragraphs [0325], [0341] - [0346], [0350] - [0356]; claims 1-87 paragraphs [0806], [0816]; example 12 -----	1-8, 48-81, 84, 85
X,P	WO 2021/226061 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 11 November 2021 (2021-11-11) paragraphs [1748], [1832]; claims 1-416 -----	1-8, 24, 28, 29, 48-81, 85

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/063922

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:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/063922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020061429 A1	26-03-2020	AU 2019342749 A1	18-03-2021
		BR 112021003678 A2	18-05-2021
		CA 3112599 A1	26-03-2020
		CN 112930114 A	08-06-2021
		EP 3852524 A1	28-07-2021
		JP 2022501038 A	06-01-2022
		KR 20210064269 A	02-06-2021
		SG 11202101787X A	29-04-2021
		TW 202028457 A	01-08-2020
		US 2021274776 A1	09-09-2021
		WO 2020061429 A1	26-03-2020
WO 2020131547 A1	25-06-2020	CA 3123392 A1	25-06-2020
		EP 3898949 A1	27-10-2021
		JP 2022514023 A	09-02-2022
		WO 2020131547 A1	25-06-2020
US 2021207091 A1	08-07-2021	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		EP 3910055 A1	17-11-2021
		ES 2874335 T3	04-11-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		HU E054829 T2	28-10-2021
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		PL 3601533 T3	16-08-2021
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		SI 3601533 T1	30-09-2021
		TN 2019000273 A1	07-01-2021
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 11202803 B1	21-12-2021
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/063922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020
		US 2020289569 A1	17-09-2020
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		US 2021353677 A1	18-11-2021
		US 2021361712 A1	25-11-2021
		US 2021361713 A1	25-11-2021
		US 2021379111 A1	09-12-2021
		US 2022000923 A1	06-01-2022
		US 2022000924 A1	06-01-2022
		US 2022000925 A1	06-01-2022
		US 2022008469 A1	13-01-2022
		WO 2018182817 A1	04-10-2018

WO 2021123832	A1	24-06-2021	NONE

WO 2021226061	A1	11-11-2021	NONE

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/04 (2006.01)	C 1 2 N	1/04		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00	Z	
C 1 2 N	9/16 (2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z	
C 1 2 N	9/50 (2006.01)	C 1 2 N	9/50		
(32)優先日 令和2年12月17日(2020.12.17)					
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)					
(31)優先権主張番号 63/162,437					
(32)優先日 令和3年3月17日(2021.3.17)					
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)					
(81)指定国・地域 AP(BW,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,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW					
グラフ フィンク					
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 7 0 サン カルロス ドーバー コート 1 9					
(72)発明者 ファーデイス, マリア					
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 7 0, サン カルロス, アバディーン ドライブ 1 0 5					
F ターム (参考) 4B029 AA08 BB11 GB07					
4B065 AA90X AA94X BD39 BD44 BD45 CA44					
4C084 AA02 BA44 CA53 DA14 MA02 MA66 NA05 ZB022 ZB092 ZB261					
ZC751					
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 CA04 MA66 NA14 ZB02 ZB26					
ZC75					
4H045 AA10 AA30 CA40 DA02 DA04 EA20					