(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7557367号
(P7557367)

(45)発行日　令和6年9月27日(2024.9.27)

(24)登録日　令和6年9月18日(2024.9.18)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 5/0783(2010.01)		C12N	5/0783	ZNA
A61K 35/17 (2015.01)		A61K	35/17	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
C12N 5/0786(2010.01)		C12N	5/0786	
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28	

請求項の数　46　（全324頁）

(21)出願番号　特願2020-526902(P2020-526902)
(86)(22)出願日　平成30年11月19日(2018.11.19)
(65)公表番号　特表2021-503281(P2021-503281A)
(43)公表日　令和3年2月12日(2021.2.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/061865
(87)国際公開番号　WO2019/100023
(87)国際公開日　令和1年5月23日(2019.5.23)
審査請求日　令和3年11月12日(2021.11.12)
(31)優先権主張番号　62/621,515
(32)優先日　平成30年1月24日(2018.1.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/588,044
(32)優先日　平成29年11月17日(2017.11.17)
最終頁に続く

(73)特許権者　519006377
アイオバンス バイオセラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０７０ サン カルロス インダストリアル ロード ８２５ スイート ４００
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　シンプソン－アベルソン，ミッシェル
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　細針吸引及び小生検からのＴＩＬ拡大培養

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、

（ｉ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で、患者の腫瘍からの少なくとも１つの細針吸引（ＦＮＡ）又は少なくとも１つの小生検から得られた第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記細胞培養培地は、１～３日目のいずれかの日にＯＫＴ－３を補充され、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充され、前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団を得るために３日間～１２日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、３日～１２日までに少なくとも５×10^7個のＴＩＬを含む、産生すること；及び

（ｉｉ）前記第２のＴＩＬ集団の前記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り、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第３のＴＩＬ集団は、数において前記第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために３日間～１２日間にわたって実施され、前記第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生することを含む方法。

【請求項２】

ステップ（ｉ）～（ｉｉ）は、１７日～２４日の期間内に実施される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】
ステップ（ｉ）～（ｉｉ）は、１８日～２２日の期間内に実施される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
ステップ（ｉ）～（ｉｉ）は、２０日～２２日の期間内に実施される、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
ステップ（ｉ）～（ｉｉ）は、２２日の期間内に実施される、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記ＰＢＭＣは、ステップ（ｉ）における培養の開始後３～１２日目のいずれかのステップ（ｉ）における細胞培養物又はステップ（ｉｉ）における培養の開始後１１～１４日目のいずれかのステップ（ｉｉ）における細胞培養物に添加される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記第３のＴＩＬ集団は、前記第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、ステップ（ｉｉ）における前記第３のＴＩＬ集団中の前記エフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２の細胞集団中のエフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項２～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記エフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入するためのものである、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
ステップ（ｉ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＩＬ－１５を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
ステップ（ｉ）における前記ＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記患者は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
ステップ（ｉ）における前記第１のＴＩＬ集団は、ＦＮＡから得られ、且つ、前記ＦＮ

Ａは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
ステップ（ｉ）における前記第１のＴＩＬ集団は、小生検から得られ、且つ、前記小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項２０】
ステップ（ｉｉ）は、前記治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量の前記ＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返され、且つ、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、２．３×10^{10}～１３．７×10^{10}個である、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
前記第１の拡大培養は、３日～１０日実施される、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記第３のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、ステップ（ｉｉ）における追加の第２の拡大培養を更に含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
（ａ）前記第１のＴＩＬ集団を閉鎖系に添加すること；
（ｂ）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り、前記第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、前記細胞培養培地は、１～３日目のいずれかの日にＯＫＴ－３を補充され、前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団を得るために３日間～１２日間にわたって実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、前記第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、３日～１２日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含み、前記第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖系で実施され、前記第２のＴＩＬ集団は、数において前記第１のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、ステップ（ａ）からステップ（ｂ）への移行は、前記系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｃ）前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、前記第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、前記第２の拡大培養は、前記第３のＴＩＬ集団を得るために３日間～１２日間にわたって実施され、前記第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、前記第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖系で実施され、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、前記系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた前記治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、前記系を開放することなく行われる、回収すること；及び
（ｅ）ステップ（ｄ）からの前記回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｄ）から（ｅ）への移行は、前記系を開放することなく行われる、移すことを含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記方法は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）における前記回収されたＴＩＬ集団を含む前記輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）であり、且つ、前記ＰＢＭＣは、照射され、且つ同種異系であり、且つ、前記ＰＢＭＣは、ステップ（ｂ）における第１の期間の３～１２日目のいずれか、又はステップ（ｃ）における第２の期間の３～１２日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項２３又は２４に記載の方法。
【請求項２６】

ステップ（ｂ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＩＬ－１５を更に補充することによって実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２７】
ステップ（ａ）における前記ＴＩＬは、ＦＮＡから得られ、且つ、前記ＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含み、且つ、前記ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られ、且つ、前記ＦＮＡは、肺腫瘍、黒色腫、頭頸部腫瘍、子宮頸部腫瘍、卵巣腫瘍、膵臓腫瘍、神経膠芽腫、結腸直腸腫瘍及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られ、且つ、前記肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、前記患者は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項２３に記載の方法。
【請求項２８】
ステップ（ａ）における前記第１のＴＩＬ集団は、小生検から得られ、且つ、前記小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られ、且つ、前記小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られ、請求項２３に記載の方法。
【請求項２９】
ステップ（ｄ）における前記回収は、LOVO（登録商標）細胞プロセスシステムを使用して実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項３０】
前記細胞培養培地は、Ｇコンテナ（登録商標）及びXuri細胞培養バッグ（登録商標）からなる群から選択される容器内に提供される、請求項２３に記載の方法。
【請求項３１】
ステップ（ｅ）における前記輸注バッグは、hypothermosol輸注バッグである、請求項２３に記載の方法。
【請求項３２】
ステップ（ａ）～（ｅ）は、１７日～２４日の期間内に実施され、ステップ（ａ）～（ｅ）は、１８日～２２日の期間内に実施され、あるいは、ステップ（ａ）～（ｅ）は、２０日～２２日の期間内に実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項３３】
ステップ（ａ）～（ｅ）及び、凍結保存は、２２日以下で実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項３４】
ステップ（ｄ）で回収された前記治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量の前記ＴＩＬのために十分なＴＩＬを含み、且つ、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、２．３×10^{10}～１３．７×10^{10}個である、請求項２３～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
ステップ（ａ）～（ｄ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ａ）～（ｄ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ａ）～（ｄ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす、請求項２３～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記抗原提示細胞は、前記系を開放することなく、ステップ（ｃ）における第２の拡大培養中に前記ＴＩＬに添加され、前記第３のＴＩＬ集団は、前記第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、前記第３のＴＩＬ集団中の前記エフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２のＴＩＬ集団から得られるエフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈し、且つ、前記第３のＴＩＬ集団から得られた前記エフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞は、前記第２のＴＩＬ集団から得られるエフェクターＴ細胞又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求

項３５に記載の方法。
【請求項３７】
ステップ（ｉ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＯＸ４０アゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３８】
ステップ（ｉ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項３９】
ステップ（ｉｉ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＩＬ－１５を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項４０】
ステップ（ｉｉ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＯＸ４０アゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項４１】
ステップ（ｉｉ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。
【請求項４２】
ステップ（ｂ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＯＸ４０アゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項４３】
ステップ（ｂ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項４４】
ステップ（ｃ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＩＬ－１５を更に補充することによって実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項４５】
ステップ（ｃ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地にＯＸ４０アゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項２３に記載の方法。
【請求項４６】
ステップ（ｃ）における前記第１の拡大培養は、前記第２のＴＩＬ集団の前記細胞培養培地に４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項２３に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
[0001] 本出願は、２０１７年１１月１７日に提出された米国仮特許出願第６２／５８８，０４４号、２０１８年１月２４日に提出された米国仮特許出願第６２／６２１，５１５号及び２０１８年１１月５日に提出された米国仮特許出願第６２／７５６，０３８号に対する優先権を主張し、これらは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景

[0002] 腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の養子移植を用いたかさ高い抵抗性の癌の処置は、予後不良の患者に対する治療への強力なアプローチとなる。Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393。免疫療法の成功には多量のＴＩＬが必要であり、商業化に向けてロバストで信頼性のある方法が求められている。これは、細胞拡大培養に伴う技術上、物流上及び規制上の問題に起因して実現が課題となっている。ＩＬ－２ベースのＴＩＬ拡大培養、それに続く「急速拡大培養法」（ＲＥＰ）は、その速さ及び効率から、ＴＩＬ拡大培養に好ましい方法となりつつある。Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54；Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57；Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39；Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41；Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。ＲＥＰは、１４日の期間でＴＩＬの１，０００倍の拡大をもたらすことができるが、それには、フィーダー細胞として、多くの場合に複数のドナーからの大過剰の（例えば、２００倍の）照射した同種異系末梢血単核球（ＰＢＭＣ、単核球（ＭＮＣ）としても知られる）並びに抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）及び高用量のＩＬ－２が必要である。Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。ＲＥＰ手順を経たＴＩＬは、黒色腫患者において宿主免疫抑制後に養子細胞療法の成功をもたらしている。現行の注入適合パラメータは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８又はＣＤ４陽性）の読み取り並びにＲＥＰ産物の拡大倍数及び生存率に依存するものである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

[0003] 現在のＴＩＬ製造プロセスは、ＴＩＬがどのように患者から取得されるかによって制限される。一部の場合、腫瘍が十分に小さいか又は腫瘍の切除が不可能な場所にある場合、拡大培養及び処置のためにＴＩＬを取得するための追加の方法の必要性が依然として存在する。本発明は、少数のＴＩＬを含有する細針吸引（ＦＮＡ）又はコア針生検からＴＩＬを拡大培養する方法を提供し、且つこれらの拡大培養されたＴＩＬを処置方法において使用することにより、この必要性を満たす。

【課題を解決するための手段】

【０００４】

発明の簡単な概要

[0004] 本発明は、細針吸引又はコア生検から分離されたＴＩＬを拡大培養し、且つ治療用ＴＩＬ集団を産生するための改善及び／又は短縮された方法を提供する。

【０００５】

[0005] 本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法を提供し、方法は、

（ｉ）患者の腫瘍からの少なくとも１つの細針吸引（ＦＮＡ）又は少なくとも１つの小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１０日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約３日～約１２日までに少なくとも5×10^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；及び

（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること

を含む。

【０００６】

［0006］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）におけるＩＬ－２を含む細胞培養培地は、ＯＫＴ－３を更に含み、且つ任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充されず、ステップ（ｉ）は、第１の初回刺激拡大培養ステップであり、及びステップ（ｉｉ）は、第２の急速拡大培養である。

【０００７】

［0007］ステップ（ｉｉｉ）後、細胞は、細胞培養物から取り出され、且つステップ（ｉｖ）を実施する前に貯蔵培地中に凍結保存される、請求項１又は２に記載の方法。

【０００８】

［0008］一部の実施形態において、細胞は、ステップ（ｉｖ）を実施する前に解凍される。

【０００９】

［0009］一部の実施形態において、ステップ（ｉｖ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。

【００１０】

［0010］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約１７日～約２４日の期間内に実施される。

【００１１】

［0011］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約１８日～約２２日の期間内に実施される。

【００１２】

［0012］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２０日～約２２日の期間内に実施される。

【００１３】

［0013］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２２日以内に実施される。

【００１４】

［0014］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）からの細胞は、ＣＤ４、ＣＤ８及びＴＣＲαβを新鮮回収細胞と同様のレベルで発現する。

【００１５】

［0015］一部の実施形態において、ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。

【００１６】

［0016］一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｉｉ）における３～１２日目のいずれか及び／又はステップ（ｉｉｉ）における１１～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される。

【００１７】

［0017］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、ステップ（ｉｖ）における治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【００１８】

［0018］一部の実施形態において、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【００１９】

［0019］一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである。

【００２０】

［0020］一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される。

【００２１】

［0021］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【００２２】

［0022］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【００２３】

［0023］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む。

【００２４】

［0024］一部の実施形態において、小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【００２５】

［0025］一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【００２６】

［0026］一部の実施形態において、肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、患者は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【００２７】

［0027］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる。

【００２８】

［0028］一部の実施形態において、ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる。

【００２９】

［0029］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、小生検から得られる。

【００３０】

［0030］一部の実施形態において、小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる。

【００３１】

［0031］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。

【００３２】

［0032］一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。

【００３３】

［0033］一部の実施形態において、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法を提供し、この方法は、

（ｉ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で患者の腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検から第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を得ることであって、細胞培養培地は、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約３日～約１２日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含む、得ること；及び

（ｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を得ることであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、得ること

を含む。

【００３４】
［0034］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）におけるＩＬ－２を含む細胞培養培地は、ＯＫＴ－３を更に含み、且つ任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充されず、ステップ（ｉ）は、第１の初回刺激拡大培養ステップであり、及びステップ（ｉｉ）は、第２の急速拡大培養ステップである。
【００３５】
［0035］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）における細胞培養培地からの細胞は、取り出され、且つステップ（ｉｉｉ）前に貯蔵培地中に凍結保存される。
【００３６】
［0036］一部の実施形態において、細胞は、ステップ（ｉｉｉ）前に解凍される。
【００３７】
［0037］一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである。
【００３８】
［0038］一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される。
【００３９】
［0039］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。
【００４０】
［0040］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。
【００４１】
［0041］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）における追加の第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。
【００４２】
［0042］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む。
【００４３】
［0043］一部の実施形態において、小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる。
【００４４】
［0044］一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から取られる。
【００４５】
［0045］一部の実施形態において、肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、患者は、以前に外科的処置を受けたことがある。
【００４６】
［0046］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる。
【００４７】
［0047］一部の実施形態において、ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる。
【００４８】
［0048］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、小生検から得られる。
【００４９】
［0049］一部の実施形態において、小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる。
【００５０】

［0050］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。
【００５１】
［0051］一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。
【００５２】
［0052］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。
【００５３】
［0053］一部の実施形態において、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。
【００５４】
［0054］本発明は、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法も提供し、方法は、
（ｉ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約３日～約１２日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；
（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；及び
（ｉｖ）治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含む。
【００５５】
［0055］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）におけるＩＬ－２を含む細胞培養培地は、ＯＫＴ－３を更に含み、且つ任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充されず、ステップ（ｉ）は、第１の初回刺激拡大培養ステップであり、及びステップ（ｉｉ）は、第２の急速拡大培養ステップである。
【００５６】
［0056］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）後、細胞は、細胞培養培地から取り出され、且つステップ（ｉｖ）前に貯蔵培地中に凍結保存される。
【００５７】
［0057］一部の実施形態において、細胞は、ステップ（ｉｖ）前に解凍される。
【００５８】
［0058］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。
【００５９】
［0059］一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである。
【００６０】

［0060］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【００６１】

［0061］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【００６２】

［0062］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む。

【００６３】

［0063］一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【００６４】

［0064］一部の実施形態において、肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【００６５】

［0065］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる。

【００６６】

［0066］一部の実施形態において、ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる。

【００６７】

［0067］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、小生検から得られる。

【００６８】

［0068］一部の実施形態において、小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる。

【００６９】

［0069］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。

【００７０】

［0070］一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。

【００７１】

［0071］本発明は、第３のＴＩＬ集団が、第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞が、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項５０～６６のいずれか一項に記載の方法も提供する。

【００７２】

［0072］一部の実施形態において、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【００７３】

［0073］一部の実施形態において、癌は、黒色腫、子宮頸癌、頭頸部癌、膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵癌、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なる群から選択される。

【００７４】

［0074］本発明は、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法も提供し、方法は、

（ｉ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で患者の腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検

から第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を得ることであって、細胞培養培地は、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約３日～約１２日までに少なくとも５×１０^{7}個のＴＩＬを含む、得ること；
（ｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を得ることであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、得ること；及び
（ｉｉｉ）治療有効投与量の治療用ＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含む。

【００７５】

［0075］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）におけるＩＬ－２を含む細胞培養培地は、ＯＫＴ－３を更に含み、且つ任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充されず、ステップ（ｉ）は、第１の初回刺激拡大培養ステップであり、及びステップ（ｉｉ）は、第２の急速拡大培養ステップである。

【００７６】

［0076］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）における細胞培養培地からの細胞は、取り出され、且つステップ（ｉｉｉ）前に貯蔵培地中に凍結保存される。

【００７７】

［0077］一部の実施形態において、細胞は、ステップ（ｉｉｉ）前に解凍される。

【００７８】

［0078］一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである。

【００７９】

［0079］一部の実施形態において、ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。

【００８０】

［0080］一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される。

【００８１】

［0081］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【００８２】

［0082］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【００８３】

［0083］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む。

【００８４】

［0084］一部の実施形態において、小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【００８５】

［0085］一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【００８６】

［0086］一部の実施形態において、肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【００８７】

［0087］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる。
【００８８】
［0088］一部の実施形態において、ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる。
【００８９】
［0089］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、小生検から得られる。
【００９０】
［0090］一部の実施形態において、小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる。
【００９１】
［0091］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。
【００９２】
［0092］一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。
【００９３】
［0093］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。
【００９４】
［0094］一部の実施形態において、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。
【００９５】
［0095］本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法も提供し、方法は、
（ａ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）第１の集団を閉鎖系に添加すること；
（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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約３日～約１２日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含み、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３～約１２日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放することなく行われる、回収すること；及び

（ｆ）ステップ（ｅ）から回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放することなく行われる、移すこと
を含む。
【００９６】
［0096］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）におけるＩＬ－２を含む細胞培養培地は、ＯＫＴ－３を更に含み、且つ任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充されず、ステップ（ｉ）は、第１の初回刺激拡大培養ステップであり、及びステップ（ｉｉ）は、第２の急速拡大培養ステップである。
【００９７】
［0097］一部の実施形態において、本方法は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）における回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む。
【００９８】
［0098］一部の実施形態において、凍結保存プロセスは、回収されたＴＩＬ集団対ＣＳ１０培地の１：１比を使用して実施される。
【００９９】
［0099］一部の実施形態において、ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。
【０１００】
［00100］一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、照射され、且つ同種異系である。
【０１０１】
［00101］一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｃ）における３～１２日目のいずれか及び／又はステップ（ｄ）における３～１２日目のいずれかに細胞培養物に添加される。
【０１０２】
［00102］一部の実施形態において、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである。
【０１０３】
［00103］一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される。
【０１０４】
［00104］一部の実施形態において、ステップ（ｃ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。
【０１０５】
［00105］一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。
【０１０６】
［00106］一部の実施形態において、ステップ（ａ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む。
【０１０７】
［00107］一部の実施形態において、小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる。
【０１０８】
［00108］一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる。
【０１０９】
［00109］一部の実施形態において、肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある。
【０１１０】
［00110］一部の実施形態において、ステップ（ａ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得

られる。
【０１１１】
［00111］一部の実施形態において、ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる。
【０１１２】
［00112］一部の実施形態において、ステップ（ａ）におけるＴＩＬは、小生検から得られる。
【０１１３】
［00113］一部の実施形態において、小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる。
【０１１４】
［00114］一部の実施形態において、ステップ（ｅ）における回収は、LOVO細胞プロセスシステムを使用して実施される。
【０１１５】
［00115］一部の実施形態において、細胞培養培地は、Ｇコンテナ及びXuri細胞培養バッグからなる群から選択される容器内に提供される。
【０１１６】
［00116］一部の実施形態において、ステップ（ｆ）における輸注バッグは、hypothermosol輸注バッグである。
【０１１７】
［00117］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１７日～約２４日の期間内に実施される。
【０１１８】
［00118］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約１８日～約２２日の期間内に実施される。
【０１１９】
［00119］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、約２０日～約２２日の期間内に実施される。
【０１２０】
［00120］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）は、２２日以下で実施される。
【０１２１】
［00121］一部の実施形態において、ステップ（ａ）～（ｆ）及び凍結保存は、２２日以下で実施される。
【０１２２】
［00122］一部の実施形態において、ステップ（ｅ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを含む。
【０１２３】
［00123］一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。
【０１２４】
［00124］一部の実施形態において、ステップ（ｂ）～（ｅ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ｂ）～（ｅ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ｂ）～（ｅ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす。
【０１２５】
［00125］一部の実施形態において、抗原提示細胞は、系を開放することなく、ステップ（ｄ）における第２の期間中にＴＩＬに添加される。
【０１２６】
［00126］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団と比べて

、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【０１２７】

［00127］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団から得られたエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【０１２８】

［00128］一部の実施形態において、微生物汚染のリスクは、開放系と比較して低減される。

【０１２９】

［00129］一部の実施形態において、ステップ（ｇ）からのＴＩＬは、患者に注入される。

【０１３０】

［00130］本発明は、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法も提供し、方法は、

（ａ）対象から切除された腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）第１の集団を閉鎖系に添加すること；

（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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１２日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約３日～約１２日までに少なくとも5×10^{7}個のＴＩＬを含み、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；

（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約３～約１２日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；

（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放することなく行われる、回収すること；及び

（ｆ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放することなく行われる、移すこと；

（ｇ）任意選択により、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）からの回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存すること；及び

（ｈ）ステップ（ｇ）における輸注バッグからの治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与すること

を含む。

【０１３１】

[00131] 一部の実施形態において、ステップ（ｅ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、ステップ（ｈ）において治療有効投与量のＴＩＬを投与するのに十分なＴＩＬを含む。

【０１３２】

[00132] 一部の実施形態において、ステップ（ｉｉ）におけるＩＬ－２を含む細胞培養培地は、ＯＫＴ－３を更に含み、且つ任意選択により、１～３日目のいずれか１つでＯＫＴ－３を補充されず、ステップ（ｉ）は、第１の初回刺激拡大培養ステップであり、及びステップ（ｉｉ）は、第２の急速拡大培養ステップである。

【０１３３】

[00133] 一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである。

【０１３４】

[00134] 一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される。

【０１３５】

[00135] 一部の実施形態において、ステップ（ｃ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【０１３６】

[00136] 一部の実施形態において、ステップ（ｄ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。

【０１３７】

[00137] 一部の実施形態において、ステップ（ａ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む。

【０１３８】

[00138] 一部の実施形態において、小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【０１３９】

[00139] 一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる。

【０１４０】

[00140] 一部の実施形態において、肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【０１４１】

[00141] 一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる。

【０１４２】

[00142] 一部の実施形態において、ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる。

【０１４３】

[00143] 一部の実施形態において、ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、小生検から得られる。

【０１４４】

[00144] 一部の実施形態において、小生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる。

【０１４５】

[00145] 一部の実施形態において、ステップ（ｈ）において治療有効投与量を投与するために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。

【０１４６】

[00146] 一部の実施形態において、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである。

【０１４７】

［00147］一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｃ）における３～１２日目のいずれか及び／又はステップ（ｄ）における３～１２日目のいずれかに細胞培養物に添加される。

【０１４８】

［00148］一部の実施形態において、ステップ（ｈ）で治療有効投与量のＴＩＬ細胞を投与する前に、非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、患者に投与されている。

【０１４９】

［00149］一部の実施形態において、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間にわたってシクロホスファミドを投与し、続いて２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間にわたってフルダラビンを投与するステップを含む。

【０１５０】

［00150］一部の実施形態において、本方法は、ステップ（ｈ）で患者にＴＩＬ細胞を投与した翌日に始まる高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップを更に含む。

【０１５１】

［00151］一部の実施形態において、高用量ＩＬ－２レジメンは、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含む。

【０１５２】

［00152］一部の実施形態において、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【０１５３】

［00153］一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【０１５４】

［00154］本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法も提供し、方法は、

（ａ）患者の腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）、小生検、コア生検又は小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）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り、第１の初回刺激拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の初回刺激拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために、第１のガス透過性表面積を含む容器内で約１～１４日間の第１の期間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より多い、産生すること；

（ｃ）第２のＴＩＬ集団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り、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の急速拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１日間～約１４日間の第２の期間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；及び

（ｄ）ステップ（ｃ）からの治療用ＴＩＬ集団を回収すること

を含む。

【０１５５】

［00155］一部の実施形態において、第１の期間は、約６～１２日間である。

【０１５６】

[00156] 一部の実施形態において、第２の期間は、約６～１２日間である。
【０１５７】
[00157] 一部の実施形態において、第１の期間は、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間又は１２日間からなる群から選択される。
【０１５８】
[00158] 一部の実施形態において、第２の期間は、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間又は１２日間からなる群から選択される。
【０１５９】
[00159] 一部の実施形態において、ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。
【０１６０】
[00160] 一部の実施形態において、ステップ（ｂ）で使用されるＡＰＣ対ステップ（ｃ）で使用されるＡＰＣの比は、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若しくは５：１又は好ましくは１：２である。
【０１６１】
[00161] 一部の実施形態において、第１のＴＩＬ集団は、コア生検から得られる。
【０１６２】
[00162] 一部の実施形態において、コア生検は、黒色腫腫瘍、卵巣癌腫瘍、子宮頸癌腫瘍、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）腫瘍、肺癌腫瘍、膀胱癌腫瘍、乳癌腫瘍、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌からの腫瘍、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）腫瘍、神経膠芽腫腫瘍、胃腸癌腫瘍及び腎癌腫瘍からなる群から選択される腫瘍から得られる。
【０１６３】
[00163] 本発明は、本明細書に記載される方法を使用して拡大培養されたＴＩＬを含む組成物も提供する。
【０１６４】
[00164] 一部の実施形態において、組成物は、凍結保存剤を更に含む。
【０１６５】
[00165] 一部の実施形態において、凍結保存剤は、ジメチルスルホキシドを含む。
【０１６６】
[00166] 一部の実施形態において、組成物は、凍結保存剤及び等張剤を更に含む。
【０１６７】
[00167] 一部の実施形態において、組成物は、ジメチルスルホキシドを含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む。
【０１６８】
[00168] 一部の実施形態において、組成物は、ジメチルスルホキシド及びデキストラン４０を含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む。
【０１６９】
[00169] 一部の実施形態において、ＴＩＬを含む組成物は、無菌輸注バッグで提供される。
【図面の簡単な説明】
【０１７０】
【図１】[00170]ステップＡ～Ｆの概要を提供する例示的なプロセス２Ａチャート。
【図２Ａ】[00171]プロセス２Ａのプロセスフローチャート。

【図２Ｂ】[00171]プロセス２Ａのプロセスフローチャート。
【図２Ｃ】[00171]プロセス２Ａのプロセスフローチャート。
【図３】[00172]凍結保存ＴＩＬの例示的な製造プロセス（約２２日間）の実施形態の図を示す。
【図４】[00173]プロセス２Ａ、ＴＩＬ製造の２２日間プロセスの実施形態の図を示す。
【図５】[00174]プロセス１Ｃ及びプロセス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】[00175]プロセス１Ｃの実施形態及びプロセス２Ａの実施形態の詳細な比較。
【図７Ａ】[00176]小生検の拡大培養プロセスのステップＡ～Ｆの概要を提示する例示的な小生検チャート。
【図７Ｂ】[00176]小生検の拡大培養プロセスのステップＡ～Ｆの概要を提示する例示的な小生検チャート。
【図７Ｃ】[00176]小生検の拡大培養プロセスのステップＡ～Ｆの概要を提示する例示的な小生検チャート。
【図８Ａ】[00177]膵臓癌患者（Ｐ７０１５）から採取されたコア生検から拡大培養された生細胞の画像。ＩＬ－２で処理されたコア生検。
【図８Ｂ】[00177]膵臓癌患者（Ｐ７０１５）から採取されたコア生検から拡大培養された生細胞の画像。ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで処理されたコア生検。
【図９Ａ】[00178]膵臓コア生検から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析。ＩＬ－２で処理されたコア生検から拡大培養されたＴ細胞は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋である。
【図９Ｂ】[00178]膵臓コア生検から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析。ＩＬ－２で処理されたコア生検から拡大培養されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＣＤ１０７ａ＋である。
【図９Ｃ】[00178]膵臓コア生検から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析。ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで処理されたコア生検から拡大培養されたＴ細胞は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋である。
【図９Ｄ】[00178]膵臓コア生検から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析。ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで処理されたコア生検から拡大培養されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、ＣＤ１０７ａ＋である。
【図１０Ａ】[00179]子宮頸癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｃ２００５）。ＩＬ－２で処理された細針吸引。
【図１０Ｂ】[00179]子宮頸癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｃ２００５）。ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで処理された細針吸引。
【図１１Ａ】[00180]肺癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｌ４０３２）。ＩＬ－２で処理された細針吸引。
【図１１Ｂ】[00180]肺癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｌ４０３２）。ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで処理された細針吸引。
【図１１Ｃ】[00180]肺癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｌ４０３２）。対照として、肺腫瘍断片をＩＬ－２と共に培養し、ＣＤ４及びＣＤ８＋Ｔ細胞を生成するために拡大培養した。
【図１２Ａ】[00181]肺癌患者（Ｌ４０３２）からのＦＮＡサンプルのＴＩＬを、急速拡大培養プロトコルを使用して更に拡大培養した。最初にＩＬ－２単独、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせ又は最初にＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせ後、ＩＬ－２単独のいずれかで最初に処理された吸引液から拡大培養したＴＩＬの急速拡大培養後の総細胞数。
【図１２Ｂ】[00181]肺癌患者（Ｌ４０３２）からのＦＮＡサンプルのＴＩＬを、急速拡大培養プロトコルを使用して更に拡大培養した。ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞がＩＬ－２で処理された拡大培養されたＴＩＬ集団に存在した。

【図１３Ａ】[00182]肺癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｌ４０３３）。ＩＬ－２で処理された細針吸引からのＴ細胞。
【図１３Ｂ】[00182]肺癌患者からの細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｌ４０３３）。対照として、ＩＬ－２で培養した肺腫瘍断片からのＴ細胞。
【図１４】[00183]肺癌患者（Ｌ４０３３）の細針吸引から拡大培養したＴＩＬを、急速拡大培養プロトコルを使用して更に拡大培養した。Ａ）ＩＬ－２で処理された細針吸引から得られたＴＩＬの急速拡大培養後の総細胞数。
【図１５】[00184]卵巣癌患者（ＯＶ８０１１、ＯＶ８０１２及びＯＶ８０１３）から採取した卵巣腫瘍の細針吸引からのＴＩＬ。ＩＬ－２又はＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで培養する細針吸引後の総細胞数。
【図１６Ａ】[00185]黒色腫患者の細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｍ１１０１）。ＩＬ－２で処理された細針吸引からのＴ細胞。
【図１６Ｂ】[00185]黒色腫患者の細針吸引から拡大培養されたＴＩＬのＦＡＣＳ分析（Ｍ１１０１）。対照として、ＩＬ－２で培養した肺腫瘍断片からのＴ細胞。
【図１７Ａ】[00186]コア生検によって得られた膵臓腫瘍サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。ＩＬ－２を含む培養培地又はＩＬ－２及び細胞培養添加物を含む培養培地で培養した膵臓腫瘍の結果。
【図１７Ｂ】[00186]コア生検によって得られた膵臓腫瘍サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）による刺激後の、ＣＤ４＋細胞における異なる培養培地（ＩＬ－２補充培養培地対添加剤補充培養培地）におけるＣＤ１０７ａ発現の結果。
【図１７Ｃ】[00186]コア生検によって得られた膵臓腫瘍サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）による刺激後の、ＣＤ８＋細胞における異なる培養培地（ＩＬ－２補充培養培地対添加剤補充培養培地）におけるＣＤ１０７ａ発現の結果。
【図１７Ｄ】[00186]コア生検によって得られた膵臓腫瘍サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。ホルボール１２－ミリステート１３－アセテート（ＰＭＡ）による刺激後の、ＣＤ８＋細胞における異なる培養培地（ＩＬ－２補充培養培地対添加剤補充培養培地）におけるＣＤ１０７ａ発現の結果。
【図１８Ａ】[00187]コア生検及び細針吸引の結果の概要表。膵臓癌及び肺癌のサンプルの結果。
【図１８Ｂ】[00187]コア生検及び細針吸引の結果の概要表。大腸癌、卵巣癌、子宮頸癌及び黒色腫のサンプルの結果。
【図１９Ａ】[00188]細針吸引生検によって得られた黒色腫サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。０日、１１日、１８日及び２１日後の細胞培養の総細胞数。
【図１９Ｂ】[00188]細針吸引生検によって得られた黒色腫サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。断片及び吸引液に由来する細胞の表現型分析。
【図１９Ｃ】[00188]細針吸引生検によって得られた黒色腫サンプルに由来するＴＩＬの表現型及び機能的状態。ＰＭＡによる刺激後の断片及び吸引液に由来する細胞の機能分析（ＣＤ１０７ａ発現）。
【図２０】[00189]ＴＩＬを示すデータの要約は、ＵＰＭＣ（ピッツバーグ大学医療センター）から入手した膵臓癌コア生検から拡大培養できる。
【図２１】[00190]膵臓腫瘍に由来するＴＩＬの一般的な表現型を示すデータ。
【図２２】[00191]膵臓コアのプレＲＥＰ及びＲＥＰから単離されたＴＩＬは、ＩＦＮγ及びＣＤ１０７ａによって決定されるように機能的である。
【図２３】[00192]ＣＤ３＋／ＮＫ細胞集団の増加は、低拡大培養プレＲＥＰ肺ＴＩＬで観察された。
【図２４】[00193]ＣＤ４／８比は、プレＲＥＰ肺ＴＩＬの大部分で１より大きい。
【図２５】[00194]ＲＥＰ中の同等の拡大倍数は、高収量と低収量との両方で観察された。

【図２６】[00195]肉腫に関するデータ（ＵＰＭＣ５８）。
【図２７】[00196]子宮頸癌に関するデータ（ＵＰＭＣ４５）。プレＲＥＰ　ＴＩＬは、G-REX 10の４つの断片から２１日間拡大培養された。
【図２８】[00197]ＥＳ１９００１（ＵＰＭＣ４６）に関するデータ。プレＲＥＰ　ＴＩＬは、G-REX 10の４つの断片から２１日間拡大培養された。
【図２９】[00198]硬口蓋（ＵＰＭＣ６７）及び口腔癌（ＵＰＭＣ６８）に関するデータ。プレＲＥＰ　ＴＩＬは、G-REX 10の４つの断片から２１日間拡大培養された。
【図３０】[00199]ＴＩＬは、ＵＰＭＣが提供する膵臓癌コア生検から拡大培養できることを示すデータの要約。
【図３１】[00200]膵臓コア生検：ＴＩＬは、膵臓癌のコア生検から拡大培養することができる。Ｐ７０１５実験の概要及び結果：２４ウェルプレートの１つのウェルに１つのコアを配置し、合計５つのウェルを配置した。２つのコアが２つのウェルに配置されたが、これらのウェルでは成長がほとんど又はまったくなかった。３つのウェルを１）ＩＬ－２で処理し、２つのウェルを２）ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１で処理した。
【図３２】[00201]膵臓コアから拡大培養された細胞の大部分は、ＣＤ４及びＣＤ８＋Ｔ細胞であり、ＣＤ１０７ａの発現（Ｐ７０１５）によって決定されるように機能的であったことを示すデータ。Ｐ７０１５実験結果：膵臓コア生検から拡大培養された細胞の大部分は、Ｔ細胞（およそ８０％はＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋であった）である。ＰＭＡ／Ｉによる刺激は、ＣＤ１０７ａ＋の発現によって示されるように、ＣＤ８＋が脱顆粒する能力を実証し、それにより、これらの細胞が機能的であることを示唆する。ＣＤ１０７ａ＋を発現するＣＤ８＋の割合は、ＩＬ－２単独と比較して、ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１トリプルカクテルの条件で高かった。
【図３３】[00202]膵臓コア生検：ＴＩＬは、膵臓癌のコア生検から拡大培養することができる。Ｐ７０２８及びＰ７０３１プレＲＥＰの実験の概要及び結果：１１コア生検は、トリプルカクテル（ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１）と共にG-Rex 10に配置された。Ｐ７０２８ＴＩＬは、１２日目に評価され、１９日目まで培養された。細胞数：１２日目＝１．６１ｅ６の生細胞；２１日目３．４９ｅ７の生細胞。Ｐ７０２８ＴＩＬは、１２日目に評価され、２７日目まで培養された。細胞数：１２日目＝１．５２ｅ５の生細胞；２７日目：１．１４ｅ７の生細胞。
【図３４】[00203]膵臓コア生検：ＴＩＬは、コア生検及び膵臓癌からのＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１で処理された断片から拡大培養することができ、断片に由来のＴＩＬの回収日は、１１～２１日目の範囲であった。コアに由来するＴＩＬの回収日は、２１～２８日目であった。
【図３５】[00204]コア及び腫瘍生検に由来するＴＩＬの表現型の特性評価。断片に由来するＴＩＬの回収日は、１１～２１日目であった。コアに由来するＴＩＬの回収日は、２１～２８日目であった。
【図３６】[00205]コア及び腫瘍生検に由来するＴＩＬの表現型の特性評価。
【図３７】[00206]コア生検からのＴＩＬは、断片から単離されたＴＩＬと同様に、ＣＤ１０７ａを発現し、ＩＦＮγを分泌する。
【図３８Ａ】[00207]コア生検拡大培養手順の例示的なプロセス。１～２コア生検（膵臓３つ、黒色腫４つ、乳房１つ及び卵巣１つ）は、３日目にＯＫＴ３＋フィーダーの追加を含む例示的プロセスの対象となった。膵臓のコアは、＋／－ＩＬ－１５及びＩＬ－２１で拡大培養された（ＲＥＰ１及びＲＥＰ２、即ち第１の拡大培養及び第２の拡大培養）。卵巣のコアは、＋／－ＯＸ４０（ＢＭＳ）で処理された（ｎ＝１）。全てのＴＩＬは、第２のＲＥＰ（第２の拡大培養）の対象となった。
【図３８Ｂ】[00207]コア生検拡大培養手順の例示的なプロセス。１～２コア生検は、３日目にＯＫＴ３＋フィーダーの追加を含むプロセスの対象となる。
【図３９】[00208]膵臓コア生検拡大培養手順の要約表。
【図４０】[00209]膵臓コア生検拡大培養の細胞数に関するデータ。
【図４１】[00210]黒色腫コア生検拡大培養手順の要約表。

【図４２】[00211]黒色腫コア生検拡大培養の細胞数に関するデータ。
【図４３】[00212]疲弊及び活性化マーカーの表現型の発現は、ＲＥＰ１及びＲＥＰ２間で類似している（即ち第１の拡大培養及び第２の拡大培養）。
【図４４】[00213]３日目にコアにＯＫＴ３＋フィーダーを追加しても、断片からＴＩＬを得るＧｅｎ２（即ちプロセス２Ａ）と比較して、ＴＩＬの表現型は顕著に変化しない。
【図４５】[00214]乳房及び卵巣コア生検拡大培養手順の要約表。
【図４６】[00215]乳房（左）及び卵巣（右パネル）のコア生検拡大培養の細胞数に関するデータ。
【図４７】[00216]ＴＩＬが膵臓癌のコア生検から拡大培養できることを示す実験。Ｐ７０２８及びＰ７０３１プレＲＥＰの実験の概要及び結果。コア生検はトリプルカクテル（ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１）と共にG-Rex 10に配置された。Ｐ７０２８ＴＩＬは、１２日目に評価され、１９日目まで培養された。細胞数：１２日目＝１．６１×10^6個の生細胞；２１日目：３．４９×10^7生細胞。Ｐ７０３０ＴＩＬは、１２日目に評価され、２７日目まで培養された。細胞数：１２日目＝１．５２×10^5個の生細胞；２７日目：１．１４×10^7個の生細胞。
【図４８】[00217]ＴＩＬは、コア生検及び膵臓癌からＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１で処理された断片から拡大培養することができる。断片及びコアについて細胞拡大培養数を示すグラフ。断片に由来するＴＩＬの回収日は、１１～２１日目であった。コアに由来するＴＩＬの回収日は、２１～２８日目であった。
【図４９】[00218]コア及び断片に由来するＴＩＬは、表現型が類似している。断片に由来するＴＩＬの回収日は、１１～２１日目であった。コアに由来するＴＩＬの回収日は、２１～２８日目であった。
【図５０】[00219]コア及び断片のＴＩＬを比較すると、「疲弊マーカー」は、異なって表現される。
【図５１】[00220]コア生検からのＴＩＬは、断片から単離されたＴＩＬと同様に、ＣＤ１０７ａを発現し、ＩＦＮγを分泌する。
【図５２】[00221]ＴＣ（トリプルカクテル；ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１）は、初期培養条件（ＲＥＰ１；第１の拡大培養）に関係なく、ＲＥＰ２（第２の拡大培養）の膵臓コアの総細胞数を顕著に変更しない。
【図５３】[00222]ＴＣ（トリプルカクテル；ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１）は、ＣＤ４／ＣＤ８比又は膵臓コアのＲＥＰ２（第２の拡大培養）のメモリサブセットを顕著に変更しない。
【図５４】[00223]ＣＤ１０７ａは、膵臓コアの全ての処理条件において、ＲＥＰ２（第２の拡大培養）のＣＤ４及びＣＤ８集団で類似している。
【図５５】[00224]ＩＦＮγ分泌は、膵臓コアにおけるＲＥＰ２（第２の拡大培養）処理条件に関係なく類似している。
【図５６】[00225]３日目（ＲＥＰ１；第１の拡大培養）でのＯＫＴ３及びフィーダーの追加は、膵臓コアのプレＲＥＰの状態と比較して、表現型の発現を顕著に変更しない。
【図５７】[00226]３日目（ＲＥＰ１、第１の拡大培養）でのＯＫＴ３及びフィーダーの追加は、膵臓コアの「疲弊マーカー」の表現型の発現を顕著に変更しない。
【図５８】[00227]３日目（ＲＥＰ１；第１の拡大培養）でのＯＫＴ３及びフィーダーの追加は、膵臓コアの活性化マーカーの表現型の発現を顕著に変更しない。
【図５９】[00228]ＣＤ１０７ａは、膵臓コアのプレＲＥＰ、ＲＥＰ（第１の拡大培養）及びＲＥＰ２（第２の拡大培養）において、ＣＤ４及びＣＤ８集団で類似している。
【図６０】[00229]ＩＦＮγ分泌は、膵臓のコアのＲＥＰ１（第１の拡大培養）と比較して、ＲＥＰ２（第２の拡大培養）で減少する。
【図６１】[00230]ＴＣＭ（セントラルメモリーＴ細胞）集団は、増加し、ＴＥＭ（エフェクターメモリーＴ細胞）は、ＲＥＰ２（第２の拡大培養）で減少したが、黒色腫では、ＣＤ２７及びＣＤ２８は、変化していない。ＴＥＭＲＡ：ＣＤ４５ＲＡを再発現する最終分化エフェクターメモリー細胞。ＴＳＣＭ：ステムメモリーＴ細胞。

【図６２】[00231]ＩＦＮγ及びＣＤ１０７ａは、黒色腫コアＲＥＰ１（第１の拡大培養）及びＲＥＰ２（第２の拡大培養）で類似している。
【図６３】[00232]黒色腫断片対黒色腫コアのＣＤ４及びＣＤ８表現型マーカーを示すデータ。
【図６４】[00233]黒色腫断片対黒色腫コアのＣＤ４及びＣＤ８表現型マーカーを示すデータ。
【図６５】[00234]黒色腫断片対黒色腫コアのＣＤ４及びＣＤ８のＣＤ１０７ａレベルを示すデータ。
【図６６】[00235]ＯＸ４０での処理は、卵巣コアのＣＤ８＋細胞のパーセンテージを増強した。
【図６７】[00236]ＯＸ４０で処理された卵巣コアにおける類似のＣＤ１０７ａの発現及びＩＦＮγ分泌。
【図６８】[00237]ＲＥＰ１（第１の拡大培養）及びＲＥＰ２（第２の拡大培養）乳房コアの疲弊及び活性化マーカーの増強されたＴＣＭ及び差次的発現。
【図６９Ａ】[00238]ＣＤ１０７ａ及びＩＦＮγは、乳房コアのＲＥＰ１（第１の拡大培養）及びＲＥＰ２（第２の拡大培養）で類似している。
【図６９Ｂ】[00238]ＣＤ１０７ａ及びＩＦＮγは、乳房コアのＲＥＰ１（第１の拡大培養）及びＲＥＰ２（第２の拡大培養）で類似している。
【図６９Ｃ】[00238]ＣＤ１０７ａ及びＩＦＮγは、乳房コアのＲＥＰ１（第１の拡大培養）及びＲＥＰ２（第２の拡大培養）で類似している。
【図７０】[00239]例示的な腫瘍コア生検ＴＩＬ拡大培養手順の概略図。
【図７１】[00240]ＯＫＴ３＋フィーダーで処理された膵臓コアに由来するＴＩＬは、再刺激によりＩＦＮγを分泌する。
【図７２】[00241]黒色腫コアに由来するＴＩＬは、ＣＤ１０７ａを発現し、再刺激時にＩＦＮγを分泌する。
【図７３Ａ】[00242]乳房及び卵巣コア生検から拡大培養するＴＩＬ。
【図７３Ｂ】[00242]乳房及び卵巣コア生検から拡大培養するＴＩＬ。
【図７４】[00243]ＲＥＰ１中にＯＫＴ３＋フィーダーで処理された乳房コアに由来するＴＩＬの最終産物表現型は、ＲＥＰ１中にＩＬ－２単独で処理されたコアと類似であった。
【図７５】[00244]ＲＥＰ１中にＯＫＴ３＋フィーダーで処理された乳房コアに由来するＴＩＬの最終産物表現型は、ＲＥＰ１中にＩＬ－２単独で処理されたコアと類似であった。
【図７６】[00245]ＲＥＰ１中にＩＬ－２単独で処理されたコアと比較して、ＲＥＰ１中にＯＫＴ３＋フィーダーで処理された乳房コアにおける増強されたＩＦＮγ分泌発現。
【図７７】[00246]ＯＸ４０による処理は、ＲＥＰ２における卵巣コアのＣＤ８＋細胞のパーセンテージを増強した。
【図７８】[00247]両方のＲＥＰ中のＯＸ４０による処理は、ＲＥＰ２におけるＰＤ－１、ＫＬＲＧ１及びＣＤ２５の発現を変化させた。
【図７９】[00248]ＯＸ４０で処理された卵巣コアのＩＦＮγ分泌は、最終産物（ＲＥＰ２）でわずかに高くなる。
【図８０】[00249]ＯＸ４０で処理された卵巣コアにおけるＣＤ１０７ａの発現。
【図８１】[00250]２つのＲＥＰを介したＯＸ４０による処理は、Ｔ細胞の「幼若性」に関連するマーカーの発現を変化させた。
【図８２】[00251]両方のＲＥＰ中のＯＸ４０による処理は、発現をわずかに変化させ、ＲＥＰ２におけるＰＤ－１、ＫＬＲＧ１及びＣＤ２５の発現を変化させた。
【図８３】[00252]ＲＥＰ１及びＲＥＰ２乳房コアにおける疲弊及び活性化マーカーの差次的発現。
【図８４】[00253]ＣＤ１０７ａ及びＩＦＮγは、乳房コアのＲＥＰ１及びＲＥＰ２で類似している。
【図８５Ａ】[00254]２Ａプロセス（約２２日のプロセス）及びＴＩＬ製造のための小生検Ｇｅｎ３プロセスの実施形態（約１７日～２４日プロセス）の比較を示す。

【図８５Ｂ】[00254]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（約１７日～２４日のプロセス）。
【図８５Ｃ】[00254]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（約１７日～２４日のプロセス）。
【図８６】[00255]ＧＥＮ２（プロセス２Ａ）対ＧＥＮ３を比較するための実験的なフローチャートを提供する。
【図８７】[00256]Ｌ４０５４－Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスにおけるＴＩＬ製品の表現型の特性評価。
【図８８】[00257]Ｌ４０５４－Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスからのＴＩＬ製品のメモリーマーカー分析。
【図８９】[00258]Ｌ４０５４活性化及び疲弊マーカー、ＣＤ４＋でゲーティング。
【図９０】[00259]Ｌ４０５５活性化及び疲弊マーカー、ＣＤ４＋でゲーティング。
【図９１】[00260]ＩＦＮγ産生（ｐｇ／ｍＬ）：Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのためのＬ４０５４：ここで表される各バーは、刺激、無刺激及び培地対照のＩＦＮγレベルの平均＋ＳＥＭである。４５０ｎｍで測定された光学密度。
【図９２】[00261]細胞培養上清中のＩＬ－２濃度のＥＬＩＳＡ分析：Ｌ４０５４。ここで表される各バーは、使用済み培地のＩＬ－２レベルの平均値＋ＳＥＭである。４５０ｎｍで測定された光学密度。
【図９３】[00262]使用済み培地中のグルコース及び乳酸（ｇ／Ｌ）の定量：グルコース：２つの腫瘍系統及び両方のプロセスでＲＥＰ拡大培養全体を通じてグルコースの減少が観察された。逆に、予想通り、乳酸の増加が観察された。グルコースの減少及び乳酸の増加の両方がＧｅｎ２及びＧｅｎ３プロセス間で同等であった。
【図９４Ａ】[00263]Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地中のＬ－グルタミンの定量。
【図９４Ｂ】[00263]Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地におけるGlutaMAXの定量。
【図９４Ｃ】[00263]Ｌ４０５４及びＬ４０５５について使用済み培地中のアンモニアの定量。
【図９５】[00264]テロメア長分析：相対テロメア長（ＲＴＬ）値は、DAKOキットを使用した対照細胞株（１３０１白血病細胞株）の１染色体／ゲノムあたりのテロメア蛍光のＧｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスにおける１染色体／ゲノムあたりの平均テロメア蛍光を示唆する。
【図９６】[00265]Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３におけるＬ４０５４及びＬ４０５５のＴＩＬ最終産物のユニークＣＤＲ３配列分析。Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）及びＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目）の回収日に収集された1×10^{6}個の細胞から識別されたユニークＴＣＲＢクローン型の数を列に示す。Ｇｅｎ３は、サンプル内のユニークペプチドＣＤＲの数に基づき、Ｇｅｎ２と比較して高いクローン多様性を示している。
【図９７】[00266]Ｌ４０５４　ＩＬで回収された最終細胞産物（Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）及びＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目））のユニークＣＤＲ３配列の頻度。
【図９８】[00267]Ｌ４０５５　ＴＩＬで回収された最終細胞産物（Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）及びＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目））のユニークＣＤＲ３配列の頻度。
【図９９】[00268]Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３におけるＬ４０５４及びＬ４０５５のＴＩＬ最終産物の多様性指数。シャノンエントロピー多様性インデックスは、比較についてより信頼性が高く、一般的な指標である。Ｇｅｎ３Ｌ４０５４及びＬ４０５５は、Ｇｅｎ２よりわずかに高い多様性を示した。
【図１００】[00269]表３７に示されている７日目－Ｇｅｎ３ＲＥＰ開始の細胞数の生データ（下記の実施例１４を参照されたい）。
【図１０１】[00270]表３７に示されている１１日目－Ｇｅｎ２ＲＥＰ開始及びＧｅｎ３

スケールアップの細胞数の生データ（下記の実施例１４を参照されたい）。
【図１０２】[00271]表３８に示されている１６日目－Ｇｅｎ２スケールアップ及びＧｅｎ３回収（例えば、１６日目）の細胞数の生データ（下記の実施例１４を参照されたい）。
【図１０３】[00272]表３８に示されている２２日目－Ｇｅｎ２回収（例えば、２２日目）の細胞数の生データ（下記の実施例１４を参照されたい）。Ｌ４０５４　Ｇｅｎ２の場合、研究の合計数であったため、LOVO後の数は、４つのフラスコに外挿された。１つのフラスコは、汚染されており、合計＝６．６７×10^{10}で推定された。
【図１０４】[00273]図８７Ａ、８７Ａ及び８７Ｂに示されたフローサイトメトリーの結果の生データ。
【図１０５】[00274]図８７Ｃ及び８７Ｃに示されたフローサイトメトリーの結果の生データ。
【図１０６】[00275]図８９及び９０に示されたフローサイトメトリーの結果の生データ。
【図１０７】[00276]図９１に示されたＬ４０５４サンプルのＩＦＮγ生成アッセイ結果の生データ。
【図１０８】[00277]図９１に示されたＬ４０５５サンプルのＩＦＮγ生成アッセイ結果の生データ。
【図１０９】[00278]図９１に示されたＭ１０８５ＴサンプルのＩＦＮγ生成アッセイ結果の生データ。
【図１１０】[00279]図９２に示されたＩＬ－２ＥＬＩＳＡアッセイ結果の生データ。
【図１１１】[00280]図９３及び図９４に示された代謝基質及び代謝分析の結果の生データ。
【図１１２】[00281]図９５に示された相対テロメア長分析結果の生データ。
【図１１３】[00282]図９６及び図９９に示されたユニークＣＤ３配列及びクローン多様性分析の結果の生データ。
【図１１４】[00283]さまざまなＧｅｎ２（２Ａプロセス）及びＧｅｎ３．１プロセスの実施形態の比較を示す。
【図１１５】[00284]Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態のさまざまな特徴を説明する表。
【図１１６】[00285]Ｇｅｎ３．１と称される、Ｇｅｎ３プロセスの実施形態の培地条件の概要。
【図１１７】[00286]Ｇｅｎ２、Ｇｅｎ２．１及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態のさまざまな特徴を説明する表。
【図１１８】[00287]Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３．０プロセスの実施形態のさまざまな特徴を比較する表。
【図１１９】[00288]説明された拡大培養プロセスのさまざまな実施形態における培地の用途を提供する表。
【図１２０】[00289]表現型の比較：プロセスのＧｅｎ３．０及びＧｅｎ３．１の実施形態は、同等のＣＤ２８、ＣＤ２７及びＣＤ５７発現を示した。
【図１２１】[00290]Ｇｅｎ３の最終産物でのＩＦＮγのより高い生産量。両方のプロセスを比較するために、ＩＦＮγ分析（ＥＬＩＳＡによる）を凍結培養上清で評価した。各Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）及びＧｅｎ３プロセス（例えば、１６日目）で新鮮なＴＩＬ産物を使用し、各腫瘍について、コーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩刺激である。ここで表される各バーは、刺激、無刺激及び培地対照のＩＦＮγレベルである。
【図１２２】[00291]上段：ＴＩＬ最終産物のユニークＣＤＲ３配列分析：Ｇｅｎ２（例えば、２２日目）及びＧｅｎ３プロセス（例えば、１４～１６日目）で収集された１×10^{6}個の細胞から識別されたユニークＴＣＲ　Ｂクローン型の数を列に示す。Ｇｅｎ３は、サンプル内のユニークペプチドＣＤＲの数に基づき、Ｇｅｎ２と比較して高いクローン多様性を示している。下段：ＴＩＬ最終産物の多様性指数：シャノンエントロピー多様性指数は、比較についてより信頼性の高い一般的な指標である。Ｇｅｎ３は、Ｇｅｎ２より

わずかに高い多様性を示した。
【図１２３】[00292]１９９配列は、Ｇｅｎ３及びＧｅｎ２の最終産物間で共有され、Ｇｅｎ３の最終産物と共有されるＧｅｎ２からのユニークＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に対応する。
【図１２４】[00293]１８３３配列は、Ｇｅｎ３及びＧｅｎ２の最終産物で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２からのユニークＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に対応する。
【図１２５】[00294]Ｇｅｎ３プロセス（１６日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。
【図１２６】[00295]Ｇｅｎ３拡大培養プラットフォームを使用して、造血器腫瘍からＴＩＬを拡大培養する方法の例示的な実施形態の概略図。
【図１２７】[00296]３日目にコアにＯＫＴ３＋フィーダーを追加しても、Ｇｅｎ２と比較して、ＴＩＬの表現型に顕著な変化はないことを示すデータを提供し、ＴＩＬが正常なＴＩＬであることを示唆する。
【図１２８】[00297]黒色腫コア由来ＴＩＬによる疲弊及び活性化マーカーの発現は、膵臓コア由来ＴＩＬによるそれと類似の傾向を示すデータを提供する。ＲＥＰ１及びＲＥＰ２では、ＩＬ－２及びトリプルカクテル間の表現型の発現に違いは観察されなかった。
【図１２９】[00298]肺コア生検からの拡大培養するＴＩＬに関するデータを提供する。
【図１３０】[00299]類似の表現型プロファイルは、０日目対３日目（ＯＫＴ３＋フィーダー）で処理された肺のコアで観察されることを示すデータを提供する。
【図１３１】[00300]３日目にＯＫＴ３及びフィーダーで処理されたコアの活性化及び常在性Ｔ細胞マーカーの表現型の発現が増強されたことを示すデータを提供する。
【図１３２】[00301]肺コアからのＴＩＬは、非特異的刺激に反応して、ＩＦＮγ分泌及びＣＤ１０７動員により決定されるように機能的である。
【図１３３】[00302]３日目の処理された肺コアからのＣＤ８＋ＴＩＬは、０日目の処理されたＴＩＬと比較してオリゴクローナルである。
【発明を実施するための形態】
【０１７１】
配列表の簡単な説明
[00303] 配列番号１は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。
[00304] 配列番号２は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。
[00305] 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。
[00306] 配列番号４は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。
[00307] 配列番号５は、組換えヒトＩＬ－４タンパク質のアミノ酸配列である。
[00308] 配列番号６は、組換えヒトＩＬ－７タンパク質のアミノ酸配列である。
[00309] 配列番号７は、組換えヒトＩＬ－１５タンパク質のアミノ酸配列である。
[00310] 配列番号８は、組換えヒトＩＬ－２１タンパク質のアミノ酸配列である。
[00311] 配列番号９は、ヒト４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
[00312] 配列番号１０は、マウス４－１ＢＢのアミノ酸配列である。
[00313] 配列番号１１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。
[00314] 配列番号１２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。
[00315] 配列番号１３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（ＶＨ）である。
[00316] 配列番号１４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（ＶＬ）である。
[00317] 配列番号１５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。
[00318] 配列番号１６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。
［００３１９］配列番号１７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。
［００３２０］配列番号１８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。
［００３２１］配列番号１９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。
［００３２２］配列番号２０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。
［００３２３］配列番号２１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。
［００３２４］配列番号２２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。
［００３２５］配列番号２３は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００３２６］配列番号２４は、４－１ＢＢアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００３２７］配列番号２５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。
［００３２８］配列番号２６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。
［００３２９］配列番号２７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。
［００３３０］配列番号２８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。
［００３３１］配列番号２９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。
［００３３２］配列番号３０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。
［００３３３］配列番号３１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
［００３３４］配列番号３２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３３５］配列番号３３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３３６］配列番号３４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３３７］配列番号３５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３３８］配列番号３６は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３３９］配列番号３７は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４０］配列番号３８は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４１］配列番号３９は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４２］配列番号４０は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４３］配列番号４１は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４４］配列番号４２は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のＦｃドメインである。
［００３４５］配列番号４３は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４６］配列番号４４は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４７］配列番号４５は、ＴＮＦＲＳＦアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
［００３４８］配列番号４６は、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）アミノ酸配列である。
［００３４９］配列番号４７は、４－１ＢＢＬポリペプチドの可溶性部分である。
［００３５０］配列番号４８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（ＶＨ）である。

［00351］配列番号４９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（ＶＬ）である。
［00352］配列番号５０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（ＶＨ）である。
［00353］配列番号５１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（ＶＬ）である。
［00354］配列番号５２は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［00355］配列番号５３は、４－１ＢＢアゴニスト抗体Ｈ３９Ｅ３－２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［00356］配列番号５４は、ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列である。
［00357］配列番号５５は、マウスＯＸ４０のアミノ酸配列である。
［00358］配列番号５６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。
［00359］配列番号５７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。
［00360］配列番号５８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（ＶＨ）である。
［00361］配列番号５９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（ＶＬ）である。
［00362］配列番号６０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。
［00363］配列番号６１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。
［00364］配列番号６２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。
［00365］配列番号６３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。
［00366］配列番号６４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。
［00367］配列番号６５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。
［00368］配列番号６６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖である。
［00369］配列番号６７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖である。
［00370］配列番号６８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［00371］配列番号６９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［00372］配列番号７０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ１である。
［00373］配列番号７１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ２である。
［00374］配列番号７２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の重鎖ＣＤＲ３である。
［00375］配列番号７３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ１である。
［00376］配列番号７４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ２である。

［００３７７］配列番号７５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１１Ｄ４の軽鎖ＣＤＲ３である。
［００３７８］配列番号７６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖である。
［００３７９］配列番号７７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖である。
［００３８０］配列番号７８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００３８１］配列番号７９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００３８２］配列番号８０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ１である。
［００３８３］配列番号８１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ２である。
［００３８４］配列番号８２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の重鎖ＣＤＲ３である。
［００３８５］配列番号８３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ１である。
［００３８６］配列番号８４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ２である。
［００３８７］配列番号８５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体１８Ｄ８の軽鎖ＣＤＲ３である。
［００３８８］配列番号８６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００３８９］配列番号８７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００３９０］配列番号８８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ１である。
［００３９１］配列番号８９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ２である。
［００３９２］配列番号９０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の重鎖ＣＤＲ３である。
［００３９３］配列番号９１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ１である。
［００３９４］配列番号９２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
［００３９５］配列番号９３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１１９－１２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
［００３９６］配列番号９４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００３９７］配列番号９５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００３９８］配列番号９６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ１である。
［００３９９］配列番号９７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ２である。
［００４００］配列番号９８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の重鎖ＣＤＲ３である。
［００４０１］配列番号９９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ１である。

［００４０２］配列番号１００は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ２である。
［００４０３］配列番号１０１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体Ｈｕ１０６－２２２の軽鎖ＣＤＲ３である。
［００４０４］配列番号１０２は、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）アミノ酸配列である。
［００４０５］配列番号１０３は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの可溶性部分である。
［００４０６］配列番号１０４は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの代替的可溶性部分である。
［００４０７］配列番号１０５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４０８］配列番号１０６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体００８の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００４０９］配列番号１０７は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４１０］配列番号１０８は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０１１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００４１１］配列番号１０９は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４１２］配列番号１１０は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２１の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００４１３］配列番号１１１は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４１４］配列番号１１２は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体０２３の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００４１５］配列番号１１３は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４１６］配列番号１１４は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００４１７］配列番号１１５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４１８］配列番号１１６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（ＶＬ）である。
［００４１９］配列番号１１７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（ＶＨ）である。
［００４２０］配列番号１１８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（ＶＨ）である。
［００４２１］配列番号１１９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（ＶＬ）である。
［００４２２］配列番号１２０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（ＶＬ）である。
［００４２３］配列番号１２１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（ＶＨ）である。
［００４２４］配列番号１２２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（ＶＨ）である。
［００４２５］配列番号１２３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（ＶＬ）である。
［００４２６］配列番号１２４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（ＶＬ）である。
［００４２７］配列番号１２５は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）である。
［００４２８］配列番号１２６は、ＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域

（ＶＬ）である。
【０１７２】
発明の詳細な説明
Ｉ．序論
［00429］急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）によってエキソビボで培養したＴＩＬを利用する養子細胞療法は、黒色腫患者において宿主免疫抑制後に養子細胞療法の成功をもたらしている。現行の注入適合パラメータは、ＴＩＬの組成（例えば、ＣＤ２８、ＣＤ８又はＣＤ４陽性）の読み取り並びにＲＥＰ産物の拡大倍数及び生存率の数値に依存している。
【０１７３】
［00430］現行のＲＥＰプロトコルは、患者に注入されることになるＴＩＬの健康に関して見識をほとんど与えない。Ｔ細胞は、ナイーブＴ細胞からエフェクターＴ細胞へのその成熟の過程で顕著な代謝シフトを起こす（Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17, 364（本明細書によって全体として明示的に組み込まれる）及び特に嫌気的及び好気的代謝の考察及びマーカーについて参照されたい）。例えば、ナイーブＴ細胞はＡＴＰの産生をミトコンドリア呼吸に依存する一方、ＴＩＬなどの成熟した健康なエフェクターＴ細胞は、高度に解糖性であり、それは、増殖、遊走、活性化及び抗腫瘍有効性に必要とするバイオエナジェティクス基質の供給を好気的解糖に依存する。
【０１７４】
［00431］先行論文の報告によれば、重度に解糖に依存する細胞は、養子移入時に栄養枯渇を被り、その結果、移入細胞の大部分が死滅することになるため、移入前にＴＩＬの解糖を制限し、ミトコンドリア代謝を促進することが望ましい。従って、当該技術分野では、ミトコンドリア代謝を促進すればインビボ寿命が促進される可能性があると教示され、実際、免疫応答の誘導前に解糖の阻害薬を使用することが提案されている。Chang et al.（Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17(364)を参照されたい。
【０１７５】
［00432］本発明は、一部の実施形態において、この代謝的健康の増加を判定及び定量化する方法に更に関する。従って、本発明は、限定はされないが、解糖の速度及び量、酸化的リン酸化、予備呼吸能（ＳＲＣ）及び解糖予備能を含めた１つ以上の一般的な代謝判定を用いてＴＩＬ集団の相対的健康をアッセイする方法を提供する。
【０１７６】
［00433］その上、本発明は、一部の実施形態において、この代謝的健康の増加を判定及び定量化する方法に更に関する。従って、本発明は、限定はされないが、解糖の速度及び量、酸化的リン酸化、予備呼吸能（ＳＲＣ）及び解糖予備能を含めた１つ以上の一般的な代謝判定を用いてＴＩＬ集団の相対的健康をアッセイする方法を提供する。
【０１７７】
［00434］加えて、任意選択の追加の判定としては、限定はされないが、ＡＴＰ産生、ミトコンドリア質量及びグルコース取込みが挙げられる。
【０１７８】
ＩＩ．定義
［00435］用語「インビボ」は、対象の体内で起こる事象を指す。
【０１７９】
［00436］用語「インビトロ」は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイは、生細胞又は死細胞を利用した細胞ベースのアッセイを包含し、また、インタクトな細胞を利用しない無細胞アッセイも包含し得る。
【０１８０】
［00437］用語「急速拡大培養」は、１週間の期間にわたって少なくとも約３倍（又は４倍、５倍、６倍、７倍、８倍又は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（又は２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍又は９０倍）又は最も好ましくは、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。複数の急速拡大培養プロトコルを以下に概説する。

【０１８１】

［00438］本明細書において「腫瘍浸潤リンパ球」又は「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍中に遊走した、当初白血球細胞として得られた細胞の集団を意味する。ＴＩＬとしては、限定はされないが、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、樹状細胞及びＭ１マクロファージが挙げられる。ＴＩＬは、初代及び二次ＴＩＬの両方を含む。「初代ＴＩＬ」は、本明細書に概説される通り患者組織サンプルから得られるものであり（「新鮮に回収された」と称されることもある）、及び「二次ＴＩＬ」は、限定はされないが、バルクＴＩＬ及び拡大培養ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」又は「ポストＲＥＰ　ＴＩＬ」）を含め、本明細書で考察する通り拡大培養された又は成長した任意のＴＩＬ細胞集団である。

【０１８２】

［00439］本明細書において「細胞集団」（ＴＩＬを含む）は、共通の形質を共有する多数の細胞を意味する。一般に、集団は、概して数が1×10^{6}～1×10^{10}個の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での初代ＴＩＬの初期成長は、およそ1×10^{8}個の細胞のバルクＴＩＬ集団をもたらす。ＲＥＰ拡大培養は、概して1.5×10^{9}～1.5×10^{10}個の注入のための細胞集団が提供されるように行われる。

【０１８３】

［00440］本明細書における「小生検」とは、腫瘍の体積よりも典型的に少ない、一部の実施形態では実質的に少ない、腫瘍からの組織の体積の除去をもたらす生検を意味する。小生検には、コア生検、パンチ生検などが含まれる。任意の小生検は、例えば、約１mm^3、２mm^3、約５mm^3、約１０mm^3、約２５mm^3、約５０mm^3若しくは約１００mm^3未満の体積を有するか、又は約１mm^2、２mm^2、約５mm^2、約１０mm^2、約２５mm^2、約５０mm^2若しくは約１００mm^2未満の断面積を有する任意の生検を含む。小生検には、転移性疾患の異なる癌性病変からなど、体内の同じ場所又は複数の場所から採取された複数の生検も含まれる。

【０１８４】

［00441］本明細書において「凍結保存ＴＩＬ」とは、初代、バルク又は拡大培養（ＲＥＰ　ＴＩＬ）のいずれかのＴＩＬが約－１５０℃～－６０℃の範囲で処理及び保存されることを意味する。一般的な凍結保存方法は、実施例を含め、本明細書の他の部分にも記載される。明確にするために言えば、「凍結保存ＴＩＬ」は、初代ＴＩＬの供給源として用いられ得る凍結組織サンプルと区別可能なものである。

【０１８５】

［00442］本明細書において「解凍した凍結保存ＴＩＬ」とは、かつて凍結保存されていたが、次に処理により、限定はされないが細胞培養温度又はＴＩＬを患者に投与し得る温度を含め、室温以上に戻されたＴＩＬ集団を意味する。

【０１８６】

［00443］ＴＩＬは、一般的に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に、又は腫瘍に浸潤し処置に影響を及ぼすそれらの能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、一般に、以下のバイオマーカーの１つ以上を発現することによって分類することができる：ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲ　αβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１及びＣＤ２５。加えて及び代わりに、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤するその能力によって機能的に定義することができる。

【０１８７】

［00444］用語「凍結保存培地（cryopreservation media）」又は「凍結保存培地（cryopreservation medium）」は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地には、７％～１０％のＤＭＳＯを含む培地が含まれ得る。例示的培地には、CryoStor CS10、Hyperthermasol及びそれらの組み合わせが含まれる。用語「ＣＳ１０」は、Stemcell Technologies又はBiolife Solutionsから入手した凍結保存培地を指す。Ｃ

Ｓ１０倍地は、商品名「CryoStor（登録商標）CS10」と称される場合がある。ＣＳ１０培地は、ＤＭＳＯを含む無血清、無動物成分培地である。

【０１８８】

［00445］本明細書において「細胞集団」（ＴＩＬを含む）は、共通の形質を共有する多数の細胞を意味する。一般に、集団は、概して数が1×10^{6}～1×10^{10}個の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は、異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での初代ＴＩＬの初期成長は、およそ1×10^{8}個の細胞のバルクＴＩＬ集団をもたらす。ＲＥＰ拡大培養は、概して1.5×10^{9}～1.5×10^{10}個の注入のための細胞集団が提供されるように行われる。

【０１８９】

［00446］用語「セントラルメモリーＴ細胞」は、ヒトではＣＤ４５ＲＯ＋であり、且つＣＣＲ７（ＣＣＲ７ｈｉ）及びＣＤ６２Ｌ（ＣＤ６２ｈｉ）を構成的に発現するＴ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＣＬ－６、ＢＣＬ－６Ｂ、ＭＢＤ２及びＢＭＩ１が含まれる。セントラルメモリーＴ細胞はＴＣＲ惹起後にエフェクター分子としてＩＬ－２及びＣＤ４０Ｌを主に分泌する。セントラルメモリーＴ細胞は、血中のＣＤ４区画において優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例的に濃縮されている。

【０１９０】

［00447］用語「エフェクターメモリーＴ細胞」は、セントラルメモリーＴ細胞と同様にＣＤ４５ＲＯ＋であるが、ＣＣＲ７の構成的発現が欠損しており（ＣＣＲ７ｌｏ）、且つＣＤ６２Ｌ発現が不均一であるか又は低い（ＣＤ６２Ｌｌｏ）、ヒト又は哺乳類Ｔ細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーＴ細胞の表面表現型には、ＴＣＲ、ＣＤ３、ＣＤ１２７（ＩＬ－７Ｒ）及びＩＬ－１５Ｒも含まれる。セントラルメモリーＴ細胞の転写因子には、ＢＬＩＭＰ１が含まれる。エフェクターメモリーＴ細胞は、抗原刺激後に、インターフェロン－γ、ＩＬ－４及びＩＬ－５を含む、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、血中のＣＤ８区画において優勢であり、ヒトでは肺、肝臓及び腸において比例的に濃縮されている。ＣＤ８＋エフェクターメモリーＴ細胞は多量のパーフォリンを有する。用語「閉鎖系」は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。本発明の方法では、細胞培養方法に適切な任意の閉鎖系を用いることができる。閉鎖系としては、例えば、限定はされないが、閉鎖型Ｇコンテナが挙げられる。閉鎖系に腫瘍セグメントが加えられた後は、ＴＩＬの患者への投与直前までこの系は外部環境に対して開放されない。

【０１９１】

［00448］腫瘍を破砕するプロセスを説明するために本明細書で使用される「断片化」、「断片」及び「断片化された」という用語には、腫瘍組織の破砕、スライス、分割及び細切並びに腫瘍組織の物理的構造を破砕する任意の他の方法などの機械的断片化方法が含まれる。

【０１９２】

［00449］用語「末梢血単核球」及び「ＰＢＭＣ」は、リンパ球（Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞）及び単球を含めた、円形の核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞（ＰＢＭＣは、抗原提示細胞の一種である）として使用される場合、末梢血単核球は、照射された同種異系末梢血単核球である。

【０１９３】

［00450］「末梢血リンパ球」及び「ＰＢＬ」という用語は、末梢血から拡大培養したＴ細胞を指す。一部の実施形態において、ＰＢＬは、ドナーからの全血又はアフェレーシス産物から分離される。一部の実施形態において、ＰＢＬは、ＣＤ３＋ＣＤ４５＋のＴ細胞表現型など、Ｔ細胞表現型のポジティブ選択又はネガティブ選択により、ドナーからの全血又はアフェレーシス産物から分離される。

【０１９４】

[00451] 用語「抗ＣＤ３抗体」は、抗体又はその変異体、例えばモノクローナル抗体であって、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体におけるＣＤ３受容体に対して指向されたヒト、ヒト化、キメラ又はマウス抗体を含むものを指す。抗ＣＤ３抗体には、ムロモナブとしても知られるＯＫＴ－３が含まれる。他の抗ＣＤ３抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ及びビジリズマブが含まれる。

【０１９５】

[00452] 用語「ＯＫＴ－３」（本明細書では「ＯＫＴ３」とも称される）は、成熟Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体中のＣＤ３受容体に対して指向されたヒト、ヒト化、キメラ又はマウス抗体を含む、モノクローナル抗体若しくはバイオシミラー又はその変異体を指し、ＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ、MACS GMP CD3 pure、Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA）及びムロモナブ又はそれらの変異体、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム若しくはバイオシミラーなどの市販の形態を含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表１に示す（配列番号１及び配列番号２）。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマは、American Type Culture Collectionに寄託されており、ＡＴＣＣ受託番号ＣＲＬ　８００１が割り当てられている。ＯＫＴ－３を産生することができるハイブリドーマもEuropean Collection of Authenticated Cell Cultures（ＥＣＡＣＣ）に寄託されており、カタログ番号８６０２２７０６が割り当てられている。

【０１９６】

【表１】

表1. ムロモナブのアミノ酸配列。

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

【０１９７】

[00453] 用語「ＩＬ－２」（本明細書では「ＩＬ２」とも称される）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、ヒト及び哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー及びそれらの変異体を含む全ての形態のＩＬ－２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、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明における使用に適した組換えヒト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、１単回使用バイアルあたり２２００万ＩＵで複数の供給元から市販されている）並びにCellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA（CELLGRO GMP）又はProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号ＣＹＴ－２０９－ｂ）から市販で供給される組換えＩＬ－２の形態及び他の販売業者からの他の市販の同等物などのＩＬ－２のヒト組換え型を包含する。アルデスロイキン（デス－アラニル－１、セリン－１２５ヒトＩＬ－２）は、分子量およそ１５ｋＤａの非グリコシル化ヒト組換え型ＩＬ－２である。本発明における使用に適した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、本明細書に記載されているように、Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USAから入手可能なペグ化ＩＬ２プロドラッグＮＫＴＲ－２１４も含む、ペグ化形態のＩＬ－２も包含する。本発明での使用に好適なＮＫ

ＴＲ－２１４及びペグ化ＩＬ－２が米国特許出願公開第２０１４／０３２８７９１　Ａ１号及び国際公開第２０１２／０６５０８６　Ａ１号（こ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。本発明での使用に適したコンジュゲート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４９０２，５０２号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明における使用に適した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。

【０１９８】

【表２】

表2. インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号3 組換えヒトIL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号5 組換えヒトIL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号6 組換えヒトIL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
配列番号7 組換えヒトIL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
配列番号8 組換えヒトIL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【０１９９】

[00454] 用語「ＩＬ－４」（本明細書では「ＩＬ４」とも称される）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細胞により、且つ好酸球、好塩基球及び肥満細胞により産生される。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細胞は続いてポジティブフィードバックループにおいて、更なるＩＬ－４を産生する。ＩＬ－４はまた、Ｂ細胞拡大培養及びクラスＩＩ　ＭＨＣ発現を刺激し、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。本発明における使用に適した組換えヒト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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－４のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号５）。

【０２００】

[00455] 用語「ＩＬ－７」（本明細書では「ＩＬ７」とも称される）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サイトカインを指し、これは間質及び上皮細胞並びに樹状細胞から入手し得る。Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。ＩＬ－７は、Ｔ細胞の発生を刺激することができる。ＩＬ－７は、胸腺内の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において、ＩＬ－７受容体アルファ及び一般的なガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるＩＬ－７受容体に結合する。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－４は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Bru

nswick, 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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－７のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号６）。

【０２０１】

[00456] 用語「ＩＬ－１５」（本明細書では「ＩＬ１５」とも称される）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、ヒト及び哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー及びそれらの変異体を含む全ての形態のＩＬ－２を含む。ＩＬ－１５は、例えば、Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32に記載され、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、分子量１２．８ｋＤａの１１４個のアミノ酸（及びＮ末端メチオニン）を含有する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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－１５のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号７）。

【０２０２】

[00457] 用語「ＩＬ－２１」（本明細書では「ＩＬ２１」とも称される）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、ヒト及び哺乳動物の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー及びそれらの変異体を含む全ての形態のＩＬ－２１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、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、分子量１５．４ｋＤａの１３２個のアミノ酸を含有する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）を含む複数の供給元から市販されている。本発明における使用に適した組換えヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列を表２に示す（配列番号８）。

【０２０３】

[00458] 「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」又は「治療量」が指示されるとき、本発明の組成物の正確な投与量は、医師が年齢、体重、腫瘍サイズ、感染又は転移の程度及び患者（対象）の状態の個体差を考慮して決定することができる。一般的に、本明細書に記載される遺伝子修飾された細胞傷害性リンパ球を含む医薬組成物は、10^4～10^{11}細胞／ｋｇ体重（例えば、10^5～10^6、10^5～10^{10}、10^5～10^{11}、10^6～10^{10}、10^6～10^{11}，10^7～10^{11}、10^7～10^{10}、10^8～10^{11}、10^8～10^{10}、10^9～10^{11}又は10^9～10^{10}細胞／ｋｇ体重）（これらの範囲内にある全ての整数値を含む）の投薬量で投与され得ると言うことができる。遺伝子修飾された細胞傷害性リンパ球組成物はまた、これらの投薬量で複数回投与され得る。遺伝子修飾された細胞傷害性リンパ球は、免疫療法で一般に公知の注入技法を用いることにより投与され得る（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照されたい）。特定の患者に対する最適な投与量及び処置レジメンは、疾患の徴候について患者をモニターし、それに応じて処置を調整することにより、医学の当業者によって容易に決定され得る。

【０２０４】

[00459] 「血液悪性腫瘍（hematological malignancy）」、「血液悪性腫瘍（hematologic malignancy）」という用語又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、哺乳動物の癌及び造血系及びリン

パ系組織の腫瘍を指す。血液悪性腫瘍は、「液性腫瘍」とも称される。血液悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性リンパ腫（ＣＬＬ）、小リンパ性リンパ腫（ＳＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、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るが、これらに限定されるものではない。「Ｂ細胞血液悪性腫瘍」という用語は、Ｂ細胞に影響を及ぼす血液悪性腫瘍を指す。

【０２０５】

［００４６０］用語「固形腫瘍」は、嚢胞又は液体領域を通常含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。用語「固形腫瘍癌」は、悪性、新生物性又は癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌としては、肺癌、乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌及び膀胱癌などの肉腫、癌腫及びリンパ腫が挙げられるが、これらに限定されるものではない。固形腫瘍の組織構造は、柔組織（癌細胞）を含む相互依存的組織コンパートメント及び癌細胞が分散し支持微小環境を提供し得る支持間質細胞を含む。

【０２０６】

［００４６１］「細針吸引」又はＦＮＡという用語は、サンプリング又は診断手順（腫瘍サンプリングを含む）に使用され得る生検手順のタイプを指し、ここで、サンプルは、採取されるが、腫瘍は、除去又は切除されない。細針吸引では、中空針、例えば２５～１８ゲージのものが腫瘍又は腫瘍を含有する領域に挿入され、本明細書に記載されるように、更なる分析又は拡大培養のために、体液及び細胞（組織を含む）が得られる。ＦＮＡでは、細胞は、組織細胞の組織学的構造を保存せずに除去される。ＦＮＡは、ＴＩＬを含み得る。一部の場合、超音波ガイド下の細針吸引生検針を使用して、細針吸引生検が実施される。ＦＮＡ針は、Becton Dickinson、Covidienなどから市販されている。

【０２０７】

［００４６２］「コア生検」又は「コア針生検」という用語は、サンプリング又は診断手順（腫瘍サンプリングを含む）に使用され得る生検手順のタイプを指し、ここで、サンプルは、採取されるが、腫瘍は、除去又は切除されない。コア生検では、中空針、例えば１６～１１ゲージのものが腫瘍又は腫瘍を含有する領域に挿入され、本明細書に記載されるように、更なる分析又は拡大培養のために、体液及び細胞（組織を含む）が得られる。コア生検では、ＦＮＡと比較して針のサイズが大きいことを考慮すると、細胞は、組織細胞の組織学的構造をある程度保存して除去され得る。コア生検針は、一般に、腫瘍の組織学的構造の少なくとも一部を保存できるゲージサイズである。コア生検は、ＴＩＬを含み得る。一部の例において、コア針生検は、Bard Medical、Becton Dickinsonなどから市販されている生検器具、真空補助コア針生検器具、定位誘導コア針生検器具、超音波誘導コア針生検器具、ＭＲＩ誘導コア針生検器具を使用して実施される。

【０２０８】

［００４６３］「液性腫瘍」という用語は、本来流動性である異常な細胞塊を指す。液性腫瘍癌としては、白血病、骨髄腫及びリンパ腫並びに他の血液悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されるものではない。液性腫瘍から得られたＴＩＬは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）とも称される。末梢血中を循環する液性腫瘍を含む液性腫瘍から得られた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、本明細書において互換的に使用され、細胞が由来する組織タイプによってのみ異なる。

【０２０９】

［００４６４］本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形若しくは血液腫瘍微小環境又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に記載されているように、「新生物性形質転換を促進し、腫瘍の成長及び浸潤をサポートし、腫瘍を宿主の免疫から保護し、治療抵抗性を培い、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」の複合的な混合物を指す。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、免疫系による

腫瘍の排除は、微小環境による免疫抑制のため、希少である。

【０２１０】

［00465］ 一実施形態において、本発明は、レムナントＴＩＬ（ｒＴＩＬ）集団で癌を治療する方法を含み、ここで、患者は、本発明に係るｒＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一部の実施形態において、ｒＴＩＬ集団は、通常の移出ＴＩＬ（ｅＴＩＬ）集団と共に提供され得、ここで、患者は、本発明に係るｒＴＩＬ及びｅＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法は、２日間（ｒＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）のシクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日及び５日間（ｒＴＩＬ注入の２７～２３日前）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日である。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法及び本発明に係るｒＴＩＬ注入（０日目）後、患者は、生理学的忍容量まで８時間毎に静脈内に７２０，０００ＩＵ／ｋｇのＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【０２１１】

［00466］ 実験的知見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性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処置効果を高めるのに重要な役割を果たすことを示す。従って、本発明の一部の実施形態は、本発明のｒＴＩＬ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」とも称される）を利用する。

【０２１２】

［00467］ 本明細書で使用される「共投与」、「共投与すること」、「～と組み合わせて投与される」、「～と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、両方の活性医薬成分及び／又はそれらの代謝産物が同時に対象内に存在するための、２つ以上の活性医薬成分（本発明の好ましい実施形態において、例えば、複数のＴＩＬと組み合わせた少なくとも１つのカリウムチャネルアゴニスト）の対象への投与を包含する。共投与には、別々の組成物中での同時投与、別々の組成物中での異なる時点における投与又は２つ以上の活性医薬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。

【０２１３】

［00468］ 用語「有効量」又は「治療有効量」は、疾患処置を含むが、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な、本明細書に記載の化合物又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（インビトロ又はインビボ）又は処置されている対象及び疾患状態（例えば、対象の体重、年齢及び性別）、疾患状態の重症度又は投与方法によって変動し得る。この用語は、標的細胞において特定の応答（例えば、血小板接着及び／又は細胞遊走の減少）を誘発する用量にも適用される。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投与レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、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システムによって変動する。

【０２１４】

［00469］ 用語「処置」、「処置している」、「処置する」などは、所望の薬理学的及び／又は生理学的効果を達成することを指す。効果は、疾患又はその症状を完全に又は部分的に防ぐという意味で予防的であり得、及び／又は疾患及び／又は疾患に起因する有害作用を部分的に又は完全に治癒するという意味で治療的であり得る。「処置」は、本明細書で使用されるとき、哺乳類、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（ａ）疾患の素因があり得るが、まだそれを有するとは診断されてない対象において疾患の発生を防ぐこと；（ｂ）疾患を阻害すること、即ちその発症又は進行を止めること；及び（ｃ）疾患を軽減すること、即ち疾患の退縮を生じさせること及び／又は１つ以上の疾患症状を軽減することが含まれる。「処置」は、疾患又は病態がない場合でも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含することも意図される。例えば、「処置」は、例えばワクチンの場合、疾患状態がない中で免疫応答を誘発し又は免疫を付与することのできる組成物

の送達を包含する。

【０２１５】

［00470］ 核酸又はタンパク質の部分に関して使用される場合の「異種」という用語は、その核酸又はタンパク質が、天然に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、新しい機能性核酸を作成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、例えば、１つの供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコーディング領域又は異なる供給源からのコーディング領域を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、天然に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）。

【０２１６】

［00471］ ２つ以上の核酸又はポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「パーセント同一性」及び「配列パーセント同一性」（又はそれらの同義語、例えば「９９％同一」）という用語は、配列同一性の一部として保存的アミノ酸置換を考慮せずに、最大限の対応について比較し、整合させた場合に（必要であればギャップを導入する）、同じであるか、同じヌクレオチド又はアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する、２つ以上の配列又は部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェア若しくはアルゴリズムを使用するか、又は目視検査によって測定することができる。アミノ酸又はヌクレオチド配列のアラインメントを入手するために使用することができ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において公知である。パーセント配列同一性を決定するための適切なプログラムには、例えば、米国政府の国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）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又はＢＬＡＳＴＰアルゴリズムのいずれかを使用して実施することができる。ＢＬＡＳＴＮは核酸配列を比較するために使用される一方、ＢＬＡＳＴＰはアミノ酸配列を比較するために使用される。ALIGN、ALIGN-2（Genentech, South San Francisco, California）又はDNASTARから入手可能なMegAlignは、配列を整合するために使用することができる、公に入手可能な更なるソフトウェアプログラムである。当業者は、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のための適切なパラメータを決定することができる。特定の実施形態において、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。

【０２１７】

［00472］ 本明細書で使用される「変異体」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内又はそれに隣接する特定の位置での１つ以上の置換、欠失及び／又は付加により、参照抗体のアミノ酸配列と異なる、アミノ酸配列を含む抗体又は融合タンパク質を包含するが、これに限定されるものではない。変異体は、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列中に１つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電又は非荷電であるアミノ酸の置換を含み得る。変異体は、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。変異体という用語は、ペグ化抗体又はタンパク質も含む。

【０２１８】

［00473］ 用語「インビボ」は、対象の体内で起こる事象を指す。

【０２１９】

［00474］ 用語「インビトロ」は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイは、生細胞又は死細胞を利用した細胞ベースのアッセイを包含し、またインタクトな細胞を利用しない無細胞アッセイも包含し得る。

【０２２０】

［00475］ 「急速拡大培養」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（又は４倍、５倍、６倍、７倍、８倍又は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（又は２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍又は９０倍）又は最も好ましくは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。複数の急速拡大培養プロトコルを以下に概説する。
【０２２１】
［00476］本明細書において「腫瘍浸潤リンパ球」又は「ＴＩＬ」とは、対象の血流を離れて腫瘍中に遊走した、当初白血球細胞として得られた細胞の集団を意味する。ＴＩＬとしては、限定はされないが、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、樹状細胞及びＭ１マクロファージが挙げられる。ＴＩＬは、初代及び二次ＴＩＬの両方を含む。「初代ＴＩＬ」は、本明細書に概説される通り患者組織サンプルから得られるものであり（「新鮮に回収された」と称されることもある）、及び「二次ＴＩＬ」は、限定はされないが、バルクＴＩＬ、拡大培養ＴＩＬ（「ＲＥＰ　ＴＩＬ」）並びに本明細書で考察する通りの「ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬ」を含め、本明細書で考察する通り拡大培養された又は成長した任意のＴＩＬ細胞集団である。ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬは、例えば、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含む、図７のステップＤに記載されたものなど）を含み得る。
【０２２２】
［00477］ＴＩＬは、一般的に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に、又は腫瘍に浸潤し処置に影響を及ぼすそれらの能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、一般的に、次のバイオマーカー：ＣＤ４、ＣＤ８、ＴＣＲ　αβ、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ５６、ＣＣＲ７、ＣＤ４５Ｒａ、ＣＤ９５、ＰＤ－１及びＣＤ２５の１つ以上を発現することによって分類することができる。加えて及び代わりに、ＴＩＬは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤するその能力によって機能的に定義することができる。ＴＩＬは、更に効力によって特徴付けられ得　－　例えば、ＴＩＬは、例えばインターフェロン（ＩＦＮ）遊離が約５０ｐｇ／ｍＬより高い、約１００ｐｇ／ｍＬより高い、約１５０ｐｇ／ｍＬより高い又は約２００ｐｇ／ｍＬより高い場合に効力があると見なすことができる。
【０２２３】
［00478］本明細書において「細胞集団」（ＴＩＬを含む）は、共通の形質を共有する多数の細胞を意味する。一般に、集団は、概して数が1×10^{6}～1×10^{10}個の範囲であり、異なるＴＩＬ集団は、異なる数を含む。例えば、ＩＬ－２の存在下での初代ＴＩＬの初期成長は、およそ1×10^{8}個の細胞のバルクＴＩＬ集団をもたらす。ＲＥＰ拡大培養は、概して1.5×10^{9}～1.5×10^{10}個の注入のための細胞集団が提供されるように行われる。
【０２２４】
［00479］「薬学的に許容される塩」という用語は、当該技術分野において公知の様々な有機及び無機対イオンから誘導される塩を指す。薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸及び有機酸を用いて形成することができる。塩を誘導することができる好ましい無機酸には、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸及びリン酸が含まれる。塩を誘導することができる好ましい有機酸には、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸及びサリチル酸が含まれる。薬学的に許容される塩基付加塩は、無機塩基及び有機塩基を用いて形成することができる。塩を誘導することができる無機塩基は、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウム、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン及びアルミニウムを含む。塩を誘導することができる有機塩基には、例えば、一級、二級及び三級アミン、天然に存在する置換アミンを含む置換アミン、環状アミン及び塩基性イオン交換樹脂が含まれる。具体例には、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミンが含まれる。一部の実施形態において、薬学的に許容される塩基付加塩は、アンモニウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩及びマグネシウム塩から選択される。「共結晶」という用語は、当該技術分野において公知のいくつかの共結晶形成剤から誘導される分子複合体を指す。塩と異なり、共結晶は、典型的には、共結晶と薬物との間の水素移動を伴わ

ず、代わりに結晶構造中の共結晶形成体と薬物との間の水素結合、芳香環スタッキング又は分散力などの分子間相互作用を伴う。

【０２２５】

［00480］ 用語「薬学的に許容される担体」又は「薬学的に許容される賦形剤」は、ありとあらゆる溶媒、分散剤、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤並びに不活性成分を含むものとする。活性医薬成分のためのかかる薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野において周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体又は薬学的に許容される賦形剤が活性医薬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活性医薬成分も記載の組成物及び方法に組み込むことができる。

【０２２６】

［00481］ 用語「約」及び「およそ」は、統計的に意味のある値の範囲内を指す。かかる範囲は、所定の値又は範囲の一桁以内、好ましくは５０％以内、より好ましくは２０％以内、更により好ましくは１０％以内、更により好ましくは５％以内であり得る。用語「約」又は「およそ」に含まれる許容変動は、研究中の特定の系に依存し、当業者に容易に理解できる。更に、本明細書で使用される場合、用語「約」及び「およそ」は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状及び他の量及び特性が正確ではなく、且つ正確である必要がないことを意味するが、近似及び／又はより大きい又はより小さい場合があり、必要に応じて、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に公知の他の因子を反映する。一般に、寸法、サイズ、製剤、パラメータ、形状又は他の量若しくは特性は、明示的にそうであると明記されているか否かにかかわらず、「約」又は「およそ」である。大きく異なるサイズ、形状及び寸法の実施形態が、記載された用語を引用する場合があることに留意されたい。

【０２２７】

［00482］ 添付の特許請求の範囲で使用される場合、「を含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という移行用語は、記載されていない追加の請求要素又はステップがある場合、それらが特許請求の範囲から除外されることに関して、元の形式及び修正された形式で、特許請求の範囲を定義する。用語「を含む」は、包括的又は無制限であることを意図しており、追加の、引用されていない要素、方法、ステップ又は材料を除外するものではない。用語「からなる」は、特許請求の範囲で指定されたもの以外の任意の要素、ステップ又は材料を除外し、後者の場合、指定された材料に関連する通常の不純物を除外する。用語「から本質的になる」は、特許請求の範囲を特定の要素、ステップ又は材料及び請求された発明の基本的及び新規の特性に実質的に影響しないものに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載の全ての組成物、方法及びキットは、代替実施形態において、「を含む」、「から本質的になる」及び「からなる」という移行用語のいずれかによってより具体的に定義され得る。

【０２２８】

ＩＩＩ．ＴＩＬ製造プロセス－プロセス２Ａ（Ｇｅｎ２プロセス）

［00483］ 一部の実施形態において、本発明は、そのような任意のＧＥＮ２プロセスの第１の拡大培養における拡大培養のためのＴ細胞の供給源として、小生検、コア生検又は細針吸引を使用するように変更された、ＧＥＮ２プロセスのいずれかの方法（例えば、プロセス２Ａプロセス）を提供し、ここで、（１）そのようなＧＥＮ２プロセスの第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の拡大培養の期間が延長されるか、又は（２）第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、そのようなＧＥＮ２プロセスの第２の拡大培養の期間が延長されるか、又は（３）第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の拡大培養の期間が延長され、且つそのようなＧＥＮ２プロセスの第２の拡大培養の期間が延長される。

【０２２９】

［00484］ 一部の実施形態において、本発明は、そのような任意のＧＥＮ２プロセスの

第１の拡大培養における拡大培養のためのＴ細胞の供給源として、小生検、コア生検又は細針吸引を使用するように変更された、ＧＥＮ２プロセスのいずれかの方法（例えば、プロセス２Ａプロセス）により作製されたＴＩＬ集団を提供し、ここで、（１）そのようなＧＥＮ２プロセスの第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の拡大培養の期間が延長されるか、又は（２）第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、そのようなＧＥＮ２プロセスの第２の拡大培養の期間が延長されるか、又は（３）第２の拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の拡大培養の期間が延長され、且つそのようなＧＥＮ２プロセスの第２の拡大培養の期間が延長される。

【０２３０】

［00485］これらの特徴のいくつかを含むプロセス２Ａ及び小生検プロセスとして知られるＴＩＬプロセスの例を図７に示し、プロセス１Ｃに対する本発明の本実施形態の利点のいくつかを図５及び６に示す。プロセス２Ａの実施形態を図１に示す。更に、例示的なコア生検に関し、概要及びプロセス２Ａとの比較が図７に提供される。プロセス２Ａ（Ｇｅｎ２）、プロセス２ＡからのＴＩＬを使用した処置方法及びプロセス２Ａによって調製されたＴＩＬの組成物は、以下の本明細書及び本出願を通して提供されるように、必要な細胞数を達成するために必要に応じて拡大培養の期間を調整して、小生検／コア生検と併せて使用され得る。

【０２３１】

［00486］本明細書において考察される通り、本発明は、患者への移植前に凍結保存ＴＩＬを再刺激することによりその代謝活性、従って相対的健康を増加させること及び前記代謝的健康の試験方法に関するステップを含み得る。一般的に本明細書に概説される通り、ＴＩＬは、一般的に、患者サンプルから採取し、操作することにより、患者への移植前にその数が拡大される。一部の実施形態において、ＴＩＬは任意選択により、以下に考察する通り、遺伝的に操作され得る。

【０２３２】

［00487］一部の実施形態において、ＴＩＬは凍結保存され得る。解凍後、ＴＩＬは、患者への注入前に、その代謝を高めるために再刺激され得る。

【０２３３】

［00488］一部の実施形態において、以下並びに実施例及び図で詳細に考察する通り、第１の拡大培養（プレＲＥＰと称されるプロセス及び図７にステップＡとして示されるプロセスを含む）は、１～１９日間であり、第２の拡大培養（ＲＥＰと称されるプロセス及び図７にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１１～１４日間に短縮される。一部の実施形態において、実施例で考察され、図４、５及び７に示す通り、第１の拡大培養（例えば、図７のステップＢとして記載される拡大培養）は、１～２日間及び３～１９日間、一部の場合には１～２日間及び３～１０日間、の２つの期間に分割され、第２の拡大培養（例えば、図７のステップＤに記載される拡大培養）は１１～１４日間である。一部の実施形態において、以下並びに実施例及び図で詳細に考察するように、第１の拡大培養及び第２の拡大培養（例えば、図７のステップＢ及びステップＤとして記載される拡大培養）の組み合わせは２２日間に短縮される。

【０２３４】

［00489］以下の「ステップ」名Ａ、Ｂ、Ｃ等は、図７を参照している。以下及び図７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又は順序並びに追加のステップ、ステップの繰り返し及び／又はステップの省略が、本願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【０２３５】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍サンプルを入手

［00490］一般に、ＴＩＬは、初めはコア生検又は類似の手順で入手された患者腫瘍サンプルから入手され（「初代ＴＩＬ」）、次に本明細書に記載される通りの更なる操作のためより大きい集団へと拡大培養され、任意選択により凍結保存され、且つ任意選択によ

り表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０２３６】

［00491］患者腫瘍サンプルは、当該技術分野において公知の方法を用いて、概して、小生検、コア生検、針生検又はその他の、腫瘍とＴＩＬ細胞との混合物を含むサンプルを入手するための手段によって入手され得る。一般に、腫瘍サンプルは、原発腫瘍、浸潤性腫瘍又は転移性腫瘍を含めた任意の固形腫瘍からのものであり得る。腫瘍サンプルは、血液悪性腫瘍から得られた腫瘍など、液性腫瘍でもあり得る。一部の実施形態において、サンプルは、複数の小さい腫瘍サンプル又は生検からのものであり得る。一部の実施形態において、サンプルは、同じ患者からの単一の腫瘍からの複数の腫瘍サンプルを含み得る。一部の実施形態において、サンプルは、同じ患者からの１つ、２つ、３つ又は４つの腫瘍からの複数の腫瘍サンプルを含み得る。一部の実施形態において、サンプルは、同じ患者からの複数の腫瘍からの複数の腫瘍サンプルを含み得る。固形腫瘍は、限定はされないが、乳癌、膵癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌及び皮膚癌（限定はされないが、扁平上皮癌、基底細胞癌及び黒色腫を含む）を含めた任意の癌型のものであり得る。一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、膠芽腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌及び非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）から選択される。一部の実施形態において、有用なＴＩＬは、特に高レベルのＴＩＬを有すると報告されていることに伴い悪性黒色腫腫瘍から得られる。

【０２３７】

［00492］一般に、腫瘍コア又は断片から得られた細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に入手した」若しくは「新鮮に分離した」細胞集団と呼ばれる。特定の実施形態において、新鮮に入手したＴＩＬの細胞集団は、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。

【０２３８】

［00493］一部の実施形態において、腫瘍が転移性であり、過去に原発病変が効率的に処置／除去されている場合、転移性病変の１つの除去が必要になり得る。一部の実施形態において、最も侵襲性の低いアプローチは、利用可能な場合、皮膚病変又は首若しくは腋窩領域のリンパ節を除去することである。一部の実施形態において、皮膚病変が除去されるか、又はその小生検が除去される。一部の実施形態において、リンパ節又はその小生検が除去される。一部の実施形態において、肺若しくは肝臓の転移性病変又は腹腔内若しくは胸部リンパ節又はその小生検を利用することができる。

【０２３９】

［00494］一部の実施形態において、腫瘍は黒色腫である。一部の実施形態において、黒色腫の小生検は、黒子又はその一部を含む。

【０２４０】

［00495］一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検である。一部の実施形態において、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得される。一部の実施形態において、パンチ生検は、疑わしい黒子の周りの皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得される。一部の実施形態において、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得され、皮膚の円形片が除去される。一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が除去される。

【０２４１】

［00496］一部の実施形態において、小生検は、切除生検である。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、黒子又は腫瘍全体が除去される。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、正常な外観を有する小さい辺縁と共に黒子又は腫瘍全体が除去される。

【０２４２】

［00497］一部の実施形態において、小生検は、切開生検である。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、黒子又は腫瘍の最も不規則な部分のみが採取される。一

部の実施形態において、小生検は切開生検であり、切開生検は、疑わしい黒子が非常に大きい場合など、他の技法を完了できない場合に使用される。

【０２４３】

［00498］一部の実施形態において、小生検は、肺生検である。一部の実施形態において、小生検は、気管支鏡により取得される。一般に、気管支鏡では、患者は麻酔下に置かれ、小さい道具が鼻又は口を通り、喉を下って気管支に進み、ここで、いくつかの組織を除去するために小さい道具が使用される。一部の実施形態において、気管支鏡を介して腫瘍又は増殖物に到達できない場合、経胸腔針生検を利用することができる。一般に、経胸腔針生検では、患者も麻酔下にあり、針を皮膚から直接疑わしい箇所に挿入して、組織の小さいサンプルを除去する。一部の実施形態において、経胸腔針生検は、介入的画像診断（例えば、針を誘導するためのＸ線又はＣＴスキャンの使用）を必要とする場合がある。一部の実施形態において、小生検は、針生検により取得される。一部の実施形態において、小生検は、超音波内視鏡（例えば、ライトを備えた内視鏡であり、口を通して食道内に配置される）で取得される。一部の実施形態において、小生検は、外科的に取得される。

【０２４４】

［00499］一部の実施形態において、小生検は、頭頸部生検である。一部の実施形態において、小生検は、切開生検である。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、組織の小片が異常に見える領域から切り取られる。一部の実施形態において、異常な領域が容易にアクセスされる場合、入院することなくサンプルが採取され得る。一部の実施形態において、腫瘍が口又は喉の内部のより深い位置にある場合、生検は、全身麻酔を伴い、手術室で行われる必要がある場合がある。一部の実施形態において、小生検は、切除生検である。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、領域全体が除去される。一部の実施形態において、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。一部の実施形態において、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、腫瘍又はしこりから細胞を抽出（吸引）するために、シリンジに取り付けられた非常に細い針が使用される。一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検である。一部の実施形態において、小生検はパンチ生検であり、疑わしい領域の一片を除去するために、パンチ鉗子が使用される。

【０２４５】

［00500］一部の実施形態において、小生検は、子宮頸部生検である。一部の実施形態において、小生検は、コルポスコピーにより取得される。一般に、コルポスコピー法では、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大鏡（コルポスコープ）の使用が採用され、子宮頸部の表面の小さい部分の生検に使用される。一部の実施形態において、小生検は、円錐切除／錐体生検である。一部の実施形態において、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除去するために外来手術が必要になる場合がある。一部の実施形態において、コーン生検は、診断の確認を助けることに加えて、コーン生検が初期処置として役立ち得る。

【０２４６】

［00501］「固形腫瘍」という用語は、嚢胞又は液体領域を通常含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。「固形腫瘍癌という用語は、悪性、新生物性又は癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌としては、限定はされないが、肺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌及び膀胱癌など、肉腫、癌腫及びリンパ腫が挙げられる。一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌、膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵癌、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。固形腫瘍の組織構造は、柔組織（癌細胞）を含む相互依存的組織コンパートメント及び癌細胞が分散し支持微小環境を提供し得る支持間質細胞を含む。

【０２４７】

［00502］一部の実施形態において、腫瘍からのサンプルは、細針吸引（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。一部の実施形態において、サンプルは最初にG-Rex 10に入れられる。一部の実施形態において、１つ又は２つのコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 10に入れら

れる。一部の実施形態において、３、４、５、６、８、９又は１０個のコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 100に入れられる。一部の実施形態において、３、４、５、６、８、９又は１０個のコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 500に入れられる。

【０２４８】

[00503] ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得ることができる。一部の実施形態において、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者からの肺腫瘍などの肺腫瘍から得られる。一部の場合、ＮＳＣＬＣを有する患者は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【０２４９】

[00504] 本明細書に記載されるＴＩＬは、ＦＮＡサンプルから得ることができる。一部の場合、ＦＮＡサンプルは、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲のハイゲージ針を使用して患者から取得又は分離される。ハイゲージ針は、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ゲージ又は２５ゲージとすることができる。一部の実施形態において、患者からのＦＮＡサンプルは、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又はそれを超える数のＴＩＬを含み得る。

【０２５０】

[00505] 一部の場合、本明細書に記載されるＴＩＬは、コア生検サンプルから得られる。一部の場合、コア生検サンプルは、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用又は医療用針を使用して患者から取得又は分離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ又は１６ゲージとすることができる。一部の実施形態において、患者からのコア生検サンプルは、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又はそれを超える数のＴＩＬを含み得る。

【０２５１】

[00506] 一般に、回収された細胞懸濁液は「初代細胞集団」又は「新鮮に回収された」細胞集団と呼ばれる。

【０２５２】

[00507] 一部の実施形態において、ＴＩＬは腫瘍消化物から入手されない。一部の実施形態において、固形腫瘍コアは断片化されていない。

【０２５３】

[00508] 一部の実施形態において、ＴＩＬは腫瘍消化物から入手される。一部の実施形態において、腫瘍消化物は、酵素培地中、例えば限定はされないが、ＲＰＭＩ１６４０、２mM GlutaMAX、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ ＤＮアーゼ及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ中におけるインキュベーションと、それに続く機械的解離（GentleMACS、Miltenyi Biotec、Auburn, CA）によって作成した。腫瘍を酵素培地に置いた後、腫瘍を約１分間機械的に分離し得る。次に溶液を５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートし、次にそれを再び約１分間機械的に破壊し得る。再び５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートした後、腫瘍を３度目に約１分間機械的に破壊し得る。一部の実施形態において、３度目の機械的破壊後に大型の組織片が存在した場合、５％CO_2下３７℃での更に３０分間のインキュベーションを伴う又は伴わない１回又は２回の更なる機械的分離をサンプルに適用した。一部の実施形態において、最終回のインキュベー

ションの終了時に細胞懸濁液が多数の赤血球又は死細胞を含有した場合、フィコールを使用した密度勾配分離を実施して、そうした細胞を除去し得る。

【０２５４】

[00509] 一部の実施形態において、第１の拡大培養ステップ前の回収された細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に回収された」細胞集団と呼ばれる。

【０２５５】

[00510] 一部の実施形態において、細胞は、以下に更に詳細に記載し、図７に例示する、ステップＢに記載の拡大培養に進む前に、任意選択でサンプル回収後に凍結され、凍結貯蔵され得る。

【０２５６】

Ｂ．ステップＢ：第１の拡大培養

[00511] 一部の実施形態において、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る幼若ＴＩＬを得ることを提供し、従って成熟ＴＩＬ（即ち被験者／患者への投与前に更に多くの回数の複製を受けたＴＩＬ）を超える追加の治療上の利点を提供し得る。幼若ＴＩＬの特徴が、文献に記載されている。例えば、Donia, et al., Scandinavian Journal of Immunology, 75:157-167 (2012)；Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010)、Huang et al., J Immunother, 28（3）:258-267 (2005)、Besser et al., Clin Cancer Res, 19（17）:OF1-OF9 (2013)、Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009)、Robbins, et al., J Immunol 2004；173:7125-7130、Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007)、Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005)及びTran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008)であり、これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【０２５７】

[00512] Ｔ及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られてい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。Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（結合）及びＣ（定数）の遺伝子セグメントは、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側での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法により得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに回収したＴＩＬ及び／又は例えば、図１に具体化された方法以外の方法を含む、本明細書で提供する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。一部の実施形態において、図３及び／又は図４に例示されているように、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに回収したＴＩＬ及び／又はプロセス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。一部の実施形態において、第１の拡大培養で得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び／又はＴ細胞受容体の多様性の増加である。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン重鎖にある。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン軽鎖にある。一部の実施形態において、多様性はＴ細胞受容体にある。一部の実施形態において、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１つにある。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／又はベータの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。一部の実施形態において、ＴＣＲａｂ（即ちＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０２５８】

[00513] 小生検、コア生検、又は細針吸引腫瘍断片、又は断片（「コア」又は「断片」と称され得る）の取得（例えば、図７のステップＡに記載されるように）後、得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有ＩＬ－２において培養される。一部の実施形態において、腫瘍消化物は、２ｍＬウェルにおいて、不活性

化ヒトＡＢ血清を６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に含む培地中でインキュベートされる。この初代細胞集団は、数日、概して３～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、７～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１４９日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、約３～１９日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×１０^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、ＩＬ－２は、第１の拡大培養の１～２日目に含まれ、ＯＫＴ３及びフィーダーは、第１の拡大培養の３日目に添加される。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１９日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１８日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１７日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１６日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１５日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１４日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１３日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１２日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１１日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～１０日目にわたって含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びフィーダーは、３～９日目にわたって含まれる。好ましい実施形態において、以下及び本明細書で説明するように、初期バルクＴＩＬ拡大培養ステップ（例えば、プレＲＥＰと称されるプロセスを含み得る図７のステップＢで説明したものなど）、その後の、以下ステップＤの下及び本明細書に記載されているように、第２の拡大培養（ステップＤ、急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、その後の、任意選択による凍結保存及びその後の第２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ＴＩＬの拡大培養を実施することができる。このプロセスによって入手したＴＩＬは、任意選択により、本明細書に記載される通り表現型特徴及び代謝パラメータが特徴付けられ得る。

【０２５９】

［00514］実施形態において、ＴＩＬ培養が２４ウェルプレートで、例えばCostar２４ウェル細胞培養クラスター、平底（Corning Incorporated、Corning, NYを使用して開始される場合、各ウェルには、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ；Chiron Corp.、Emeryville, CA）を含む２ｍＬの完全培地（ＣＭ）中、１×１０^{6}個の小生検、コア生検若しくは細針吸引腫瘍細胞又は１つの小生検、コア生検若しくは細針吸引腫瘍断片を播種することができる。

【０２６０】

［00515］一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充したGlutaMAX含有RPMI 1640からなる。培養が、４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底のガス透過性フラスコ（例えば、G-Rex10；Wilson Wolf Manufacturing、New Brighton, MN）内で開始される実施形態において（図１）、各フラスコに、１０～４０ｍＬのＩＬ－２含有ＣＭ中の１０～４０×１０^{6}個の小生検、コア生検若しくは細針吸引腫瘍生細胞又は５～３０個の小生検、コア生検若しくは細針吸引腫瘍断片を充填した。G-Rex10及び２４ウェルプレートのいずれも、加湿インキュベーターにおいて５％CO_2下３７℃でインキュベートし、培養開始から５日後に培地の半分を取り出して、新鮮なＣＭ及びＩＬ－２を補充し、５日目以降は２～３日毎に培地の半分を交換した。

【０２６１】

［００５１６］小生検、コア生検、細針吸引腫瘍断片の回収後、得られた細胞（即ち断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有ＩＬ－２において培養される。一部の実施形態において、腫瘍断片は、２ｍＬウェルにおいて、不活性化ヒトＡＢ血清を６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に含む培地中で（又はある場合には、本明細書に概説される通り、ａＡＰＣ細胞集団の存在下で）インキュベートされる。この初代細胞集団は、数日、概して１０～１４日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、第１の拡大培養中の成長培地はＩＬ－２又はその変異体を含む。一部の実施形態において、ＩＬは組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて$20\sim30\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて$20\sim30\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて25×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて30×10^{6}ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は$4\sim8\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は$5\sim7\times10^{6}$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は実施例４に記載される通り調製される。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約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又は約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０２６２】

［００５１７］一部の実施形態において、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される。例えば、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地は、ＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体、４－１ＢＢアゴニスト性抗体、ＯＫＴ－３及びＩＬ－１５の組み合わせ、ＯＫＴ－３及びＯＸ４０アゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＫＴ－３及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＩＬ－１５及びＯＸ４０アゴニスト性抗体の組み合わせ、ＩＬ－１５及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＫＴ－３、ＩＬ－１５及びＯＸ４０アゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＫＴ－３

、ＩＬ－１５及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＫＴ３、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＫＴ３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ並びにそれらの任意の組み合わせを補充される。一部の実施形態において、ＩＬ－１５は、含まれない。

【０２６３】

［00518］小生検、コア生検、細針吸引腫瘍断片の取得（例えば、図７Ａのステップに記載されるように）後、得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有ＩＬ－２において培養される。一部の実施形態において、腫瘍断片は、２ｍＬウェルにおいて、不活性化ヒトＡＢ血清を６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に含む培地中でインキュベートされる。この初代細胞集団は、一定の期間、概して１～１９日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１１日目～１９日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１８日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１８日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１７日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１７日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１６日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１６日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１５日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１５日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１４日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１４日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１３日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１３日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１２日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１２日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、この初代細胞集団は、１～１１日の期間にわたって培養され、それにより、少なくとも１１日目までに、少なくとも５×10^7個（即ち５０００万個）のバルクＴＩＬ集団が得られる。一部の実施形態において、ＴＩＬ集団は、第１の拡大培養ステップの終了までに、少なくとも約５×10^7個（即ち５０００万個）のＴＩＬ細胞である（例えば、プレＲＥＰと称されるプロセスを含み得る、図７のステップＢに記載されるものなど）。

【０２６４】

［00519］好ましい実施形態において、以下及び本明細書で説明するように、初期バルクＴＩＬ拡大培養ステップ（例えば、プレＲＥＰと称されるプロセスを含み得る図７のステップＢで説明したものなど）、その後の、以下ステップＤの下及び本明細書に記載されているように、第２の拡大培養（ステップＤ、高速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、その後の、任意選択の凍結保存及びその後の第２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ＴＩＬの拡大培養を実施することができる。このプロセスによって入手したＴＩＬは、任意選択により、本明細書に記載される通り表現型特徴及び代謝パラメータが特徴付けられ得る。

【０２６５】

［00520］一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを添加したGlutaMAX含有ＲＰＭＩ１６４０からなる。培養が、４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底のガス透過性フラスコ（例えば、G-Rex10；Wilson Wolf Manufacturing、New Brighton, M

N）内で開始される実施形態において（図１）、各フラスコに、１０～４０ｍＬのＩＬ－２含有ＣＭ中の１～２つの生検コアをロードした。G-Rex10及び２４ウェルプレートのいずれも、加湿インキュベーターにおいて５％CO_2下３７℃でインキュベートし、培養開始から５日後に培地の半分を取り出して、新鮮なＣＭ及びＩＬ－２を補充し、２日目以降は２～３日毎に培地の半分を交換した。一部の実施形態において、コア生検が卵巣腫瘍からのもの（例えば、卵巣起源）である場合、コアは、ＣＭ及びＩＬ－２中で１～２日間にわたりインキュベートされる。一部の実施形態において、コア生検が膵臓腫瘍細胞からのもの（例えば、膵臓起源）である場合、コアは、ＣＭ及びＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１中で１～２日間にわたりインキュベートされる。一部の実施形態において、３日目に、ＯＫＴ３及びフィーダー細胞がコアに添加される。一部の実施形態において、３日目に、３０ｎｇのＯＫＴ３及び１０^6個のフィーダー細胞がコアに添加される。

【０２６６】

[00521] 小生検断片又はコアは、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有ＩＬ－２において培養される。一部の実施形態において、小生検断片又はコアは、２ｍＬウェルにおいて、不活性化ヒトＡＢ血清を６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に含む培地中で（又はある場合には、本明細書に概説される通り、ａＡＰＣ細胞集団の存在下で）インキュベートされる。この初代細胞集団は、数日間、概して１～１９日間の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、少なくとも約$５×１０^7$個のバルクＴＩＬ細胞が１１日目に得られ、一部の実施形態において、$１×１０^8$個のＴＩＬが１９～２８日目に得られる。一部の実施形態において、第１の拡大培養中の成長培地はＩＬ－２又はその変異体を含む。一部の実施形態において、ＩＬは組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて２０～３０$×１０^6$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて２０$×１０^6$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて２５$×１０^6$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて３０$×１０^6$ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は４～８$×１０^6$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は５～７$×１０^6$ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は実施例Ｅに記載される通り調製される。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約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又は約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、乃至約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、乃至約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、乃至約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は、約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０２６７】

［00522］一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約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又は約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、乃至約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、乃至約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、乃至約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－１５を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、コアが膵臓腫瘍からのもの（例えば、膵臓起源）である場合、ＩＬ－１５が含まれる。

【０２６８】

［00523］一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約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又は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２１を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、コアが膵臓腫瘍からのもの（例えば、膵臓起源）である場合、ＩＬ－２１が含まれる。

【０２６９】

［00524］一実施形態において、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、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。一実施形態において、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地はＯＫＴ－３抗体を含まない。一部の実施形態において、ＯＫＴ－３抗体はムロモナブで

ある。

【０２７０】

【表３】

表3: ムロモナブのアミノ酸配列(例示的なOKT-3抗体)

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

【０２７１】

［００５２５］一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストを含む。一部の実施形態において、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、融合タンパク質並びにそれらの断片、誘導体、変異体、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。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、細胞培養培地中、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、細胞培養培地中、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０２７２】

［００５２６］一部の実施形態において、１つ以上のＴＮＦＲＳＦに加えて、細胞培養培地は、初期濃度約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び初期濃度約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を更に含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０２７３】

［００５２７］一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、これはＣＭ１（培養培地１）と称される。一部の実施形態において、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシンを添加したGlutaMAX含有ＲＰＭＩ１６４０からなる。培養が、４０ｍＬ容量及び１０ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底のガス透過性フラスコ（例えば、G-Rex10；Wilson Wolf Manufacturing、New Brighton, MN）内で開始される実施形態におけるものである。一部の実施形態において、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、例えば、実施例１を参照されたい。一部の実施形態において、第１の拡大培養は初期細胞培養培地又は第１の細胞培養培地中で行われる。一部の実施形態において、初期細胞培養培地又は第１の細胞培養培地はＩＬ－２を含む。

【０２７４】

［００５２８］一部の実施形態において、実施例及び図で考察されているように、第１の拡大培養（例えば、プレＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図７のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは、５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを得るのに十分な期間、約１～１９日間である。一部の実施形態において、実施例及び図で考察されているように、第１の拡大培養（例えば、プレＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図７のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）は、図７及び３８に提供されるように、１～２日間及び３～１９日間の２つの段階に分けられる。一部の実施形態において、ステップＢの第１の拡大培養は、図７及び３８に提供されるように、１

～２日間（ＩＬ－２又はＩＬ２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１と共に培養）及び３～１９日間（ＯＫＴ３及びフィーダーと共に培養）の２つの段階に分けられる。

【０２７５】

［00529］ 一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１４日間、１４日間、１４日間、１４日間、１４日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、２日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、３日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、６日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、７日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、８日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、９日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１０日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１１日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１２日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１３日間～１９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１６日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１８日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５×１０^{7}個（即ち５０００万個）のＴＩＬを取得するために、１９日間続行され得る。一部の実施形態において、小生検（例えば、コア生検）は、約１、２又は３日目に培養物から取り出される。一部の実施形態において、小生検（例えば、コア生検）は３日目に培養物から取り出される。

【０２７６】

［00530］ 一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１の組み合わせが、第１の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１並びにそれらの任意選択の組み合わせは、例えば、図７による並びに本明細書に記載されている通り、ステップＢプロセス中を含む、第１の拡大培養中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせが、第１の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１並びにそれらの任意選択の組み合わせは、例えば、図７による及び本明細書に記載されている通りステップＢプロセス中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１は、１日目に添加される。一部の実施形態において、コア生検が膵臓腫瘍からのもの（例えば、膵臓起源のもの）である場合、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１は、１日目に添加される。一部の実施形態において、ＩＬ－１５は含まれない。一部の実施形態

において、ＩＬ－２１は含まれない。一部の実施形態において、ＩＬ－１５もＩＬ－２１も含まれない。

【０２７７】

［00531］一部の実施形態において、第１の拡大培養、例えば、図７によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、GREX-10又はGREX-100である。一部の実施形態において、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。

【０２７８】

［00532］一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は、少なくとも５０×１０^{6}個のＴＩＬ、例えば、５０×１０^{6}個（即ち５×１０^{7}個）、５５×１０^{6}個、６０×１０^{6}個、６５×１０^{6}個、７０×１０^{6}個、７５×１０^{6}個、８０×１０^{6}個、８５×１０^{6}個、９０×１０^{6}個、９５×１０^{6}個、１００×１０^{6}個、１０５×１０^{6}個、１１０×１０^{6}個、１１５×１０^{6}個、１２０×１０^{6}個、１２５×１０^{6}個、１５０×１０^{6}個、２００×１０^{6}個、３００×１０^{6}個、４００×１０^{6}個又はそれを超える数のＴＩＬを生成する。

【０２７９】

Ｃ．ステップＣ：第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行

［00533］ある場合には、例えば、図７に示されるように、例えばステップＢから得られるＴＩＬ集団を含む、第１の拡大培養から得られるバルクＴＩＬ集団は、以下本明細書で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。代わりに、第２のＴＩＬ集団と称される第１の拡大培養から得られたＴＩＬ集団は、第２の拡大培養（ＲＥＰと呼ばれることがある拡大培養を含み得る）に供し、その後、以下で考察するように凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが治療に使用される場合、第１のＴＩＬ集団（バルクＴＩＬ集団と称されることもある）又は第２のＴＩＬ集団（一部の実施形態において、ＲＥＰ　ＴＩＬ集団と称される集団を含み得る）は、拡大培養前又は第１の拡大培養後で第２の拡大培養前に適切な処置のために遺伝子修飾に供することができる。

【０２８０】

［00534］一部の実施形態において、第１の拡大培養から（例えば、図７に示される通りのステップＢから）入手されたＴＩＬは、選択のためのフェノタイピングまで貯蔵される。一部の実施形態において、第１の拡大培養から（例えば、図７に示される通りのステップＢから）入手されたＴＩＬは、貯蔵されず第２の拡大培養に直接進む。一部の実施形態において、第１の拡大培養から入手されたＴＩＬは、第１の拡大培養後、第２の拡大培養前に凍結保存されない。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、１６日、１７日、１８日又は１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約３日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約４日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約４日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約７日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１０日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１１日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡

大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１２日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１３日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１４日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１５日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１６日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１７日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１８日～１９日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１０日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１１日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１２日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１３日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１４日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１５日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１６日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１８日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、第１の拡大培養のためにコアが培養培地に添加されたときから約１９日の時点で行われる。

【０２８１】

［００５３５］一部の実施形態において、ＴＩＬは第１の拡大培養後、第２の拡大培養前に貯蔵されず、ＴＩＬは第２の拡大培養に直接進む（例えば、一部の実施形態において、図７に示すように、ステップＢからステップＤへの移行中に貯蔵は行われない）。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、移行は閉鎖系で行われる。一部の実施形態において、第１の拡大培養からのＴＩＬは、第２のＴＩＬ集団からのＴＩＬであり、移行期間を伴わず第２の拡大培養に直接進む。

【０２８２】

［００５３６］一部の実施形態において、第１の拡大培養から第２の拡大培養への移行は、例えば、図７によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、GREX-10又はGREX-100である。一部の実施形態において、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。

【０２８３】

Ｄ．ステップＤ：第２の拡大培養

［００５３７］一部の実施形態において、ＴＩＬ細胞集団は、例えば、図７に記載の通り、ステップＡ及びステップＢ並びにステップＣと称される移行後、回収及び初期バルク処理

後、数が増加する。この更なる増加は、本明細書では第２の拡大培養と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡大培養法と称される拡大培養プロセス（ＲＥＰ並びに図７のステップＤに示されるプロセス）を含み得る。第２の拡大培養は、概して、フィーダー細胞、サイトカイン源及び抗ＣＤ３抗体を含め、幾つもの成分を含むガス透過性容器内の培養培地を使用して達成することができる。

【０２８４】

［00538］一部の実施形態において、ＴＩＬの第２の拡大培養又は第２のＴＩＬ拡大培養（これはＲＥＰと称されることもある拡大培養；並びに図７のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に公知の任意のＴＩＬフラスコ又は容器を使用して実施することができる。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は１０日、１１日、１２日、１３日又は１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は約１０日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は約１１日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は約１２日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は約１３日～約１４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は約１４日間続行し得る。

【０２８５】

［00539］一実施形態において、第２の拡大培養は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される膨張並びに図７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実施することができる。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）又はインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を用いて急速に拡大培養することができる。非特異的Ｔ細胞受容体刺激としては、例えば、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ortho-McNeil、Raritan, NJ又はMiltenyi Biotech、Auburn, CAから市販されている）を挙げることができる。ＴＩＬは、任意選択により３００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２又はＩＬ－１５など、Ｔ細胞成長因子の存在下で、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）又はｇｐｌ　００：２０９－２１７（２１０Ｍ）など、任意選択によりベクターから発現させることのできる、１つ又は複数のエピトープなど、その抗原性部分を含めた癌の１つ以上の抗原を、第２の拡大培養中に誘導することにより、インビトロでのＴＩＬの更なる刺激を誘発するように拡大培養することができる。他の好適な抗原としては、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ癌抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２及びＶＥＧＦＲ２又はその抗原性部分を挙げることができる。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２発現抗原提示細胞にパルスした癌の同じ１つ又は複数の抗原による再刺激によっても急速に拡大培養し得る。代わりに、ＴＩＬは、例えば照射自己リンパ球によるか、又は照射ＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２によって更に再刺激することができる。一部の実施形態において、再刺激は、第２の拡大培養の一部として生じる。一部の実施形態において、照射された自己リンパ球の存在下において、又は照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２と共に第２の拡大培養が発生する。一部の実施形態において、１３×１０^{6}個のフィーダー細胞が第２の拡大培養中に添加される。一部の実施形態において、１３×１０^{6}個のフィーダー細胞が第２の拡大培養の開始時に添加される。

【０２８６】

［00540］一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００

ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ又は８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０２８７】

［００５４１］一実施形態において、細胞培養培地はＯＫＴ３抗体を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体を含む。一実施形態において、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ＯＫＴ３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体を含む。

【０２８８】

［００５４２］一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１の組み合わせが、第２の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１並びにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図７による並びに本明細書に記載されている通り、ステップＤプロセス中を含む、第２の拡大培養中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせが、第２の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１並びにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図７による及び本明細書に記載されている通りステップＤプロセス中に含められ得る。

【０２８９】

［００５４３］一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞を含む補充細胞培養培地で実施され得る。一部の実施形態において、第２の拡大培養は補充細胞培養培地で行われる。一部の実施形態において、補充細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第２の細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ；本明細書では抗原提示フィーダー細胞、フィーダー細胞又はフィーダーとも称される）を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞で生じる（即ち抗原提示細胞）。

【０２９０】

［００５４４］一部の実施形態において、第２の拡大培養は、第２の拡大培養におけるＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される（第２のＴＩＬ集団と称される場合もある）。例えば、第２の拡大培養におけるＴＩＬ集団の細胞培養培地は、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体、４－１ＢＢアゴニスト性抗体、ＩＬ－１５及びＯＸ４０アゴニスト性抗体の組み合わせ、ＩＬ－１５及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び４－１ＢＢアゴニスト性抗体の組み合わせ並びにそれらの任意の組み合わせを補充される。一部の実施形態において、コアが卵巣腫瘍からのもの（例えば、卵巣起源）である場合、ＯＸ４０が含まれる。一部の実施形態において、ＯＫＴ－３は、第１及び／又は第２の拡大培養中に添加される。一部の実施形態において、ＯＫＴ－３は、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）と共に、３日目に追加される。一部の実施形態において、サンプルがＦＮＡからのものである場合、ＯＫＴ－３は、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）と共に、１日目に追加される。

【０２９１】
［00545］一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）はＰＢＭＣである。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣ及び／又は抗原提示細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣとの比は、１：５０～１：３００である。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣとの比は、１：１００～１：２００である。

【０２９２】
［00546］一実施形態において、ＲＥＰ及び／又は第２の拡大培養は、バルクＴＩＬを１５０ｍＬ培地中の１００倍又は２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２と混合してフラスコ内で実施される。細胞を別の成長チャンバに移すまで培地補充が行われる（一般的に新鮮培地による呼吸を介した３分の２の培地補充）。別の成長チャンバには、以下に更に十分に考察する通りのGREXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０２９３】
［00547］一部の実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で考察されるように、１１～１４日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は１１日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は１２日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は１３日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は１４日間である。

【０２９４】
［00548］一実施形態において、ＲＥＰ及び／又は第２の拡大培養は、前述のように（Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51；Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42）T-175フラスコ及び気体透過性バッグ又はガス透過性培養器具（G-Rexフラスコ）を使用して実施され得る。一部の実施形態において、第２の拡大培養（急速拡大培養と称される拡大培養を含む）は、T-175フラスコで実施され、１５０ｍＬの培地に懸濁した約1×10^6個のＴＩＬを各T-175フラスコに加え得る。ＴＩＬは、ＩＬ－２の１ｍＬあたり３０００ＩＵ及び抗ＣＤ３の１ｍＬあたり３０ｎｇを補充したＣＭ及びAIM-V培地の１：１の混合物で培養され得る。T-175フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートされ得る。培地の半分は、５日目に、１ｍＬあたり３０００ＩＵのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して交換され得る。一部の実施形態において、７日目に、２つのT-175フラスコからの細胞を３Ｌバッグに合わせることができ、その３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのAIM Vを加えた。毎日又は２日毎に各バッグの細胞数を計数し、新鮮培地を加えて細胞数を$0.5\sim2.0\times10^6$細胞／ｍＬに保った。

【０２９５】
［00549］一実施形態において、第２の拡大培養（これはＲＥＰと称される拡大培養；並びに図７のステップＤに参照されるものを含み得る）は、１００ｃｍガス透過性シリコン底の５００ｍＬ容量ガス透過性フラスコ（G-Rex 100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation、New Brighton, MN, USAから市販されている）において実施され得、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中で5×10^6又は10×10^6個のＴＩＬをＰＢＭＣと培養し得る。G-Rex 100フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートし得る。５日目、２５０ｍＬの上清を取り出して遠心ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心し得る。５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮培地にＴＩＬペレットを再懸濁し、元のG-Rex 100フラスコに戻し加え得る。G-Rex 100フラスコ内でＴＩＬを連続的に拡大培養するときは、７日目に各G-R

ex 100のＴＩＬを各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し得、且つ細胞懸濁液を３～１００ｍＬアリコートに分割し得、それらを３つのG-Rex 100フラスコの播種に使用し得る。次に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを各フラスコに加え得る。G-Rex 100フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートし得、４日後、各G-Rex100フラスコに３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを加え得る。細胞は培養１１日目に回収し得る。細胞は培養１２日目に回収し得る。細胞は培養１３日目に回収し得る。細胞は培養１４日目に回収し得る。一部の実施形態において、培養物は、G-Rex 500中に拡大培養される。

【０２９６】

[00550] 一実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、バルクＴＩＬを１５０ｍＬ培地中の１００倍又は２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞、３０ｍｇ／ｍＬ　ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２と混合してフラスコ内で実施される。一部の実施形態において、細胞が別の成長チャンバに移されるまで培地交換が行われる。一部の実施形態において、培地の２／３は、使用済み培地の吸引及び同等の体積の新鮮培地での置換によって置き換えられる。一部の実施形態において、別の成長チャンバには、以下に更に十分に考察する通りのGRexフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０２９７】

[00551] 一実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）が実施され、これは優れた腫瘍応答性に関してＴＩＬを選択するステップを更に含む。当該技術分野において公知の任意の選択方法を用いることができる。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号に記載されている方法は、優れた腫瘍反応性に関するＴＩＬの選択に使用され得る。

【０２９８】

[00552] 任意選択により、第２の拡大培養（ＲＥＰ拡大培養と称される拡大培養を含む）後、当該技術分野において公知の標準アッセイを用いて細胞生存率アッセイを実施することができる。例えば、バルクＴＩＬのサンプルに対してトリパンブルー色素排除アッセイを行うことができ、これは死細胞を選択的に標識して生存率の評価を可能にするものである。一部の実施形態において、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience、Lawrence, MA）を使用してＴＩＬサンプルを計数し、生存率を決定することができる。一部の実施形態において、生存率は、Cellometer K2 Image Cytometer自動セルカウンタープロトコルに従い決定される。

【０２９９】

[00553] 一部の実施形態において、ＴＩＬの第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、先述の通りT-175フラスコ及びガス透過性バッグ（Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751及びDudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342）又はガス透過性G-Rexフラスコを使用して実施することができる。一部の実施形態において、第２の拡大培養はフラスコを使用して実施される。一部の実施形態において、第２の拡大培養はガス透過性G-Rexフラスコを使用して実施される。一部の実施形態において、T-175フラスコで実施される第２の拡大培養及び約１×10^6個のＴＩＬを約１５０ｍＬの培地中に懸濁し、これを各T-175フラスコに加える。ＴＩＬは、「フィーダー」細胞としての照射（５０Ｇｙ）された同種異系ＰＢＭＣと１：１００の比で培養し、及び細胞は、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充したＣＭとAIM-V培地との１：１混合物（５０／５０培地）で培養した。T-175フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートする。一部の実施形態において、培地は、５日目に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む５０／５０培地を使用して交換される。一部の実施形態において、７日目、２つのT-175フラスコからの細胞を３Ｌバッグに合わせ、その３００ｍＬのＴＩＬ懸濁液に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む３００ｍＬのAIM-Vを加える。毎日又は２日毎に各バッグの細胞数を計数し得、新鮮培地を加えて細胞数を約０．５～約２

．０×１０^{6}細胞／ｍＬに保ち得る。一部の実施形態において、培養物は、G-Rex 500中に拡大培養される。

【０３００】

［00554］一部の実施形態において、第２の拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、１００ｃｍ^{2}ガス透過性シリコン底の５００ｍＬ容量フラスコ（G-Rex 100、Wilson Wolf）において実施され（図１）、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中で約５×１０^{6}又は１０×１０^{6}個のＴＩＬを照射同種異系ＰＢＭＣと１：１００の比で培養する。G-Rex 100フラスコは５％ＣＯ$_{2}$下３７℃でインキュベートされる。一部の実施形態において、５日目に、２５０ｍＬの上清を取り出して遠心ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心する。次に３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮５０／５０培地にＴＩＬペレットを再懸濁し、元のG-Rex100フラスコに加え戻し得る。ＴＩＬがG-Rex100フラスコ内で連続的に拡大培養される実施形態において、７日目に各G-Rex100内のＴＩＬを各フラスコ内に存在する３００ｍＬの培地に懸濁し、且つ細胞懸濁液を３つの１００ｍＬアリコートに分割しており、それらを３つのG-Rex100フラスコの播種に使用する。次に、５％ヒトＡＢ血清及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを各フラスコに加える。G-Rex 100フラスコは５％ＣＯ$_{2}$下３７℃でインキュベートされ、４日後、各G-Rex100フラスコに３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬのAIM-Vを加える。細胞は培養１４日目に回収される。一部の実施形態において、培養物は、G-Rex 500中に拡大培養される。

【０３０１】

［00555］一部の実施形態において、第２の拡大培養培地（例えば、ＣＭ２又は第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下で更に詳細に考察する通り、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３並びに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０３０２】

［00556］一部の実施形態において、第２の拡大培養、例えば、図７によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、GREX-10又はGREX-100である。一部の実施形態において、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。

【０３０３】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

［00557］一実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順（例えば、図７のステップＤに記載された拡大培養並びにＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、ＲＥＰＴＩＬ拡大培養中及び／又は第２の拡大培養中に過剰量のフィーダー細胞が必要である。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、健常供血者からの標準的な全血ユニットから入手される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて入手される。

【０３０４】

［00558］一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又は熱処理のいずれかにより不活性化され、同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する実施例、特に実施例４に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用される。

【０３０５】

［00559］一部の実施形態において、１４日目の生細胞の総数がＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目に培養（即ち第２の拡大培養の開始日）に移行した初期生細胞数より少ない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。例えば、実施例３及び／又は４を参照されたい。

【０３０６】

［00560］一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細

胞の総数が、７日目及び１４日目に、ＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に培養に移行した初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。例えば、実施例３及び／又は４を参照されたい。

【０３０７】

[00561] 一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、７日目及び１４日目に、ＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に培養に移行した初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０３０８】

[00562] 一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞はＰＢＭＣである。一部の実施形態において、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。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は１：５０～１：３００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は１：１００～１：２００である。

【０３０９】

[00563] 一実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、第２の拡大培養中に過剰量のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、健常供血者からの標準的な全血ユニットから入手される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて入手される。一実施形態において、ＰＢＭＣの代わりに人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が使用される。

【０３１０】

[00564] 一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又は熱処理のいずれかによって不活性化され、例えば図７に記載された例示的な手順を含む、本明細書に記載されたＴＩＬ拡大培養手順で使用される。

【０３１１】

[00565] 一実施形態において、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として又はそれと組み合わせて、第２の拡大培養で使用される。

【０３１２】

[00566] 本明細書に記載の拡大培養方法は、一般に、当該技術分野において公知の通り、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。

【０３１３】

[00567] 代わりに、ＴＩＬの急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養にサイトカインの組み合わせを使用することが更に可能であり、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の２つ以上の組み合わせについては、概して国際公開第２０１５／１８９３５６号及び国際公開第２０１５／１８９３５７号（参照により全体として明示的に本明細書に組み込まれる）に概説される通りである。従って、可能な組み合わせとしては、ＩＬ－２とＩＬ－１

５、ＩＬ－２とＩＬ－２１、ＩＬ－１５とＩＬ－２１とＩＬ－２、ＩＬ－１５とＩＬ－２１が挙げられ、後者には多くの実施形態において特定の使用が見出される。これらの明細書に記載される通り、サイトカインの組み合わせを使用することは、特にリンパ球、詳細にはＴ細胞の生成に有利である。

【０３１４】

Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬの回収

［00568］第２の拡大培養ステップ後、細胞は回収することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図７に提供される通り、１、２、３、４回又はそれ以上の拡大培養ステップ後に回収される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図７に提供される通り、２つの拡大培養ステップ後に回収される。

【０３１５】

［00569］ＴＩＬは、例えば遠心によることを含め、任意の適切な且つ無菌の方法で回収することができる。ＴＩＬ回収方法は、当該技術分野において周知であり、本プロセスと共に任意のかかる公知の方法を用いることができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは自動化系を使用して回収される。

【０３１６】

［00570］一部の実施形態において、回収、例えば、図７によるステップＥは、閉鎖系バイオリアクターから実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、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。

【０３１７】

Ｆ．ステップＦ：最終的な製剤化／輸注バッグへの移動

［00571］図７に例示的順序で提供される通りの、且つ上記及び本明細書に詳細に概説される通りのステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は患者への投与における使用のため容器に移される。一部の実施形態において、上記に記載される拡大培養方法を用いて治療上十分な数のＴＩＬが入手されると、ＴＩＬは患者への投与における使用のため容器に移される。

【０３１８】

［00572］一実施形態において、本開示のプロセスを使用して拡大培養したＴＩＬは、医薬組成物として患者に投与される。一実施形態において、医薬組成物は滅菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のプロセスを使用して拡大培養したＴＩＬは、当該技術分野において公知の通りの任意の好適な経路によって投与され得る。一部の実施形態において、Ｔ細胞は単回動脈内又は静脈内注入として投与され、これは好ましくは約３０～６０分間継続される。他の好適な投与経路としては、腹腔内、髄腔内及びリンパ内が挙げられる。

【０３１９】

［00573］一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、凍結保存剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、凍結保存剤及び等張剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、ジメチルスルホキシドを含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、ジメチルスルホキシド及びデキストラン４０を含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、滅菌輸注バッグで送達される組成物として投与され得、そのような組成物は、ジメチルスルホキシド及びデキストラン４０を含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム

及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む。

【０３２０】

１．医薬組成物、投薬量及び投与レジメン

［00574］一実施形態において、本開示の方法を使用して拡大培養したＴＩＬは医薬組成物として患者に投与される。一実施形態において、医薬組成物は滅菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のプロセスを使用して拡大培養したＴＩＬは、当該技術分野において公知の通りの任意の好適な経路によって投与され得る。一部の実施形態において、Ｔ細胞は単回動脈内又は静脈内注入として投与され、これは好ましくは約３０～６０分間継続される。他の適切な投与経路には、腹腔内投与、髄腔内投与及びリンパ管内投与が含まれる。

【０３２１】

［00575］任意の適切な用量のＴＩＬを投与することができる。一部の実施形態において、好適な投薬量には、治療上十分な数のＴＩＬが必要である。一部の実施形態において、特に癌が黒色腫である場合、平均が約７．８×10^{10}ＴＩＬである約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}ＴＩＬが投与される。一実施形態において、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約３×10^{10}～約１２×10^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約４×10^{10}～約１０×10^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約５×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約６×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約７×10^{10}～約８×10^{10}のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である。一部の実施形態において、特に、癌が黒色腫である場合、治療有効投与量は約７．８×10^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約１．２×10^{10}～約４．３×10^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約３×10^{10}～約１２×10^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約４×10^{10}～約１０×10^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約５×10^{10}～約８×10^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約６×10^{10}～約８×10^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約７×10^{10}～約８×10^{10}個のＴＩＬである。

【０３２２】

［00576］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの数は、約１×10^{6}、２×10^{6}、３×10^{6}、４×10^{6}、５×10^{6}、６×10^{6}、７×10^{6}、８×10^{6}、９×10^{6}、１×10^{7}、２×10^{7}、３×10^{7}、４×10^{7}、５×10^{7}、６×10^{7}、７×10^{7}、８×10^{7}、９×10^{7}、１×10^{8}、２×10^{8}、３×10^{8}、４×10^{8}、５×10^{8}、６×10^{8}、７×10^{8}、８×10^{8}、９×10^{8}、１×10^{9}、２×10^{9}、３×10^{9}、４×10^{9}、５×10^{9}、６×10^{9}、７×10^{9}、８×10^{9}、９×10^{9}、１×10^{10}、２×10^{10}、３×10^{10}、４×10^{10}、５×10^{10}、６×10^{10}、７×10^{10}、８×10^{10}、９×10^{10}、１×10^{11}、２×10^{11}、３×10^{11}、４×10^{11}、５×10^{11}、６×10^{11}、７×10^{11}、８×10^{11}、９×10^{11}、１×10^{12}、２×10^{12}、３×10^{12}、４×10^{12}、５×10^{12}、６×10^{12}、７×10^{12}、８×10^{12}、９×10^{12}、１×10^{13}、２×10^{13}、３×10^{13}、４×10^{13}、５×10^{13}、６×10^{13}、７×10^{13}、８×10^{13}及び９×10^{13}個である。一実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの数は、１×10^{6}～５×10^{6}、５×10^{6}～１×10^{7}、１×10^{7}～５×10^{7}、５×10^{7}～１×10^{8}、１×10^{8}～５×10^{8}、５×10^{8}～１×10^{9}、１×10^{9}～５×10^{9}、５×10^{9}～１×10^{10}、１×10^{10}～５×10^{10}、５×10^{10}～１×10^{11}、５×10^{11}～１×10^{12}、１×10^{12}～５×10^{12}及び５×10^{12}～１×10^{13}の範囲内である。一部の実施形態において、治療有効投与量は、約１×10^{6}、２×10^{6}、３×10^{6}、４×10^{6}、５×10^{6}、６×10^{6}、７×１

０^{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}個である。

【０３２３】

[00577] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、医薬組成物の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％又は０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖより低い。

【０３２４】

[00578] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％又は０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖより高い。

【０３２５】

[00579] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の約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

％又は約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖの範囲内である。
【０３２６】
［００５８０］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の約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又はｖ／ｖの範囲内である。
【０３２７】
［００５８１］一部の実施形態において、本発明の医薬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又は０．０００１ｇ以下である。
【０３２８】
［００５８２］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ又は１０ｇ超である。
【０３２９】
［００５８３］本発明の医薬組成物において提供される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、処置されるべき対象の性別及び年齢、処置されるべき対象の体重並びに担当医の選好及び経験に依存するであろう。臨床的に確立されたＴＩＬの投与量も適切な場合に使用され得る。ＴＩＬの投与量など、本明細書の方法を使用して投与される医薬組成物の量は、処置されるヒト又は哺乳動物、疾患又は状態の重症度、投与速度、活性医薬成分の性質及び処方医の裁量に依存するであろう。
【０３３０】
［００５８４］一部の実施形態において、ＴＩＬは単回投与で投与され得る。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。一部の実施形態において、ＴＩＬは複数回投与で投与され得る。投与は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回又は６回を超え得る。投与は、月に１回、２週間に１回、週に１回又は隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は必要な限り継続し得る。
【０３３１】
［００５８５］一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、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}個である。一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、１×１０^{6}～５×１０^{6}、５×１０^{6}～１×１０^{7}、１×１０^{7}～５×１０^{7}、５×１０^{7}～１×１０^{8}、１×１０^{8}～５×１０^{8}、５×１０^{8}～１×１０^{9}、１×１０^{9}～５×１０^{9}、５×１０^{9}～１×１０^{10}、１×１０^{10}～５×１０^{10}、５×１０^{10}～１×１０^{11}、５×１０^{11}～１×１０^{12}、１×１０^{12}～５×１０^{12}及び５×１０^{12}～１×１０^{13}の範囲内である。

【０３３２】

[00586] 一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇｍｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ又は約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【０３３３】

[00587] 一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ又は約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ又は約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【０３３４】

[00588] 有効量のＴＩＬは、鼻腔内及び経皮経路、動脈内注射によること、静脈内、腹腔内、非経口的、筋肉内、皮下、局所、移植によること又は吸入によることを含め、同様の有用性を有する薬剤について認められている任意の投与方式により、単回用量又は複数回用量のいずれでも投与され得る。

【０３３５】

ＩＶ．ＴＩＬの製造方法－Ｇｅｎ３プロセス

[00589] 一部の実施形態において、本発明は、小生検、コア生検又は細針吸引を使用

するように変更された、ＧＥＮ３プロセスのいずれかの方法によって作製されたＴＩＬ集団を提供する。一部の実施形態において、本発明は、そのような任意のＧＥＮ３プロセスの第１の初回刺激拡大培養における拡大培養のためのＴ細胞の供給源として、小生検、コア生検又は細針吸引を使用するように変更された、ＧＥＮ３プロセスのいずれかの方法を提供し、ここで、（１）そのようなＧＥＮ３プロセスの第２の急速拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の初回刺激拡大培養の期間が延長されるか、又は（２）第２の急速拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、そのようなＧＥＮ３プロセスの第２の急速拡大培養の期間が延長されるか、又は（３）第２の急速拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の初回刺激拡大培養の期間が延長され、且つそのようなＧＥＮ３プロセスの第２の急速拡大培養の期間が延長される。

【０３３６】

［００５９０］ 一部の実施形態において、本発明は、そのような任意のＧＥＮ３プロセスの第１の初回刺激拡大培養における拡大培養のためのＴ細胞の供給源として、小生検、コア生検又は細針吸引を使用するように変更された、ＧＥＮ３プロセスのいずれかの方法により作製されたＴＩＬ集団を提供し、ここで、（１）そのようなＧＥＮ３プロセスの第２の急速拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の初回刺激拡大培養の期間が延長されるか、又は（２）第２の急速拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、そのようなＧＥＮ３プロセスの第２の急速拡大培養の期間が延長されるか、又は（３）第２の急速拡大培養後に回収されたＴＩＬ集団で所望のＴＩＬ細胞数を達成するために、第１の初回刺激拡大培養の期間が延長され、且つそのようなＧＥＮ３プロセスの第２の急速拡大培養の期間が延長される。

【０３３７】

［００５９１］ いかなる特定の理論にも限定されるものではないが、ドナーから入手した腫瘍コア又は断片から得られたＴ細胞の活性化を初回刺激する第１の初回刺激拡大培養と、それに続く本発明の一部の方法に記載されているようにＴ細胞の活性化を追加刺激する第２の急速拡大培養は、「より幼若な」表現型を保持する拡大培養されたＴ細胞の調製を可能にすると考えられ、従って、本発明の拡大培養されたＴ細胞は、他の方法によって拡大培養されたＴ細胞よりも、癌細胞に対してより大きい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ように、抗ＣＤ３抗体（例えば、ＯＫＴ－３）、ＩＬ－２及び任意選択により抗原提示細胞（ＡＰＣ）への曝露により初回刺激され、次いで、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追加刺激される、Ｔ細胞の活性化は、培養中のＴ細胞の成熟を制限又は回避し、成熟度の低い表現型を有するＴ細胞集団を生成し、このＴ細胞は培養物中で拡大培養による枯渇が少なく、癌細胞に対してより高い細胞傷害性を示すと考えられる。従って、一部の実施形態において、本発明は、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養して、増殖をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を初回刺激することにより、ドナーから入手した腫瘍コア又は断片から得られた第１のＴ細胞集団の第１の初回刺激拡大培養を実施すること；（ｂ）ステップ（ａ）で初回刺激された第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第２のＴ細胞集団を得るために、第１のＴ細胞集団を培養して、増殖をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を追加刺激することにより、第１のＴ細胞集団の第２の急速拡大培養を実施すること；及び（ｃ）第２のＴ細胞集団を回収することを含む、ＴＩＬを拡大培養する方法を提供する。Ｇｅｎ３プロセス、Ｇｅｎ３プロセスからのＴＩＬを使用した処置方法及びＧｅｎ３によって調製されたＴＩＬの組成物は、以下の本明細書及び本出願を通して提供されるように、必要な細胞数を達成するために必要に応じて拡大培養の期間を調整して、小生検／コア生検と併せて使用され得る。

【０３３８】

［００５９２］ 一部の実施形態において、第２の急速拡大培養のステップは、（ａ）Ｔ細胞を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ内の小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）

小スケール培養物中の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コンテナに移し、小スケール培養物からのＴ細胞を、第２の容器内のより大きいスケールの培養物中で、約４～７日間の期間にわたり培養することにより、培養物のスケールアップを達成するために複数のステップに分割される。一部の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（ａ）Ｔ細胞を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、第１の小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）第１の小スケール培養物からのＴ細胞を、サイズが第１の容器と同じである、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の第２の容器に移し、配分することであって、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された第１の小スケール培養物からのＴ細胞の一部は、約４～７日間の期間にわたり、第２の小スケール培養物中で培養されることにより、培養物のスケールアウトを達成するために複数のステップに分割される。一部の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（ａ）Ｔ細胞を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）小スケール培養物からのＴ細胞を、サイズが第１の容器（例えば、G-REX 500MCSコンテナ）よりも大きい、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の第２の容器に移し、配分することであって、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された小スケール培養物からのＴ細胞の一部は、約４～７日間の期間にわたり、より大きいスケール培養物中で培養されることにより、培養物のスケールアウト及びスケールアップを達成するために複数のステップに分割される。一部の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（ａ）Ｔ細胞を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、小スケール培養物中で約４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）小スケール培養物からのＴ細胞を、サイズが第１の容器（例えば、G-REX 500MCSコンテナ）よりも大きい、２、３又は４個の第２の容器に移し、配分することであって、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された小スケール培養物からのＴ細胞の一部は、約５日間の期間にわたり、より大きいスケール培養物中で培養されることにより、培養物のスケールアウト及びスケールアップを達成するために複数のステップに分割される。

【０３３９】

［00593］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養によってもたらされるＴ細胞の活性化が減少、減弱、減衰又は鎮静し始めた後に、第２の急速拡大培養が実施される。

【０３４０】

［00594］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養によってもたらされるＴ細胞の活性化が１若しくは約１、２若しくは約２、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９、１０若しくは約１０、１１若しくは約１１、１２若しくは約１２、１３若しくは約１３、１４若しくは約１４、１５若しくは約１５、１６若しくは約１６、１７若しくは約１７、１８若しくは約１８、１９若しくは約１９、２０若しくは約２０、２１若しくは約２１、２２若しくは約２２、２３若しくは約２３、２４若しくは約２４、２５若しくは約２５、２６若しくは約２６、２７若しくは約２７、２８若しくは約２８、２９若しくは約２９、３０若しくは約３０、３１若しくは約３１、３２若しくは約３２、３３若しくは約３３、３４若しくは約３４、３５若しくは約３５、３６若しくは約３６、３７若しくは約３７、３８若しくは約３８、３９若しくは約３９、４０若しくは約４０、４１若しくは約４１、４２若しくは約４２、４３若しくは約４３、４４若しくは約４４、４５若しくは約４５、４６若しくは約４６、４７若しくは約４７、４８若しくは約４８、４９若しくは約４９、５０若しくは約５０、５１若しくは約５１、５２若しくは約５２、５３若しくは約５３、５４若しくは約５４、５５若しくは約５５、５６若しくは約５６、５７若しくは約５７、５

８若しくは約５８、５９若しくは約５９、６０若しくは約６０、６１若しくは約６１、６２若しくは約６２、６３若しくは約６３、６４若しくは約６４、６５若しくは約６５、６６若しくは約６６、６７若しくは約６７、６８若しくは約６８、６９若しくは約６９、７０若しくは約７０、７１若しくは約７１、７２若しくは約７２、７３若しくは約７３、７４若しくは約７４、７５若しくは約７５、７６若しくは約７６、７７若しくは約７７、７８若しくは約７８、７９若しくは約７９、８０若しくは約８０、８１若しくは約８１、８２若しくは約８２、８３若しくは約８３、８４若しくは約８４、８５若しくは約８５、８６若しくは約８６、８７若しくは約８７、８８若しくは約８８、８９若しくは約８９、９０若しくは約９０、９１若しくは約９１、９２若しくは約９２、９３若しくは約９３、９４若しくは約９４、９５若しくは約９５、９６若しくは約９６、９７若しくは約９７、９８若しくは約９８、９９若しくは約９９又は１００若しくは約１００％減少した後に、第２の急速拡大培養が実施される。

【０３４１】

［00595］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養によってもたらされるＴ細胞の活性化が１％又は約１％～１００％又は約１００％の範囲のパーセンテージで減少した後に、第２の急速拡大培養が実施される。

【０３４２】

［00596］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養によってもたらされるＴ細胞の活性化が１％若しくは約１％～１０％若しくは約１０％、１０％若しくは約１０％～２０％若しくは約２０％、２０％若しくは約２０％～３０％若しくは約３０％、３０％若しくは約３０％～４０％若しくは約４０％、４０％若しくは約４０％～５０％若しくは約５０％、５０％若しくは約５０％～６０％若しくは約６０％、６０％若しくは約６０％～７０％若しくは約７０％、７０％若しくは約７０％～８０％若しくは約８０％、８０％若しくは約８０％～９０％若しくは約９０％又は９０％若しくは約９０％～１００％若しくは約１００％の範囲のパーセンテージで減少した後に、第２の急速拡大培養が実施される。

【０３４３】

［00597］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養によってもたらされるＴ細胞の活性化が、少なくとも１若しくは約１、２若しくは約２、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９、１０若しくは約１０、１１若しくは約１１、１２若しくは約１２、１３若しくは約１３、１４若しくは約１４、１５若しくは約１５、１６若しくは約１６、１７若しくは約１７、１８若しくは約１８、１９若しくは約１９、２０若しくは約２０、２１若しくは約２１、２２若しくは約２２、２３若しくは約２３、２４若しくは約２４、２５若しくは約２５、２６若しくは約２６、２７若しくは約２７、２８若しくは約２８、２９若しくは約２９、３０若しくは約３０、３１若しくは約３１、３２若しくは約３２、３３若しくは約３３、３４若しくは約３４、３５若しくは約３５、３６若しくは約３６、３７若しくは約３７、３８若しくは約３８、３９若しくは約３９、４０若しくは約４０、４１若しくは約４１、４２若しくは約４２、４３若しくは約４３、４４若しくは約４４、４５若しくは約４５、４６若しくは約４６、４７若しくは約４７、４８若しくは約４８、４９若しくは約４９、５０若しくは約５０、５１若しくは約５１、５２若しくは約５２、５３若しくは約５３、５４若しくは約５４、５５若しくは約５５、５６若しくは約５６、５７若しくは約５７、５８若しくは約５８、５９若しくは約５９、６０若しくは約６０、６１若しくは約６１、６２若しくは約６２、６３若しくは約６３、６４若しくは約６４、６５若しくは約６５、６６若しくは約６６、６７若しくは約６７、６８若しくは約６８、６９若しくは約６９、７０若しくは約７０、７１若しくは約７１、７２若しくは約７２、７３若しくは約７３、７４若しくは約７４、７５若しくは約７５、７６若しくは約７６、７７若しくは約７７、７８若しくは約７８、７９若しくは約７９、８０若しくは約８０、８１若しくは約８１、８２若しくは約８２、８３若しくは約８３、８４若しくは約８４、８５若しくは約８５、８６若しくは約８６、８７若しくは約８７、８８若しくは約８８、８９若しく

は約８９、９０若しくは約９０、９１若しくは約９１、９２若しくは約９２、９３若しくは約９３、９４若しくは約９４、９５若しくは約９５、９６若しくは約９６、９７若しくは約９７、９８若しくは約９８又は９９若しくは約９９％減少した後に、第２の急速拡大培養が実施される。

【０３４４】

［００５９８］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養によってもたらされるＴ細胞の活性化が最大１若しくは約１、２若しくは約２、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９、１０若しくは約１０、１１若しくは約１１、１２若しくは約１２、１３若しくは約１３、１４若しくは約１４、１５若しくは約１５、１６若しくは約１６、１７若しくは約１７、１８若しくは約１８、１９若しくは約１９、２０若しくは約２０、２１若しくは約２１、２２若しくは約２２、２３若しくは約２３、２４若しくは約２４、２５若しくは約２５、２６若しくは約２６、２７若しくは約２７、２８若しくは約２８、２９若しくは約２９、３０若しくは約３０、３１若しくは約３１、３２若しくは約３２、３３若しくは約３３、３４若しくは約３４、３５若しくは約３５、３６若しくは約３６、３７若しくは約３７、３８若しくは約３８、３９若しくは約３９、４０若しくは約４０、４１若しくは約４１、４２若しくは約４２、４３若しくは約４３、４４若しくは約４４、４５若しくは約４５、４６若しくは約４６、４７若しくは約４７、４８若しくは約４８、４９若しくは約４９、５０若しくは約５０、５１若しくは約５１、５２若しくは約５２、５３若しくは約５３、５４若しくは約５４、５５若しくは約５５、５６若しくは約５６、５７若しくは約５７、５８若しくは約５８、５９若しくは約５９、６０若しくは約６０、６１若しくは約６１、６２若しくは約６２、６３若しくは約６３、６４若しくは約６４、６５若しくは約６５、６６若しくは約６６、６７若しくは約６７、６８若しくは約６８、６９若しくは約６９、７０若しくは約７０、７１若しくは約７１、７２若しくは約７２、７３若しくは約７３、７４若しくは約７４、７５若しくは約７５、７６若しくは約７６、７７若しくは約７７、７８若しくは約７８、７９若しくは約７９、８０若しくは約８０、８１若しくは約８１、８２若しくは約８２、８３若しくは約８３、８４若しくは約８４、８５若しくは約８５、８６若しくは約８６、８７若しくは約８７、８８若しくは約８８、８９若しくは約８９、９０若しくは約９０、９１若しくは約９１、９２若しくは約９２、９３若しくは約９３、９４若しくは約９４、９５若しくは約９５、９６若しくは約９６、９７若しくは約９７、９８若しくは約９８、９９若しくは約９９又は１００若しくは約１００％減少した後に、第２の急速拡大培養が実施される。

【０３４５】

［００５９９］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養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。

【０３４６】

［００６００］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、最大で７日間又は約７日間の期間中に実施される。

【０３４７】

［００６０１］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、最大で１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間又は７日間若しくは約７日間の期間中に実施される。

【０３４８】

［００６０２］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間又は７日間の期間中に実施される。

【０３４９】

［００６０３］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、最大で１１日間又は約１１日間の期間中に実施される。

【０３５０】
［００６０４］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、最大で１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間、７日間若しくは約７日間、８日間若しくは約８日間、９日間若しくは約９日間、１０日間若しくは約１０日間又は１１日間若しくは約１１日間の期間中に実施される。
【０３５１】
［００６０５］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間又は１１日間の期間中に実施される。
【０３５２】
［００６０６］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、１日間又は約１日間～７日間又は約７日間の期間中に実施され、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、１日間又は約１日間～１１日間又は約１１日間の期間中に実施される。
【０３５３】
［００６０７］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、最大で１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間又は７日間若しくは約７日間の期間中に実施され、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、最大で１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間、７日間若しくは約７日間、８日間若しくは約８日間、９日間若しくは約９日間、１０日間若しくは約１０日間又は１１日間若しくは約１１日間の期間中に実施される。
【０３５４】
［００６０８］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、１日間又は約１日間～７日間又は約７日間の期間中に実施され、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、１日間又は約１日間～９日間又は約９日間の期間中に実施される。
【０３５５】
［００６０９］一部の実施形態において、Ｔ細胞の第１の初回刺激拡大培養は、７日間の期間中に実施され、Ｔ細胞の第２の急速拡大培養は、９日間の期間中に実施される。
【０３５６】
［００６１０］一部の実施形態において、Ｔ細胞は腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）である。
【０３５７】
［００６１１］一部の実施形態において、Ｔ細胞は骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）である。
【０３５８】
［００６１２］一部の実施形態において、Ｔ細胞は、癌に罹患しているドナーから入手される。
【０３５９】
［００６１３］一部の実施形態において、Ｔ細胞は、癌に罹患している患者の腫瘍から得られるコア生検又は細針吸引から入手されるＴＩＬである。
【０３６０】
［００６１４］一部の実施形態において、Ｔ細胞は、血液悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から得られるＭＩＬである。
【０３６１】
［００６１５］一部の実施形態において、ドナーは癌に罹患している。一部の実施形態において、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽腫（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。一部の実施形態において、癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き

起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽腫（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。一部の実施形態において、ドナーは腫瘍に罹患している。一部の実施形態において、腫瘍は液性腫瘍である。一部の実施形態において、腫瘍は固形腫瘍である。一部の実施形態において、ドナーは血液悪性腫瘍に罹患している。

【０３６２】

［００６１６］これらの特徴のいくつかを含むプロセス３（本明細書ではＧＥＮ３とも称される）として知られる例示的なＴＩＬプロセスを図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に示し、プロセス２Ａに対する本発明の本実施形態の利点のいくつかを、図１、２、３０及び３１（特に、例えば図８５Ｂ）に示す。プロセス３の２つの実施形態が図１及び３０（特に、例えば図８５Ｂ）に示される。プロセス２Ａ又はＧｅｎ２は、全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第２０１８／０２８０４３６号にも記載される。Ｇｅｎ３プロセスは、２０１８年１１月５日に提出された米国特許出願第６２／７５５，９５４号（１１６９８３－５０４５－ＰＲ）にも記載される。

【０３６３】

［００６１７］一般的に本明細書で考察及び概説される通り、ＴＩＬは患者サンプルから採取し、本明細書に記載され、Ｇｅｎ３と称される、ＴＩＬ拡大培養プロセスを使用して操作することにより、患者への移植前にその数が拡大される。一部の実施形態において、ＴＩＬは任意選択により、以下に考察する通り、遺伝的に操作され得る。一部の実施形態において、ＴＩＬは、拡大培養前又は後に凍結保存され得る。解凍後、ＴＩＬはまた、患者への注入前にその代謝を高めるために再刺激され得る。

【０３６４】

［００６１８］一部の実施形態において、以下並びに実施例及び図で詳細に考察する通り、第１の初回刺激拡大培養（本明細書でプレ急速拡大培養（プレＲＥＰ）と称されるプロセス及び図８５（特に、例えば図８５Ｂ）にステップＢとして示されるプロセスを含む）は、１～７日間に短縮され、第２の急速拡大培養（本明細書で急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）と称されるプロセス及び図８５（特に、例えば図８５Ｂ）にステップＤとして示されるプロセスを含む）は、１～９日間に短縮される。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢとして記載される拡大培養）は７日間に短縮され、第２の急速拡大培養（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤに記載される拡大培養）は７～９日間である。一部の実施形態において、以下並びに実施例及び図で詳細に考察するように、第１の初回刺激拡大培養及び第２の急速拡大培養（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢ及びステップＤとして記載される拡大培養）の組み合わせは、１４～１６日間である。特に、本発明の特定の実施形態は、ＴＩＬがＩＬ－２の存在下での抗ＣＤ３抗体、例えばＯＫＴ－３への曝露又は少なくとも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り活性化される、第１の初回刺激拡大培養ステップを含むと考えられる。特定の実施形態において、上記の第１の初回刺激拡大培養ステップで活性化されるＴＩＬは、第１のＴＩＬ集団、即ち初代細胞集団である。

【０３６５】

［００６１９］以下の「ステップ」の名称Ａ、Ｂ、Ｃ等は、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）の非限定的な例を参照し、本明細書に記載の特定の非限定的な実施形態を参照している。以下及び図８５（特に、例えば図８５Ｂ）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又は順序並びに追加のステップ、ステップの繰り返し及び／又はステップの省略が、本願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【０３６６】

［００６２０］一部の実施形態において、腫瘍が転移性であり、過去に原発病変が効率的に処置／除去されている場合、転移性病変の１つの除去が必要になり得る。一部の実施形態において、最も侵襲性の低いアプローチは、利用可能な場合、皮膚病変又は首若しくは腋窩領域のリンパ節を除去することである。一部の実施形態において、皮膚病変が除去され

るか、又はその小生検が除去される。一部の実施形態において、リンパ節又はその小生検が除去される。一部の実施形態において、肺若しくは肝臓の転移性病変又は腹腔内若しくは胸部リンパ節又はその小生検を利用することができる。

【０３６７】

［００６２１］一部の実施形態において、腫瘍は黒色腫である。一部の実施形態において、黒色腫の小生検は、黒子又はその一部を含む。

【０３６８】

［００６２２］一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検である。一部の実施形態において、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得される。一部の実施形態において、パンチ生検は、疑わしい黒子の周りの皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得される。一部の実施形態において、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得され、皮膚の円形片が除去される。一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が除去される。

【０３６９】

［００６２３］一部の実施形態において、小生検は、切除生検である。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、黒子又は腫瘍全体が除去される。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、正常な外観を有する小さい辺縁と共に黒子又は腫瘍全体が除去される。

【０３７０】

［００６２４］一部の実施形態において、小生検は、切開生検である。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、黒子又は腫瘍の最も不規則な部分のみが採取される。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、切開生検は、疑わしい黒子が非常に大きい場合など、他の技法を完了できない場合に使用される。

【０３７１】

［００６２５］一部の実施形態において、小生検は、肺生検である。一部の実施形態において、小生検は、気管支鏡により取得される。一般に、気管支鏡では、患者は麻酔下に置かれ、小さいものが鼻又は口を通り、喉を下って気管支に進み、ここで、いくつかの組織を除去するために小さい道具が使用される。一部の実施形態において、気管支鏡を介して腫瘍又は増殖物に到達できない場合、経胸腔針生検を利用することができる。一般に、経胸腔針生検では、患者も麻酔下にあり、針を皮膚から直接疑わしい箇所に挿入して、組織の小さいサンプルを除去する。一部の実施形態において、経胸腔針生検は、介入的画像診断（例えば、針を誘導するためのＸ線又はＣＴスキャンの使用）を必要とする場合がある。一部の実施形態において、小生検は、針生検により取得される。一部の実施形態において、小生検は、超音波内視鏡（例えば、ライトを備えた内視鏡であり、口を通して食道内に配置される）で取得される。一部の実施形態において、小生検は、外科手術により取得される。

【０３７２】

［００６２６］一部の実施形態において、小生検は、頭頸部生検である。一部の実施形態において、小生検は、切開生検である。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、組織の小片が異常に見える領域から切り取られる。一部の実施形態において、異常な領域が容易にアクセスされる場合、入院することなくサンプルが採取され得る。一部の実施形態において、腫瘍が口又は喉の内部のより深い位置にある場合、生検は、全身麻酔を伴い、手術室で行われる必要がある場合がある。一部の実施形態において、小生検は、切除生検である。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、領域全体が除去される。一部の実施形態において、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。一部の実施形態において、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、腫瘍又はしこりから細胞を抽出（吸引）するために、シリンジに取り付けられた非常に細い針が使用される。一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検である。一部の実施形態において、小生検はパンチ生検であり、疑わしい領域の一片を除去するために、パンチ鉗子が使用される。

【０３７３】

[00627] 一部の実施形態において、小生検は、子宮頸部生検である。一部の実施形態において、小生検は、コルポスコピーにより取得される。一般に、コルポスコピー法では、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大鏡（コルポスコープ）の使用が採用され、子宮頸部の表面の小さい部分の生検に使用される。一部の実施形態において、小生検は、円錐切除／錐体生検である。一部の実施形態において、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除去するために外来手術が必要になる場合がある。一部の実施形態において、コーン生検は、診断の確認を助けることに加えて、コーン生検が初期処置として役立ち得る。

【０３７４】

[00628] 「固形腫瘍」という用語は、嚢胞又は液体領域を通常含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、新生物性又は癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌としては、限定はされないが、肺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌及び膀胱癌など、肉腫、癌腫及びリンパ腫が挙げられる。一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌、膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵癌、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。固形腫瘍の組織構造は、柔組織（癌細胞）を含む相互依存的組織コンパートメント及び癌細胞が分散し支持微小環境を提供し得る支持間質細胞を含む。

【０３７５】

[00629] 一部の実施形態において、腫瘍からのサンプルは、細針吸引（ＦＮＡ）、コア生検又は小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。一部の実施形態において、サンプルは最初にG-Rex 10に入れられる。一部の実施形態において、１つ又は２つのコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 10に入れられる。一部の実施形態において、３、４、５、６、８、９若しくは１０個又はそれを超えるコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 100に入れられる。一部の実施形態において、３、４、５、６、８、９若しくは１０個又はそれを超えるコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 500に入れられる。

【０３７６】

[00630] ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得ることができる。一部の実施形態において、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者からの肺腫瘍などの肺腫瘍から得られる。一部の場合、ＮＳＣＬＣを有する患者は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【０３７７】

[00631] 本明細書に記載されるＴＩＬは、ＦＮＡサンプルから得ることができる。一部の場合、ＦＮＡサンプルは、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲のハイゲージ針を使用して患者から取得又は分離される。ハイゲージ針は、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ゲージ又は２５ゲージとすることができる。一部の実施形態において、患者からのＦＮＡサンプルは、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又はそれを超える数のＴＩＬを含み得る。

【０３７８】

[00632] 一部の場合、本明細書に記載されるＴＩＬは、コア生検サンプルから得られる。一部の場合、小生検又はコア生検サンプルは、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用又は医療用針を使用して患者から取得又は分離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ又は１６ゲージとすることができる。一部の実施形態において、患者からのコア生検サンプルは、少なくとも４００，０００個のＴＩ

Ｌ、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又はそれを超える数のＴＩＬを含み得る。

【０３７９】

[00633] 一部の実施形態において、ＴＩＬは腫瘍消化物から入手される。一部の実施形態において、腫瘍消化物は、酵素培地中、例えば限定はされないが、RPMI 1640、２mM GlutaMAX、１０μｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ ＤＮアーゼ及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ中におけるインキュベーションと、それに続く機械的解離（GentleMACS、Miltenyi Biotec、Auburn, CA）によって生成した。腫瘍を酵素培地に置いた後、腫瘍を約１分間機械的に分離し得る。次に溶液を５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートし、次にそれを再び約１分間機械的に破壊し得る。再び５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートした後、腫瘍を３度目に約１分間機械的に破壊し得る。一部の実施形態において、３度目の機械的破壊後に大型の組織片が存在した場合、５％CO_2下３７℃での更に３０分間のインキュベーションを伴う又は伴わない１回又は２回の更なる機械的分離をサンプルに適用した。一部の実施形態において、最終回のインキュベーションの終了時に細胞懸濁液が多数の赤血球又は死細胞を含有した場合、フィコールを使用した密度勾配分離を実施して、そうした細胞を除去し得る。

【０３８０】

[00634] 一部の実施形態において、第１の拡大培養ステップ前の回収された細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に回収された」細胞集団と呼ばれる。

【０３８１】

[00635] 一部の実施形態において、細胞は、以下に更に詳細に記載し、図８５に例示する、ステップＢに記載の拡大培養に進む前に、任意選択によりサンプル回収後に凍結され、凍結貯蔵され得る。

【０３８２】

Ａ．ステップＡ：患者の腫瘍サンプルを入手

[00636] 一般に、ＴＩＬは、初めはコア生検又は類似の手順で入手された患者腫瘍サンプルから入手され（「初代ＴＩＬ」）、次に本明細書に記載される通りの更なる操作のためより大きい集団へと拡大培養され、任意選択により凍結保存され、且つ任意選択により表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【０３８３】

[00637] 患者腫瘍サンプルは、当該技術分野において公知の方法を用いて、概して、外科的切除、コア生検、針生検又はその他の、腫瘍とＴＩＬ細胞との混合物を含むサンプルを入手するための手段によって入手され得る。一般に、腫瘍サンプルは、原発腫瘍、浸潤性腫瘍又は転移性腫瘍を含めた任意の固形腫瘍からのものであり得る。一部の実施形態において、サンプルは、複数の小さい腫瘍サンプル又は生検からのものであり得る。一部の実施形態において、サンプルは、同じ患者からの単一の腫瘍からの複数の腫瘍サンプル（複数コアなど）を含み得る。一部の実施形態において、サンプルは、同じ患者からの１つ、２つ、３つ又は４つの腫瘍からの複数の腫瘍サンプル（転移性疾患の複数の病変から得られたコア生検など）を含み得る。一部の実施形態において、サンプルは、同じ患者からの複数の腫瘍からの複数の腫瘍サンプルを含み得る。腫瘍サンプルは、血液悪性腫瘍から得られた腫瘍など、液性腫瘍でもあり得る。固形腫瘍は、限定はされないが、乳癌、膵癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌及び皮膚癌（限定はされないが、扁平上皮癌、基底細胞癌及び黒色腫を含む）を含めた任意の癌型のものであり得る。一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、膠芽腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵癌、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。一部の実施形態において、有用なＴＩＬは、特に高レベルのＴＩＬを有すると報告されているように悪性黒色腫腫瘍から得られ

る。

【０３８４】

［00638］上記のように、一部の実施形態において、ＴＩＬは固形腫瘍コア又は断片から得られる。一部の実施形態において、固形腫瘍コア又は断片は、酵素消化に供される。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、コラゲナーゼ、ＤＮアーゼ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。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、コラゲナーゼ、ＤＮアーゼ及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間にわたり消化される。一部の実施形態において、腫瘍は、コラゲナーゼ、ＤＮアーゼ及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間にわたり、３７℃、５％CO_2で消化される。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、コラゲナーゼ、ＤＮアーゼ及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で１～２時間にわたり、３７℃、５％CO_2で、回転しながら消化される。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、一定の回転で一晩消化される。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、一定の回転で、３７℃、５％CO_2で一晩消化される。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、酵素と組み合わされて、腫瘍消化反応混合物を形成する。

【０３８５】

［00639］一部の実施形態において、ＴＩＬは腫瘍消化物から入手されない。一部の実施形態において、固形腫瘍コアは断片化されていない。

【０３８６】

［00640］一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片は、無菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。一部の実施形態において、緩衝液は無菌ＨＢＳＳである。

【０３８７】

［00641］一部の実施形態において、酵素混合物はコラゲナーゼを含む。一部の実施形態において、コラゲナーゼはコラゲナーゼＩＶである。一部の実施形態において、コラゲナーゼの作業ストックは、１００ｍｇ／ｍＬの１０Ｘ作業ストックである。

【０３８８】

［00642］一部の実施形態において、酵素混合物はＤＮアーゼを含む。一部の実施形態において、ＤＮアーゼの作業ストックは、１０，０００ＩＵ／ｍＬの１０Ｘ作業ストックである。

【０３８９】

［00643］一部の実施形態において、酵素混合物はヒアルロニダーゼを含む。一部の実施形態において、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、１０ｍｇ／ｍＬの１０Ｘ作業ストックである。

【０３９０】

［00644］一部の実施形態において、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、１０００ＩＵ／ｍＬのＤＮアーゼ及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。

【０３９１】

［00645］一部の実施形態において、酵素混合物は、１０ｍｇ／ｍＬのコラゲナーゼ、５００ＩＵ／ｍＬのＤＮアーゼ及び１ｍｇ／ｍＬのヒアルロニダーゼを含む。

【０３９２】

［00646］一般に、腫瘍コア又は断片から得られた細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に入手した」若しくは「新鮮に分離した」細胞集団と呼ばれる。特定の実施形態において、新鮮に入手したＴＩＬの細胞集団は、抗原提示細胞、ＩＬ－１２及びＯＫＴ－３を含む細胞培養培地に曝露される。

【０３９３】

［00647］一部の実施形態において、ＴＩＬは初めに、患者から入手された酵素的腫瘍コア又は断片の消化物及び腫瘍コア又は断片から培養することができる。一実施形態において、ＴＩＬは初めに、患者から入手された酵素的腫瘍コア又は断片の消化物及び腫瘍コア又は断片から培養することができる。

【０３９４】

[00648] 一部の実施形態において、ＴＩＬは腫瘍断片又はコアの消化物から入手される。一部の実施形態において、腫瘍断片又はコアの消化物は、酵素培地中、例えば限定はされないが、RPMI 1640、２ｍＭ GlutaMAX、１０ｍｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ ＤＮアーゼ及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ中におけるインキュベーションと、それに続く機械的解離（GentleMACS、Miltenyi Biotec、Auburn, CA）によって生成される。腫瘍断片又はコアを酵素培地に置いた後、腫瘍断片又はコアを約１分間機械的に分離し得る。次に溶液を５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートし、次にそれを再び約１分間機械的に破壊し得る。再び５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートした後、腫瘍断片又はコアを３度目に約１分間機械的に破壊し得る。一部の実施形態において、３度目の機械的破壊後に大型の組織片が存在した場合、５％CO_2下３７℃での更に３０分間のインキュベーションを伴う又は伴わない１回又は２回の更なる機械的分離をサンプルに適用した。一部の実施形態において、最終回のインキュベーションの終了時に細胞懸濁液が多数の赤血球又は死細胞を含有した場合、フィコールを使用した密度勾配分離を実施して、そうした細胞を除去し得る。

【０３９５】

[00649] 一部の実施形態において、腫瘍が転移性であり、過去に原発病変が効率的に処置／除去されている場合、転移性病変の１つの除去が必要になり得る。一部の実施形態において、最も侵襲性の低いアプローチは、利用可能な場合、皮膚病変又は首若しくは腋窩領域のリンパ節を除去することである。一部の実施形態において、皮膚病変が除去されるか、又はその小生検が除去される。一部の実施形態において、リンパ節又はその小生検が除去される。一部の実施形態において、肺若しくは肝臓の転移性病変又は腹腔内若しくは胸部リンパ節又はその小生検を利用することができる。

【０３９６】

[00650] 一部の実施形態において、腫瘍は黒色腫である。一部の実施形態において、黒色腫の小生検は、黒子又はその一部を含む。

【０３９７】

[00651] 一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検である。一部の実施形態において、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得される。一部の実施形態において、パンチ生検は、疑わしい黒子の周りの皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得される。一部の実施形態において、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形ブレードを用いて取得され、皮膚の円形片が除去される。一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が除去される。

【０３９８】

[00652] 一部の実施形態において、小生検は、切除生検である。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、黒子又は腫瘍全体が除去される。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、正常な外観を有する小さい辺縁と共に黒子又は腫瘍全体が除去される。

【０３９９】

[00653] 一部の実施形態において、小生検は、切開生検である。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、黒子又は腫瘍の最も不規則な部分のみが採取される。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、切開生検は、疑わしい黒子が非常に大きい場合など、他の技法を完了できない場合に使用される。

【０４００】

[00654] 一部の実施形態において、小生検は、肺生検である。一部の実施形態において、小生検は、気管支鏡により取得される。一般に、気管支鏡では、患者は麻酔下に置かれ、小さいものが鼻又は口を通り、喉を下って気管支に進み、ここで、いくつかの組織を除去するために小さい道具が使用される。一部の実施形態において、気管支鏡を介して腫瘍又は増殖物に到達できない場合、経胸腔針生検を利用することができる。一般に、経胸腔針生検では、患者も麻酔下にあり、針を皮膚から直接疑わしい箇所に挿入して、組織の小さいサンプルを除去する。一部の実施形態において、経胸腔針生検は、介入的画像診断

（例えば、針を誘導するためのＸ線又はＣＴスキャンの使用）を必要とする場合がある。一部の実施形態において、小生検は、針生検により取得される。一部の実施形態において、小生検は、超音波内視鏡（例えば、ライトを備えた内視鏡であり、口を通して食道内に配置される）で取得される。一部の実施形態において、小生検は、外科手術により取得される。

【０４０１】

[00655] 一部の実施形態において、小生検は、頭頸部生検である。一部の実施形態において、小生検は、切開生検である。一部の実施形態において、小生検は切開生検であり、組織の小片が異常に見える領域から切り取られる。一部の実施形態において、異常な領域が容易にアクセスされる場合、入院することなくサンプルが採取され得る。一部の実施形態において、腫瘍が口又は喉の内部のより深い位置にある場合、生検は、全身麻酔を伴い、手術室で行われる必要がある場合がある。一部の実施形態において、小生検は、切除生検である。一部の実施形態において、小生検は切除生検であり、領域全体が除去される。一部の実施形態において、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）である。一部の実施形態において、小生検は、細針吸引（ＦＮＡ）であり、腫瘍又はしこりから細胞を抽出（吸引）するために、シリンジに取り付けられた非常に細い針が使用される。一部の実施形態において、小生検は、パンチ生検である。一部の実施形態において、小生検はパンチ生検であり、疑わしい領域の一片を除去するために、パンチ鉗子が使用される。

【０４０２】

[00656] 一部の実施形態において、小生検は、子宮頸部生検である。一部の実施形態において、小生検は、コルポスコピーにより取得される。一般に、コルポスコピー法では、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大鏡（コルポスコープ）の使用が採用され、子宮頸部の表面の小さい部分の生検に使用される。一部の実施形態において、小生検は、円錐切除／錐体生検である。一部の実施形態において、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除去するために外来手術が必要になる場合がある。一部の実施形態において、コーン生検は、診断の確認を助けることに加えて、コーン生検が初期処置として役立ち得る。

【０４０３】

[00657] 「固形腫瘍」という用語は、嚢胞又は液体領域を通常含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、新生物性又は癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌としては、限定はされないが、肺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌及び膀胱癌など、肉腫、癌腫及びリンパ腫が挙げられる。一部の実施形態において、癌は、子宮頸癌、頭頸部癌、膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵癌、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。固形腫瘍の組織構造は、柔組織（癌細胞）を含む相互依存的組織コンパートメント及び癌細胞が分散し支持微小環境を提供し得る支持間質細胞を含む。

【０４０４】

[00658] 一部の実施形態において、腫瘍からのサンプルは、細針吸引（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。一部の実施形態において、サンプルは最初にG-Rex 10に入れられる。一部の実施形態において、１つ又は２つのコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 10に入れられる。一部の実施形態において、３、４、５、６、８、９若しくは１０個又はそれを超えるコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 100に入れられる。一部の実施形態において、３、４、５、６、８、９若しくは１０個又はそれを超えるコア生検及び／又は小生検サンプルがある場合、サンプルは最初にG-Rex 500に入れられる。

【０４０５】

[00659] ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得ることができる。一部の実施形態において、ＦＮＡは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する患者からの肺腫瘍などの肺腫瘍か

ら得られる。一部の場合、ＮＳＣＬＣを有する患者は、以前に外科的処置を受けたことがある。

【０４０６】

［00660］本明細書に記載されるＴＩＬは、ＦＮＡサンプルから得ることができる。一部の場合、ＦＮＡサンプルは、１８ゲージ針～２５ゲージ針の範囲のハイゲージ針を使用して患者から取得又は分離される。ハイゲージ針は、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ゲージ又は２５ゲージとすることができる。一部の実施形態において、患者からのＦＮＡサンプルは、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又はそれを超える数のＴＩＬを含み得る。

【０４０７】

［00661］一部の場合、本明細書に記載されるＴＩＬは、コア生検サンプルから得られる。一部の場合、コア生検又は小生検サンプルは、１１ゲージ針～１６ゲージ針の範囲の外科用又は医療用針を使用して患者から取得又は分離される。針は、１１ゲージ、１２ゲージ、１３ゲージ、１４ゲージ、１５ゲージ又は１６ゲージとすることができる。一部の実施形態において、患者からのコア生検サンプルは、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又はそれを超える数のＴＩＬを含み得る。

【０４０８】

［00662］一部の実施形態において、ＴＩＬは腫瘍コア又は断片の消化物から入手される。一部の実施形態において、腫瘍コア又は断片の消化物は、酵素培地中、例えば限定はされないが、RPMI 1640、２ｍＭ GlutaMAX、１０μｇ／ｍＬゲンタマイシン、３０Ｕ／ｍＬ　ＤＮアーゼ及び１．０ｍｇ／ｍＬコラゲナーゼ中におけるインキュベーションと、それに続く機械的解離（GentleMACS、Miltenyi Biotec、Auburn, CA）によって生成した。腫瘍コア又は断片を酵素培地に置いた後、腫瘍を約１分間機械的に分離し得る。次に溶液を５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートし、次にそれを再び約１分間機械的に破壊し得る。再び５％CO_2下３７℃で３０分間インキュベートした後、腫瘍コア又は断片を、３度目に約１分間機械的に破壊し得る。一部の実施形態において、３度目の機械的破壊後に大型の組織片が存在した場合、５％CO_2下３７℃での更に３０分間のインキュベーションを伴う又は伴わない１回又は２回の更なる機械的分離をサンプルに適用した。一部の実施形態において、最終回のインキュベーションの終了時に細胞懸濁液が多数の赤血球又は死細胞を含有した場合、フィコールを使用した密度勾配分離を実施して、そうした細胞を除去し得る。

【０４０９】

［00663］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養ステップ前の細胞懸濁液は、「初代細胞集団」又は「新鮮に入手した」若しくは「新鮮に分離した」細胞集団と呼ばれる。

【０４１０】

［00664］一部の実施形態において、細胞は、以下に更に詳細に記載し、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示する、ステップＢに記載の拡大培養に進む前に、任意選択によりサンプル分離後（例えば、腫瘍サンプルを取得した後及び／又は腫瘍サンプルから細胞懸濁液を取得した後）に凍結され、凍結貯蔵され得る。

【０４１１】

Ｂ．ステップＢ：第１の初回刺激拡大培養

[00665] 一部の実施形態において、本方法は、より幼若なＴＩＬを提供し、これは、より成熟したＴＩＬ（即ち対象／患者への投与前に更に多くの回数の複製を受けたＴＩＬ）を超える追加の治療上の利点を提供し得る。溶着ＴＩＬの特徴が、文献に記載されている。例えば、Donia, et al., Scandinavian Journal of Immunology, 75:157-167 (2012)；Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010)；Huang et al., J Immunother, 28(3):258-267 (2005)；Besser et al., Clin Cancer Res, 19(17):OF1-OF9 (2013)；Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009)；Robbins, et al., J Immunol 2004; 173:7125-7130；Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007)；Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005)；及びTran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008)であり、これらは全て、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【０４１２】

[00666] 腫瘍断片及び／又は腫瘍コアの生検又は消化後、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＡに記載されたように、得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもＴＩＬの成長に有利な条件下で血清含有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）において培養される。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びフィーダー細胞は、腫瘍断片若しくはコア消化物及び／又は腫瘍断片若しくはコアと共に培養開始時に（例えば、０日目に）添加される。一部の実施形態において、腫瘍断片若しくはコア消化物及び／又は腫瘍断片若しくはコアは、１容器あたり最大６０個の断片又はコア及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と共に容器中でインキュベートされる。この初代細胞集団は、数日、概して１～７日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養は、１～７日の期間にわたって起こり、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この第１の初回刺激拡大培養は、５～７日の期間にわたって起こり、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この第１の初回刺激拡大培養は、約６～７日の期間にわたって起こり、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、この第１の初回刺激拡大培養は、約７日の期間にわたって起こり、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約1×10^{8}個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。

【０４１３】

[00667] 好ましい実施形態において、以下及び本明細書で説明するように、第１の初回刺激拡大培養ステップ（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称され、０日目及び／又は培養開始からフィーダー細胞を含有するプロセスを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢで説明したものなど）、その後の、以下ステップＤの下及び本明細書に記載されているように、第２の急速拡大培養（ステップＤ、急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）ステップと称されるプロセスを含む）、以下及び本明細書に記載されているように、その後の、任意選択の凍結保存及びその後の第２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ＴＩＬの拡大培養を実施することができる。このプロセスによって入手したＴＩＬは、任意選択により、本明細書に記載される通り表現型特徴及び代謝パラメータが特徴付けられ得る。一部の実施形態において、腫瘍断片は約$1mm^{3}$～$10mm^{3}$である。

【０４１４】

[00668] 一部の実施形態において、第１の拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、ステップＢのＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０μｇ／ｍＬゲンタマイシンを補充したGlutaMAX含有RPMI 1640からなる。

【０４１５】

[00669] 一部の実施形態において、２４０個以下の腫瘍断片又はコアが存在する。一

部の実施形態において、４つ以下の容器に入れられた２４０個以下の腫瘍断片又はコアが存在する。一部の実施形態において、容器はGREX100 MCSフラスコである。一部の実施形態において、６０個以下の腫瘍断片又はコアが１つの容器に入れられる。一部の実施形態において、各容器は、１容器あたり５００ｍＬ以下の培地を含む。一部の実施形態において、培地はＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、培地は６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり２．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、培地はＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、容器はGREX100 MCSフラスコである。一部の実施形態において、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／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。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／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。

【０４１６】

［00670］ 腫瘍断片又はコアの調製後、得られた細胞（即ち断片又はコアから得られ、初代細胞集団を構成する）は、ＩＬ－２、抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含有する培地で、腫瘍及びその他の細胞よりもＴＩＬの増殖に有利であり、ＴＩＬ初回刺激及び０日目の培養開始からの増殖の加速を可能にする条件下で培養される。一部の実施形態において、腫瘍断片若しくはコア消化物及び／又は腫瘍断片若しくはコアは、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２並びに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３と共にインキュベートされる。この初代細胞集団は、数日、概して１～７日の期間にわたって培養され、それによりバルクＴＩＬ集団、概して約１×10^8個のバルクＴＩＬ細胞が得られる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養中の成長培地はＩＬ－２又はその変異体並びに抗原提示フィーダー細胞及びＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、ＩＬ－２は組換えヒトＩＬ－２（ｒｈＩＬ－２）である。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて２０～３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて２０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて２５×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態においてＩＬ－２ストック溶液は１ｍｇバイアルについて３０×10^6ＩＵ／ｍｇの比活性を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は４～８×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は５～７×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は６×10^6ＩＵ／ｍｇのＩＬ－２の最終濃度を有する。一部の実施形態において、ＩＬ－２ストック溶液は実施例５に記載される通り調製される。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約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又は約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約９，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約５，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約８，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約７，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２～約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約６，０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地はＩＬ－２を更に含む。好ましい一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地は、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地は、１０００～２０００ＩＵ／ｍＬ、２０００～３０００ＩＵ／ｍＬ、３０００～４０００ＩＵ／ｍＬ、４０００～５０００ＩＵ／ｍＬ、５０００～６０００ＩＵ／ｍＬ、６０００～７０００ＩＵ／ｍＬ、７０００～８０００ＩＵ／ｍＬ又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０４１７】

[00671] 一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約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又は約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５～約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地はＩＬ－１５を更に含む。好ましい一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０４１８】

[00672] 一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約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又は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１～約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２１を更に含む。好ましい一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。

【０４１９】

[00673] 一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地はＯＫＴ－３抗体を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培地は約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地は、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９０

ｎｇ／ｍＬ、約１００ｎｇ／ｍＬ、約２００ｎｇ／ｍＬ、約５００ｎｇ／ｍＬ及び約１μｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、１５ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一部の実施形態において、ＯＫＴ－３抗体はムロモナブである。

【０４２０】

【表４】

表18: ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なOKT-3抗体）

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

【０４２１】

［00674］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地は、細胞培養培地中に１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストを含む。一部の実施形態において、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、融合タンパク質並びにその断片、誘導体、変異体、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。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、細胞培養培地中、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、細胞培養培地中、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０４２２】

［00675］一部の実施形態において、１つ以上のＴＮＦＲＳＦに加えて、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地は、初期濃度約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び初期濃度約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を更に含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。一部の実施形態において、１つ以上のＴＮＦＲＳＦに加えて、第１の初回刺激拡大培養細胞培養培地は、初期濃度約６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び初期濃度約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を更に含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４２３】

［00676］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地は、培養培地の略称である「ＣＭ」と称される。一部の実施形態において、これはＣＭ１（培養培地１）と称される。一部の実施形態において、ＣＭは、１０％ヒトＡＢ血清、２５ｍＭヘペス及び１０ｍｇ／μＬゲンタマイシンを補充したGlutaMAX含有RPMI 1640からなる。一部の実施形態において、ＣＭは、実施例に記載されるＣＭ１であり、実施例１及び１４を参照されたい。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養は初期細胞培養培地又は第１

の細胞培養培地中で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養培地又は初期細胞培養培地又は第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（フィーダー細胞とも称される）を含む。

【０４２４】

［00677］ 一部の実施形態において、実施例及び図で考察されているように、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは１～７日間である。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは２～７日間である。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは３～７日間である。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは４～７日間である。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは５～７日間である。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載されるプロセスなどを含む）プロセスは６～７日間である。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養（例えば、プレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称されることもあるものを含み得る、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに提供されるプロセスなどを含む）プロセスは７日間である。

【０４２５】

［00678］ 一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、２日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、３日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、４日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、５日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、６日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、２日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、３日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断

片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、４日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、５日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、６日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、８日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１０日間続行され得る。一部の実施形態において、小生検（例えば、コア生検）は、約１、２又は３日目に培養物から取り出される。一部の実施形態において、小生検（例えば、コア生検）は３日目に培養物から取り出される。

【０４２６】

［００６７９］一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、８日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、９日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１０日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１１日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１２日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１３日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１４日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１５日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１の初回刺激ＴＩＬ拡大培養は、腫瘍コア又は断片が細胞培養物に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１６日間～１７日間続行され得る。

【０４２７】

［００６８０］一部の実施形態において、ＴＩＬの第１の初回刺激拡大培養は１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間又は１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は２日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は３日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は４日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は５日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は６日間～７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は２日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大

培養は３日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は４日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は５日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は６日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は７日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は８日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は９日間～１０日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は８日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は９日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１０日間続行され得る。

【０４２８】

[00681] 一部の実施形態において、ＴＩＬの第１の初回刺激拡大培養は８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間又は１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は８日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は９日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１０日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１１日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１２日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１３日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１４日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１５日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１６日間～１７日間続行され得る。一部の実施形態において、第１のＴＩＬ拡大培養は１７日間続行され得る。

【０４２９】

[00682] 一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１の組み合わせが、第１の初回刺激拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１並びにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）による並びに本明細書に記載されている通り、ステップＢプロセス中を含む、第１の初回刺激拡大培養中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせが、第１の初回刺激拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１並びにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）による及び本明細書に記載されている通りステップＢプロセス中に含められ得る。

【０４３０】

[00683] 一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）によるステップＢは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、バイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、バイオリアクターが容器として用いられる。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、G-REX-100である。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、G-REX-10である。

【０４３１】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

[00684] 一実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養手順（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＢに記載された拡大培養並びにプレＲＥＰ又は初回刺激ＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、ＴＩＬ拡大培養の開始時及び第１の初回刺激拡大培養中に、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。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、同種異系健常供血者から

の標準的な全血ユニットから入手される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて入手される。一部の実施形態において、２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が第１の初回刺激拡大培養中に用いられる。一部の実施形態において、１容器あたり２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が第１の初回刺激拡大培養中に用いられる。一部の実施形態において、１つのGREX-10あたり２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が第１の初回刺激拡大培養中に用いられる。一部の実施形態において、１つのGREX-100あたり２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞が第１の初回刺激拡大培養中に用いられる。

【０４３２】

[00685] 一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又は熱処理のいずれかにより不活性化され、同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用される。

【０４３３】

[00686] 一部の実施形態において、１４日目の生細胞の総数が、第１の初回刺激拡大培養の０日目に培養物に入れられた初期生細胞数より少ない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。

【０４３４】

[00687] 一部の実施形態において、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、第１の初回刺激拡大培養の０日目に培養物に入れられた初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０４３５】

[00688] 一部の実施形態において、７日目のＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、第１の初回刺激拡大培養の０日目に培養物に入れられた初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、５～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１０～５０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、２０～４０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、２５～３５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０４３６】

[00689] 一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞はＰＢＭＣである。一部の実施形態において、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。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は１：５０～１：３００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は１：１００～１：２００である。

【０４３７】
［00690］一実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養手順は、約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞と約１００×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養手順は、約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞と約５０×１０^{6}個のＴＩＬの比を必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養は、約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞と約２５×１０^{6}個のＴＩＬを必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養は、約２．５×１０^{8}個のフィーダー細胞を必要とする。更に別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養は、第２の急速拡大培養で使用されるフィーダー細胞の数の４分の１、３分の１、１２分の５又は半分を必要とする。
【０４３８】
［00691］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養における培地は、ＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養における培地は、１容器あたり２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養における培地は、ＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり３０ｎｇのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、容器はGREX100 MCSフラスコである。一部の実施形態において、培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／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。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／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。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞あたり、５００ｍＬの培養培地及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり５００ｍＬの培養培地及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、容器はGREX100 MCSフラスコである。一部の実施形態において、培地は、５００ｍＬの培養培地及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり、５００ｍＬの培養培地及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、１５ｕｇのＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり２．５×１０^{8}の抗原提示フィーダー細胞あたり、５００ｍＬの培養培地及び１５ｕｇのＯＫＴ－３を含む。
【０４３９】
［00692］一実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養手順は、第２の拡大培養中に、ＴＩＬに対して過剰量のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、同種異系健常供血者からの標準的な全血ユニットから入手される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて入手される。一実施形態において、ＰＢＭＣの代わりに人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が使用される。
【０４４０】
［00693］一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又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た例示的な手順を含む、本明細書に記載されたＴＩＬ拡大培養手順で使用される。
【０４４１】
［00694］一実施形態において、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として又はそれと組み合わせて、第１の初回刺激拡大培養で使用される。
【０４４２】
２．サイトカイン
［00695］本明細書に記載の拡大培養方法は、一般に、当該技術分野において公知の通り、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。

【０４４３】

［00696］代わりに、ＴＩＬの第１の初回刺激拡大培養にサイトカインの組み合わせを使用することが更に可能であり、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の２つ以上の組み合わせについては、概して国際公開第２０１５／１８９３５６号及び国際公開第２０１５／１８９３５７号（その全体が参照により明示的に本明細書に組み込まれる）に概説される通りである。従って、可能な組み合わせとしては、ＩＬ－２とＩＬ－１５、ＩＬ－２とＩＬ－２１、ＩＬ－１５とＩＬ－２１とＩＬ－２、ＩＬ－１５とＩＬ－２１が挙げられ、後者には多くの実施形態において特定の使用が見出される。これらの明細書に記載される通り、サイトカインの組み合わせを使用することは、特にリンパ球、詳細にはＴ細胞の生成に有利である。

【０４４４】

【表５】

表19：インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号3 組換えヒトIL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号5 組換えヒトIL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号6 組換えヒトIL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
配列番号7 組換えヒトIL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
配列番号8 組換えヒトIL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【０４４５】

Ｃ．ステップＣ：第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行

［00697］一部の場合、例えば、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に示されるステップＢから得られる、ＴＩＬ集団を含む、第１の初回刺激拡大培養から得られたバルクＴＩＬ集団（プレＲＥＰと称されることがある拡大培養を含み得る）は、第２の急速拡大培養（急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）と称されることがある拡大培養を含み得る）に供し、その後、以下で考察するように凍結保存し得る。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬが治療に使用される場合、初回刺激拡大培養からの拡大培養されたＴＩＬ集団又は第２の急速拡大培養からの拡大培養されたＴＩＬ集団は、拡大培養ステップ前又は第１の初回刺激拡大培養後且つ第２の急速拡大培養前に適切な処置のために遺伝子修飾に供し得る。

【０４４６】

［00698］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に示される通りのステップＢから）入手されたＴＩＬは、選択のためのフェノタイピングまで貯蔵される。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に示される通りのステップＢから）入手されたＴＩＬは貯蔵されず、第２の急速拡大培養に直接進む。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から入手されたＴＩＬは、第１の初回刺激拡大培養後、第２の急速拡大培養前に凍結保存されない。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、腫瘍コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及

び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、約２日、３日、４日、５日、６日又は７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、約３日～７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、約４日～７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、約５日～７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、約６日～７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、約７日の時点で行われる。

【０４４７】

［００６９９］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１日、２日、３日、４日、５日、６日又は７日、最大１０日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、１日～７日の時点で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、２日～７日で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、３日～７日で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、４日～７日で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、５日～７日で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、６日～７日で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、コア又は断片が細胞培養培地に添加されたとき及び／又は第１の初回刺激拡大培養ステップが開始されたときから、７日で行われる。

【０４４８】

［００７００］一部の実施形態において、ＴＩＬは、最初の第１の拡大培養後、第２の急速拡大培養前に貯蔵されず、ＴＩＬは第２の急速拡大培養に直接進む（例えば、一部の実施形態において、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に示すように、ステップＢからステップＤへの移行中に貯蔵は行われない）。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、移行は閉鎖系で行われる。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養からのＴＩＬは、第２のＴＩＬ集団からのＴＩＬであり、移行期間を伴わず第２の急速拡大培養に直接進む。

【０４４９】

［００７０１］一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）によるステップＣは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩ

Ｌ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、単一のバイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10又はG-REX-100である。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養から第２の急速拡大培養への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養は、第２の急速拡大培養よりも小さい容器内で実施される。一部の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養はGREX-100で実施され、第２の急速拡大培養はGREX-500で実施される。

【０４５０】

Ｄ．ステップＤ：第２の急速拡大培養

［00702］一部の実施形態において、ＴＩＬ細胞集団は、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に示されるように、ステップＡ及びステップＢ並びにステップＣと称される移行後、回収及び第１の初回刺激拡大培養後、数が更に増加する。この更なる増加は、本明細書では第２の急速拡大培養と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡大培養法と称される拡大培養プロセス（急速拡大培養プロトコル又はＲＥＰ並びに図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤに示されるプロセス）を含み得る。第２の急速拡大培養は、概して、フィーダー細胞、サイトカイン源及び抗ＣＤ３抗体を含め、幾つもの成分を含むガス透過性容器内の培養培地を使用して達成することができる。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養の開始後１日、２日、３日又は４日（即ちＧｅｎ３プロセス全体の８、９、１０又は１１日目）で、ＴＩＬは、より大きい容量の容器に移される。

【０４５１】

［00703］一部の実施形態において、ＴＩＬの第２の急速拡大培養（これはＲＥＰと称されることもある拡大培養；並びに図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に公知の任意のＴＩＬフラスコ又は容器を使用して実施することができる。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、１日間、２日間、３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間又は９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約１日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約２日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約３日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約４日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約５日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約６日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約７日間～約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約７日間～約１０日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約１日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約２日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約３日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約４日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約５日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約６日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約７日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約８日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約９日間続行し得る。一部の実施形態において、第２のＴＩＬ拡大培養は、第２の急速拡大培養の開始後、約１０日間続行し得る。

【０４５２】

[00704] 一実施形態において、第２の急速拡大培養は、本開示の方法（例えば、ＲＥＰと称される膨張並びに図８５（特に、例えば図８５Ｂ）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実施することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下で、第２の急速拡大培養で拡大培養される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びフィーダー細胞の存在下で、第２の急速拡大培養で拡大培養され、ここで、フィーダー細胞は、第１の初回刺激拡大培養で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倍又は４倍である最終濃度まで添加される。例えば、ＴＩＬは、インターロイキン－２（ＩＬ－２）又はインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非特異的Ｔ細胞受容体刺激を用いて急速に拡大培養することができる。非特異的Ｔ細胞受容体刺激としては、例えば、約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３などの抗ＣＤ３抗体、マウスモノクローナル抗ＣＤ３抗体（Ortho-McNeil、Raritan, NJ又はMiltenyi Biotech、Auburn, CAから市販されている）又はＵＨＣＴ－１（BioLegend、San Diego, CA, USAから市販されている）を挙げることができる。ＴＩＬは、任意選択で３００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２又はＩＬ－１５など、Ｔ細胞成長因子の存在下で、ヒト白血球抗原Ａ２（ＨＬＡ－Ａ２）結合ペプチド、例えば、０．３μＭ　ＭＡＲＴ－１：２６－３５（２７Ｌ）又はｇｐｌ　００：２０９－２１７（２１０Ｍ）など、任意選択でベクターから発現させることのできる、１つ又は複数のエピトープなど、その抗原性部分を含めた癌の１つ以上の抗原を、第２の拡大培養中に誘導することにより、インビトロでのＴＩＬの更なる刺激を誘発するように拡大培養することができる。他の好適な抗原としては、例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ癌抗原、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＳＳＸ－２及びＶＥＧＦＲ２又はその抗原性部分を挙げることができる。ＴＩＬは、ＨＬＡ－Ａ２発現抗原提示細胞にパルスした癌の同じ１つ又は複数の抗原による再刺激によっても急速に拡大培養し得る。代わりに、ＴＩＬは、例えば照射自己リンパ球によるか、又は照射ＨＬＡ－Ａ２＋同種異系リンパ球及びＩＬ－２によって更に再刺激することができる。一部の実施形態において、再刺激は、第２の拡大培養の一部として生じる。一部の実施形態において、照射された自己リンパ球の存在下において、又は照射されたＨＬＡ－Ａ２＋同種リンパ球及びＩＬ－２と共に第２の拡大培養が発生する。

【０４５３】

[00705] 一実施形態において、細胞培養培地は、ＩＬ－２を更に含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は約８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一実施形態において、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又は８０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。

【０４５４】

[00706] 一実施形態において、細胞培養培地は、ＯＫＴ－３抗体を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、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。一実施形態において、細胞培養

培地は、０．１ｎｇ／ｍＬ～１ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ及び５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は、３０ｎｇ／ｍＬ～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を含む。一実施形態において、細胞培養培地は約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。一実施形態において、細胞培養培地は約６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、ＯＫＴ－３抗体はムロモナブである。

【０４５５】

[00707] 一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、ＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、培地は６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、１容器あたり７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、ＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養培地は、１容器あたり５００ｍＬの培養培地及び３０ｕｇのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、容器はGREX100 MCSフラスコである。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、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。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり、５００ｍＬの培養培地及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０ｕｇのＯＫＴ－３及び７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０４５６】

[00708] 一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、ＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、培地は６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、培地は、１容器あたり５×10^8～７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、ＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、１容器あたり５００ｍＬの培養培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む。一部の実施形態において、容器はGREX100 MCSフラスコである。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３及び５×10^8～７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養における培地は、１容器あたり、５００ｍＬの培養培地及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇのＯＫＴ－３及び５×10^8～７．５×10^8個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【０４５７】

[00709] 一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは４－１ＢＢアゴニストを含む。一部の実施形態において、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、融合タンパク質並びにそれらの断片、誘導体、変異体、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。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、細胞培養培地中、０．１μｇ／ｍＬ～１００μｇ／ｍＬの濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。一部の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、細胞培養培地中、２０μｇ／ｍＬ～４０μｇ／ｍＬの濃度を達成するのに十分な濃度で添加される。

【０４５８】

[00710] 一部の実施形態において、１つ以上のＴＮＦＲＳＦに加えて、細胞培養培地は、初期濃度約３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び初期濃度約３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ－３抗体を更に含み、１つ以上のＴＮＦＲＳＦアゴニストは、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０４５９】

[00711] 一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１の組み合わせが、第２の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１並びにそれらの任意選択の組み合わせは、例えば、図８５（特に例えば図８５Ｂ）による並びに本明細書に記載されている通り、ステップＤプロセス中を含む、第２の拡大培養中に含められ得る。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせが、第２の拡大培養中の組み合わせとして用いられる。一部の実施形態において、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１並びにそれらの任意選択の組み合わせは、例えば、図８５（特に例えば図８５Ｂ）による及び本明細書に記載されている通りステップＤプロセス中に含められ得る。

【０４６０】

[00712] 一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、抗原提示フィーダー細胞及び任意選択によりＴＮＦＲＳＦアゴニストを含む添加細胞培養培地で実施され得る。一部の実施形態において、第２の拡大培養は添加細胞培養培地で行われる。一部の実施形態において、添加細胞培養培地は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、第２の拡大培養は、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示フィーダー細胞を含む細胞培養培地で生じる（即ち抗原提示細胞）。

【０４６１】

[00713] 一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約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又は約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、乃至約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約４００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、乃至約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５、乃至約１００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－１５を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は約１８０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１５を含む。

【０４６２】

[00714] 一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約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又は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約２０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約１５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約１２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１、乃至約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、第２の拡大培養培地は約２ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一部の実施形態において、細胞培養培地は約０．５ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１を含む。一実施形態において、細胞培養培地はＩＬ－２１を更に含む。好ましい一実施形態において、細胞培養培地は約１ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２１

を含む。

【０４６３】

［00715］一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）はＰＢＭＣである。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣ及び／又は抗原提示細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣとの比は、１：５０～１：３００である。一実施形態において、急速拡大培養及び／又は第２の拡大培養におけるＴＩＬとＰＢＭＣとの比は、１：１００～１：２００である。

【０４６４】

［00716］一実施形態において、ＲＥＰ及び／又は第２の急速拡大培養は、バルクＴＩＬを１５０ｍＬ培地中の１００倍又は２００倍過剰の不活性化フィーダー細胞（ここで、フィーダー細胞の濃度は、第１の初回刺激拡大培養におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも１．１倍（１．１Ｘ）、１．２Ｘ、１．３Ｘ、１．４Ｘ、１．５Ｘ、１．６Ｘ、１．７Ｘ、１．８Ｘ、１．８Ｘ、２Ｘ、２．１Ｘ２．２Ｘ、２．３Ｘ、２．４Ｘ、２．５Ｘ、２．６Ｘ、２．７Ｘ、２．８Ｘ、２．９　Ｘ、３．０Ｘ、３．１Ｘ、３．２Ｘ、３．３Ｘ、３．４Ｘ、３．５Ｘ、３．６Ｘ、３．７Ｘ、３．８Ｘ、３．９Ｘ又は４．０Ｘ）、３０ｍｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２と混合してフラスコ内で実施される。細胞を別の成長チャンバに移すまで培地補充が行われる（一般的に、使用済み培地の２／３の吸引及び等しい体積の新鮮培地での置換による、２／３の培地補充）。別の成長チャンバには、以下に更に十分に考察する通りのG-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０４６５】

［00717］一部の実施形態において、第２の急速拡大培養（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で考察されるように、７～１０日間である。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養（ＲＥＰプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、実施例及び図で考察されるように、７～９日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は７日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は８日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は９日間である。一部の実施形態において、第２の拡大培養は１０日間である。

【０４６６】

［00718］一実施形態において、第２の拡大培養（これはＲＥＰと称される拡大培養；並びに図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤに参照されるものを含み得る）は、１００ｃｍガス透過性シリコン底の５００ｍＬ容量ガス透過性フラスコ（G-Rex 100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation、New Brighton, MN, USAから市販されている）において実施され得、５％ヒトＡＢ血清、３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２及び３０ｎｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を補充した４００ｍＬの５０／５０培地中で５×１０^{6}又は１０×１０^{6}個のＴＩＬをＰＢＭＣと培養し得る。G-Rex 100フラスコは５％CO_2下３７℃でインキュベートし得る。５日目、２５０ｍＬの上清を取り出して遠心ボトルに入れ、１５００ｒｐｍ（４９１×ｇ）で１０分間遠心し得る。５％ヒトＡＢ血清、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含む１５０ｍＬの新鮮培地にＴＩＬペレットを再懸濁し、元のGREX-100フラスコに戻し加え得る。GREX-100フラスコでＴＩＬを連続的に拡大培養する場合、１０又は１１日目に、ＴＩＬは、GREX-500などのより大きいフラスコに移動され得る。細胞は培養１４日目に回収し得る。細胞は培養１５日目に回収し得る。細胞は培養１６日目に回収し得る。一部の実施形態において、細胞が別の成長チャンバに移されるまで培地交換が行われる。一部の実施形態において、培地の２／３は、使用済み培地の吸引及び等しい体積の新鮮培地での置換によって置き換えられる。一部の実施形態におい

て、別の成長チャンバには、以下に更に十分に考察する通りのGREXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【０４６７】

［00719］一実施形態において、第２の急速拡大培養（ＲＥＰと称される拡大培養を含む）が実施され、これは優れた腫瘍応答性に関してＴＩＬを選択するステップを更に含む。当該技術分野において公知の任意の選択方法を用いることができる。例えば、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２０１６／００１００５８Ａ１号に記載されている方法は、優れた腫瘍反応性に関するＴＩＬの選択に使用され得る。

【０４６８】

［00720］任意選択で、第２の急速拡大培養（ＲＥＰ拡大培養と称される拡大培養を含む）後、当該技術分野において公知の標準アッセイを用いて細胞生存率アッセイを実施することができる。例えば、バルクＴＩＬのサンプルに対してトリパンブルー色素排除アッセイを行うことができ、これは死細胞を選択的に標識して生存率の評価を可能にするものである。一部の実施形態において、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience、Lawrence, MA）を使用してＴＩＬサンプルをカウントし、生存率を決定することができる。一部の実施形態において、生存率は、標準的なCellometer K2 Image Cytometer自動セルカウンタープロトコルに従い決定される。

【０４６９】

［00721］Ｔ及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られてい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（結合）及びＣ（定数）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側での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法により得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、第２の拡大培養で得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び／又はＴ細胞受容体の多様性の増加である。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン重鎖にある。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン軽鎖にある。一部の実施形態において、多様性はＴ細胞受容体にある。一部の実施形態において、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１つにある。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／又はベータの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。一部の実施形態において、ＴＣＲａｂ（即ちＴＣＲα／β）の発現が増加する。

【０４７０】

［00722］一部の実施形態において、第２の急速拡大培養培地（例えば、ＣＭ２又は第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下で更に詳細に考察する通り、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３並びに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養培地（例えば、ＣＭ２又は第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下で更に詳細に考察する通り、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇ／フラスコのＯＫＴ－３並びに７．５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養培地（例えば、ＣＭ２又は第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下で更に詳細に考察する通り、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３並びに抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養培地（例えば、ＣＭ２又は第２の細胞培養培地と称されることもある）は、以下で更に詳細に考察する通り、６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２、３０μｇ／フラスコのＯＫＴ－３並びに５×１０^{8}個の抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）を含む。

【０４７１】

［00723］一部の実施形態において、第２の急速拡大培養、例えば、図８５（特に、例

えば図８５Ｂ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、バイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、バイオリアクターが容器として用いられる。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-REX-100又はG-REX-500である。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、G-REX-100である。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、G-REX-500である。

【０４７２】

１．フィーダー細胞及び抗原提示細胞

[00724] 一実施形態において、本明細書に記載の第２の急速拡大培養手順（例えば、図８５（特に例えば図８５Ｂ）のステップＤに記載された拡大培養並びにＲＥＰと称される拡大培養を含む）は、ＲＥＰ　ＴＩＬ拡大培養中及び／又は第２の急速拡大培養中に過剰量のフィーダー細胞が必要である。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、健常供血者からの標準的な全血ユニットから入手される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて入手される。

【０４７３】

[00725] 一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又は熱処理のいずれかにより不活性化され、同種異系ＰＢＭＣの複製能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する実施例に記載されるように、ＲＥＰ手順で使用される。

【０４７４】

[00726] 一部の実施形態において、７又は１４日目の生細胞の総数がＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目に培養（即ち第２の拡大培養の開始日）に移行した初期生細胞数より少ない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められる。

【０４７５】

[00727] 一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、７日目及び１４日目に、ＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に培養に移行した初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められ得る。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、１５ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０４７６】

[00728] 一部の実施形態において、ＯＫＴ３及びＩＬ－２の存在下で培養された生細胞の総数が、７日目及び１４日目に、ＲＥＰの０日目及び／又は第２の拡大培養の０日目（即ち第２の拡大培養の開始日）に培養に移行した初期生細胞数から増加していない場合、ＰＢＭＣは複製不能とみなされ、本明細書に記載のＴＩＬ拡大培養手順での使用が認められ得る。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び１０００～６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～５０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２０００～４０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び２５００～３５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。一部の実施形態

において、ＰＢＭＣは、３０～６０ｎｇ／ｍＬのＯＫＴ３抗体及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２の存在下で培養される。

【０４７７】

[00729] 一部の実施形態において、抗原提示フィーダー細胞はＰＢＭＣである。一部の実施形態において、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。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は、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又は約１：５００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は１：５０～１：３００である。一実施形態において、第２の拡大培養におけるＴＩＬと抗原提示フィーダー細胞との比は１：１００～１：２００である。

【０４７８】

[00730] 一実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約５×10^8個のフィーダー細胞と約１００×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。一実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約７．５×10^8個のフィーダー細胞と約１００×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約５×10^8個のフィーダー細胞と約５０×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。別の実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約７．５×10^8個のフィーダー細胞と約５０×10^6個のＴＩＬの比を必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約５×10^8個のフィーダー細胞から約２５×10^6個のＴＩＬを必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第２の拡大培養手順は、約７．５×10^8個のフィーダー細胞と約２５×10^6個のＴＩＬを必要とする。更に別の実施形態において、第２の急速拡大培養は、第２の急速拡大培養の２倍の数のフィーダー細胞を必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養が約２．５×10^8個のフィーダー細胞を必要とする場合、第２の急速拡大培養は、約５×10^8個のフィーダー細胞を必要とする。更に別の実施形態において、本明細書に記載の第１の初回刺激拡大培養が約２．５×10^8個のフィーダー細胞を必要とする場合、第２の急速拡大培養は、約７．５×10^8個のフィーダー細胞を必要とする。更に別の実施形態において、第２の急速拡大培養は、第１の初回刺激拡大培養の２倍（２．０Ｘ）、２．５Ｘ、３．０Ｘ、３．５Ｘ又は４．０Ｘの数のフィーダー細胞を必要とする。

【０４７９】

[00731] 一実施形態において、本明細書に記載の第２の急速拡大培養手順は、第２の急速拡大培養中に過剰量のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態において、フィーダー細胞は、同種異系健常供血者からの標準的な全血ユニットから入手される末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。ＰＢＭＣは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準方法を用いて入手される。一実施形態において、ＰＢＭＣの代わりに人工抗原提示（ａＡＰＣ）細胞が使用される。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、第１の初回刺激拡大培養に添加されたＰＢＭＣの濃度の２倍で第２の急速拡大培養に添加される。

【０４８０】

[00732] 一般に、同種異系ＰＢＭＣは、照射又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た例示的な手順を含む、本明細書に記載されたＴＩＬ拡大培養手順で使用される。

【０４８１】

[00733] 一実施形態において、人工抗原提示細胞は、ＰＢＭＣの代替として又はそれと組み合わせて、第２の急速拡大培養で使用される。

【０４８２】

２．サイトカイン

[00734] 本明細書に記載の第２の急速拡大培養方法は、一般に、当該技術分野におい

て公知の通り、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。
【０４８３】
［00735］代わりに、ＴＩＬの第２の急速拡大培養にサイトカインの組み合わせを使用することが更に可能であり、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の２つ以上の組み合わせについては、概して国際公開第２０１５／１８９３５６号及び国際公開第２０１５／１８９３５７号（参照により全体として明示的に本明細書に組み込まれる）に概説される通りである。従って、可能な組み合わせとしては、ＩＬ－２とＩＬ－１５、ＩＬ－２とＩＬ－２１、ＩＬ－１５とＩＬ－２１とＩＬ－２、ＩＬ－１５とＩＬ－２１が挙げられ、後者には多くの実施形態において特定の使用が見出される。これらの明細書に記載される通り、サイトカインの組み合わせを使用することは、特にリンパ球、詳細にはＴ細胞の生成に有利である。
【０４８４】
Ｅ．ステップＥ：ＴＩＬの回収
［00736］第２の急速拡大培養ステップ後、細胞は回収することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される通り、１、２、３、４回又はそれ以上の拡大培養ステップ後に回収される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される通り、２つの拡大培養ステップ後に回収される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される通り、２つの拡大培養ステップ（１つの第１の初回刺激拡大培養及び１つの第２の急速拡大培養）後に回収される。
【０４８５】
［00737］ＴＩＬは、例えば遠心によることを含め、任意の適切な且つ無菌の方法で回収することができる。ＴＩＬ回収方法は、当該技術分野において周知であり、本プロセスと共に任意のかかる公知の方法を用いることができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは自動化系を使用して回収される。
【０４８６】
［00738］セルハーベスター及び／又は細胞処理系は、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。任意選択の細胞ベースのハーベスターを本方法で使用することができる。一部の実施形態において、セルハーベスター及び／又は細胞処理系は、膜ベースの細胞ハーベスターである。一部の実施形態において、細胞回収は、LOVO系（Fresenius Kabi製）などの細胞処理系を介して行われる。用語「LOVO細胞処理系」は、滅菌及び／又は閉鎖系環境で、回転膜又は回転フィルターなどの膜又はフィルターを通して細胞を含む溶液を送り出すことができ、ペレット化せず上清又は細胞培地を除去する連続フロー及び細胞処理を可能にする、あらゆる販売業者によって製造された機器又は装置も指す。一部の実施形態において、セルハーベスター及び／又は細胞処理系は、閉鎖、無菌系で細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮及び／又は他の細胞処理ステップを実施することができる。
【０４８７】
［00739］一部の実施形態において、第２の急速拡大培養、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）によるステップＤは、閉鎖系バイオリアクターで実施される。一部の実施形態において、本明細書に記載される通り、ＴＩＬ拡大培養のために閉鎖系が用いられる。一部の実施形態において、バイオリアクターが用いられる。一部の実施形態において、バイオリアクターが容器として用いられる。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-REX-100又はG-REX-500である。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、G-REX-100である。一部の実施形態において、用いられるバイオリアクターは、G-REX-500である。
【０４８８】
［00740］一部の実施形態において、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）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実施される。一部の実施形態において、系の無

菌性及び閉鎖性を維持するために、閉鎖系は滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような閉鎖系が使用される。

【０４８９】

[00741] 一部の実施形態において、本明細書に記載された方法に従ってＴＩＬが回収される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような方法を使用して、１４日目～１６日目にＴＩＬが回収される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような方法を使用して、１４日目にＴＩＬが回収される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような方法を使用して、１５日目にＴＩＬが回収される。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような方法を使用して、１６日目にＴＩＬが回収される。

【０４９０】

Ｆ．ステップＦ：最終的な製剤化／輸注バッグへの移動

[00742] 図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示的順序で提供される通りの、且つ上記及び本明細書に詳細に概説される通りのステップＡ～Ｅが完了した後、細胞は患者への投与における使用のため容器に移される。一部の実施形態において、上記に記載される拡大培養方法を用いて治療上十分な数のＴＩＬが入手されると、ＴＩＬは患者への投与における使用のため容器に移される。

【０４９１】

[00743] 一実施形態において、本開示の方法を使用して拡大培養したＴＩＬは医薬組成物として患者に投与される。一実施形態において、医薬組成物は滅菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本明細書に開示されるように拡大培養したＴＩＬは、当該技術分野において公知の通りの任意の好適な経路によって投与され得る。一部の実施形態において、ＴＩＬは単回動脈内又は静脈内注入として投与され、これは好ましくは約３０～６０分間継続される。他の好適な投与経路としては、腹腔内、髄腔内及びリンパ内が挙げられる。

【０４９２】

[00744] 一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、凍結保存剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、凍結保存剤及び等張剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、ジメチルスルホキシドを含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、ジメチルスルホキシド及びデキストラン４０を含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む組成物として投与され得る。一実施形態において、前述の開示のプロセスを使用して拡大培養されたＴＩＬは、滅菌輸注バッグで送達される組成物として投与され得、そのような組成物は、ジメチルスルホキシド及びデキストラン４０を含む凍結保存剤並びに塩化ナトリウム、グルコン酸ナトリウム及び酢酸ナトリウムを含む等張剤を更に含む。

【０４９３】

Ｇ．ＰＢＭＣフィーダー細胞比

[00745] 一部の実施形態において、本明細書に記載の拡大培養方法（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）を参照されたい）で使用される培養培地は、抗ＣＤ３抗体、例えば、ＯＫＴ－３を含む。抗ＣＤ３抗体をＩＬ－２と併用すると、ＴＩＬ集団においてＴ細胞活性化及び細胞分裂が誘導される。この効果は完全長抗体並びにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が概して好ましい；例えば、Tsoukas et al., J.Immunol. 1985, 135, 1719（参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０４９４】

[00746] 一実施形態において、ＰＢＭＣフィーダー層の数は以下のように計算される。

Ａ．Ｔ細胞の容積（直径１０μｍ）：Ｖ＝（４／３）πｒ^{3}＝５２３．６μｍ^{3}

Ｂ．高さ４０μｍ（４細胞）のG-Rex 100（Ｍ）の円柱フラスコ：Ｖ＝（４／３）πｒ^{3}＝４×１０^{12}μｍ^{3}

Ｃ．円柱フラスコＢを満たすために必要な細胞数：４×１０^{12}μｍ^{3}／５２３．６μｍ^{3}＝７．６×１０^{8}μｍ^{3}＊０．６４＝４．８６×１０^{8}
Ｄ．４Ｄ空間で最適に活性化できる細胞数：４．８６×１０^{8}／２４＝２０．２５×１０^{6}
Ｅ．G-Rex 500に外挿されたフィーダー及びＴＩＬの数：ＴＩＬ：１００×１０^{6}及びフィーダー：２．５×１０^{9}
この計算では、１００ｃｍ^{2}ベースのシリンダー内でＴＩＬを活性化するための正二十面体ジオメトリを提供するために必要な単核細胞の数の概算が使用される。この計算は、ＮＣＩの実験データを厳密に反映したＴ細胞の閾値活性化の約５×１０^{8}の実験結果を導き出す。(1)（Ｃ）乗数（０．６４）は、１９９２年にJaeger及びNagelによって計算された等価球のランダムデータ密度である(2)。（Ｄ）除数２４は、４次元空間の「ニュートン数」(3)で同様のオブジェクトに接触する可能性のある等価球の数である。
(1) Jin, Jianjian, et.al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3):283-292。
(2) Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20; 255(5051):1523-31。
(3) O. R.Musin (2003). “The problem of the twenty-five spheres”. Russ. Math. Surv. 58 (4):794-795。

【０４９５】
[00747] 一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給された抗原提示フィーダー細胞の数は、第２の急速拡大培養中に外因的に供給された抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。特定の実施形態において、方法は、第２の急速拡大培養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において、第１の初回刺激拡大培養を実施することを含む。

【０４９６】
[00748] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給された抗原提示フィーダー細胞（ＡＰＣ）の数は、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数より大きい。

【０４９７】
[00749] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２０：１又は約２０：１の範囲から選択される。

【０４９８】
[00750] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～１０：１又は約１０：１の範囲から選択される。

【０４９９】
[00751] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～９：１又は約９：１の範囲から選択される。

【０５００】
[00752] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～８：１又は約８：１の範囲から選択される。

【０５０１】
[00753] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～７：１又は約７：１の範囲から選択される。

【０５０２】
[00754] 別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣ

の数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～６：１又は約６：１の範囲から選択される。

【０５０３】

［00755］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～５：１又は約５：１の範囲から選択される。

【０５０４】

［00756］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～４：１又は約４：１の範囲から選択される。

【０５０５】

［00757］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～３：１又は約３：１の範囲から選択される。

【０５０６】

［00758］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．９：１又は約２．９：１の範囲から選択される。

【０５０７】

［00759］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．８：１又は約２．８：１の範囲から選択される。

【０５０８】

［00760］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．７：１又は約２．７：１の範囲から選択される。

【０５０９】

［00761］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．６：１又は約２．６：１の範囲から選択される。

【０５１０】

［00762］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．５：１又は約２．５：１の範囲から選択される。

【０５１１】

［00763］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．４：１又は約２．４：１の範囲から選択される。

【０５１２】

［00764］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．３：１又は約２．３：１の範囲から選択される。

【０５１３】

［00765］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．２：１又は約２．２：１の範囲から選択される。

【０５１４】

［00766］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．１：１又は約２．１：１の範囲から選択される。

【０５１５】
［00767］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２：１又は約２：１の範囲から選択される。
【０５１６】
［00768］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～１０：１又は約１０：１の範囲から選択される。
【０５１７】
［00769］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～５：１又は約５：１の範囲から選択される。
【０５１８】
［00770］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～４：１又は約４：１の範囲から選択される。
【０５１９】
［00771］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～３：１又は約３：１の範囲から選択される。
【０５２０】
［00772］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．９：１又は約２．９：１の範囲から選択される。
【０５２１】
［00773］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．８：１又は約２．８：１の範囲から選択される。
【０５２２】
［00774］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．７：１又は約２．７：１の範囲から選択される。
【０５２３】
［00775］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．６：１又は約２．６：１の範囲から選択される。
【０５２４】
［00776］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．５：１又は約２．５：１の範囲から選択される。
【０５２５】
［00777］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．４：１又は約２．４：１の範囲から選択される。
【０５２６】
［00778］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．３：１又は約２．３：１の範囲から選択される。
【０５２７】
［00779］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣ

の数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．２：１又は約２．２：１の範囲から選択される。

【０５２８】

［００７８０］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１～２．１：１又は約２．１：１の範囲から選択される。

【０５２９】

［００７８１］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、２：１又は約２：１である。

【０５３０】

［００７８２］別の実施形態において、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数と、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数との比は、１．１：１若しくは約１．１：１、１．２：１若しくは約１．２：１、１．３：１若しくは約１．３：１、１．４：１若しくは約１．４：１、１．５：１若しくは約１．５：１、１．６：１若しくは約１．６：１、１．７：１若しくは約１．７：１、１．８：１若しくは約１．８：１、１．９：１若しくは約１．９：１、２：１若しくは約２：１、２．１：１若しくは約２．１：１、２．２：１若しくは約２．２：１、２．３：１若しくは約２．３：１、２．４：１若しくは約２．４：１、２．５：１若しくは約２．５：１、２．６：１若しくは約２．６：１、２．７：１若しくは約２．７：１、２．８：１若しくは約２．８：１、２．９：１若しくは約２．９：１、３：１若しくは約３：１、３．１：１若しくは約３．１：１、３．２：１若しくは約３．２：１、３．３：１若しくは約３．３：１、３．４：１若しくは約３．４：１、３．５：１若しくは約３．５：１、３．６：１若しくは約３．６：１、３．７：１若しくは約３．７：１、３．８：１若しくは約３．８：１、３．９：１若しくは約３．９：１、４：１若しくは約４：１、４．１：１若しくは約４．１：１、４．２：１若しくは約４．２：１、４．３：１若しくは約４．３：１、４．４：１若しくは約４．４：１、４．５：１若しくは約４．５：１、４．６：１若しくは約４．６：１、４．７：１若しくは約４．７：１、４．８：１若しくは約４．８：１、４．９：１若しくは約４．９：１又は５：１若しくは約５：１である。

【０５３１】

［００７８３］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に補充されたＡＰＣの数は、1×10^8若しくは約1×10^8、1.1×10^8若しくは約1.1×10^8、1.2×10^8若しくは約1.2×10^8、1.3×10^8若しくは約1.3×10^8、1.4×10^8若しくは約1.4×10^8、1.5×10^8若しくは約1.5×10^8、1.6×10^8若しくは約1.6×10^8、1.7×10^8若しくは約1.7×10^8、1.8×10^8若しくは約1.8×10^8、1.9×10^8若しくは約1.9×10^8、2×10^8若しくは約2×10^8、2.1×10^8若しくは約2.1×10^8、2.2×10^8若しくは約2.2×10^8、2.3×10^8若しくは約2.3×10^8、2.4×10^8若しくは約2.4×10^8、2.5×10^8若しくは約2.5×10^8、2.6×10^8若しくは約2.6×10^8、2.7×10^8若しくは約2.7×10^8、2.8×10^8若しくは約2.8×10^8、2.9×10^8若しくは約2.9×10^8、3×10^8若しくは約3×10^8、3.1×10^8若しくは約3.1×10^8、3.2×10^8若しくは約3.2×10^8、3.3×10^8若しくは約3.3×10^8、3.4×10^8若しくは約3.4×10^8又は3.5×10^8若しくは約3.5×10^8ＡＰＣであり、第２の急速拡大培養中に外因的に補充されたＡＰＣの数は、3.5×10^8若しくは約3.5×10^8、3.6×10^8若しくは約3.6×10^8、3.7×10^8若しくは約3.7×10^8、3.8×10^8若しくは約3.8×10^8、3.9×10^8若しくは約3.9×10^8、4×10^8若しくは約4×10^8、4.1×10^8若しくは約4.1×10^8、4.2×10^8若しくは約4.2×10^8、4.3×10^8若しくは約4.3×10^8、4.4×10^8若しくは約4.4×10^8、4.5×10^8若しくは約4.5×10^8、4.6×10^8若しくは約4.6

×１０^{8}、４．７×１０^{8}若しくは約４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}若しくは約４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}若しくは約４．９×１０^{8}、５×１０^{8}若しくは約５×１０^{8}、５．１×１０^{8}若しくは約５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}若しくは約５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}若しくは約５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}若しくは約５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}若しくは約５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}若しくは約５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}若しくは約５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}若しくは約５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}若しくは約５．９×１０^{8}、６×１０^{8}若しくは約６×１０^{8}、６．１×１０^{8}若しくは約６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}若しくは約６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}若しくは約６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}若しくは約６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}若しくは約６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}若しくは約６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}若しくは約６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}若しくは約６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}若しくは約６．９×１０^{8}、７×１０^{8}若しくは約７×１０^{8}、７．１×１０^{8}若しくは約７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}若しくは約７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}若しくは約７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}若しくは約７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}若しくは約７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}若しくは約７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}若しくは約７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}若しくは約７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}若しくは約７．９×１０^{8}、８×１０^{8}若しくは約８×１０^{8}、８．１×１０^{8}若しくは約８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}若しくは約８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}若しくは約８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}若しくは約８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}若しくは約８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}若しくは約８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}若しくは約８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}若しくは約８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}若しくは約８．９×１０^{8}、９×１０^{8}若しくは約９×１０^{8}、９．１×１０^{8}若しくは約９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}若しくは約９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}若しくは約９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}若しくは約９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}若しくは約９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}若しくは約９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}若しくは約９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}若しくは約９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}若しくは約９．９×１０^{8}又は１×１０^{9}若しくは約１×１０^{9}ＡＰＣである。

【０５３２】

［00784］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数は、１．５×１０^{8}又は約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～３×１０^{8}又は約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数は、４×１０^{8}又は約４×１０^{8}ＡＰＣ～７．５×１０^{8}又は約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０５３３】

［00785］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数は、２×１０^{8}又は約２×１０^{8}ＡＰＣ～２．５×１０^{8}又は約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数は、４．５×１０^{8}又は約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～５．５×１０^{8}又は約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択される。

【０５３４】

［00786］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数は、２．５×１０^{8}又は約２．５×１０^{8}ＡＰＣであり、第２の急速拡大培養中に外因的に供給されたＡＰＣの数は、５×１０^{8}又は約５×１０^{8}ＡＰＣである。

【０５３５】

［00787］一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に添加されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、第１の初回刺激拡大培養の７日目（例えば、方法の７日目）に添加されたＰＢＭＣの数のおよそ半分である。特定の実施形態において、方法は、第１のＴＩＬ集団に第１の初回刺激拡大培養の０日目に抗原提示細胞を追加すること及び第２のＴＩＬ集団に７日目に抗原提示細胞を追加することを含み、ここで、０日目に添加された抗原提示細胞の数は、第１の初回刺激拡大培養の７日目（例えば、方法の７日

目）に添加された抗原提示細胞の数のおよそ５０％である。
【０５３６】
［00788］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＰＢＭＣの数より大きい。
【０５３７】
［00789］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、１．０×１０^{6}又は約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～４．５×１０^{6}又は約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。
【０５３８】
［00790］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、１．５×１０^{6}又は約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３．５×１０^{6}又は約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。
【０５３９】
［00791］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２×１０^{6}又は約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３×１０^{6}又は約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。
【０５４０】
［00792］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２×１０^{6}又は約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０５４１】
［00793］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、１．０×１０^{6}若しくは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}若しくは約１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}若しくは約１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}若しくは約１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}若しくは約１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}若しくは約１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}若しくは約１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}若しくは約１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}若しくは約１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}若しくは約１．９×１０^{6}、２×１０^{6}若しくは約２×１０^{6}、２．１×１０^{6}若しくは約２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}若しくは約２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}若しくは約２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}若しくは約２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}若しくは約２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}若しくは約２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}若しくは約２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}若しくは約２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}若しくは約２．９×１０^{6}、３×１０^{6}若しくは約３×１０^{6}、３．１×１０^{6}若しくは約３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}若しくは約３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}若しくは約３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}若しくは約３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}若しくは約３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}若しくは約３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}若しくは約３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}若しくは約３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}若しくは約３．９×１０^{6}、４×１０^{6}若しくは約４×１０^{6}、４．１×１０^{6}若しくは約４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}若しくは約４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}若しくは約４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}若しくは約４．４×１０^{6}又は４．５×１０^{6}若しくは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。
【０５４２】
［00794］別の実施形態において、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２．５×１０^{6}又は約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～７．５×１０^{6}又は約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。
【０５４３】
［00795］別の実施形態において、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、３．５×１０^{6}又は約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～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。
【０５４４】
［00796］別の実施形態において、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは

、４．０×１０^{6}又は約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～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。

【０５４５】

［00797］別の実施形態において、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、４．０×１０^{6}又は約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。

【０５４６】

［00798］別の実施形態において、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２．５×１０^{6}若しくは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}若しくは約２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}若しくは約２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}若しくは約２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}若しくは約２．９×１０^{6}、３×１０^{6}若しくは約３×１０^{6}、３．１×１０^{6}若しくは約３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}若しくは約３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}若しくは約３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}若しくは約３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}若しくは約３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}若しくは約３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}若しくは約３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}若しくは約３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}若しくは約３．９×１０^{6}、４×１０^{6}若しくは約４×１０^{6}、４．１×１０^{6}若しくは約４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}若しくは約４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}若しくは約４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}若しくは約４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}若しくは約４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}若しくは約４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}若しくは約４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}若しくは約４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}若しくは約４．９×１０^{6}、５×１０^{6}若しくは約５×１０^{6}、５．１×１０^{6}若しくは約５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}若しくは約５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}若しくは約５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}若しくは約５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}若しくは約５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}若しくは約５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}若しくは約５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}若しくは約５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}若しくは約５．９×１０^{6}、６×１０^{6}若しくは約６×１０^{6}、６．１×１０^{6}若しくは約６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}若しくは約６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}若しくは約６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}若しくは約６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}若しくは約６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}若しくは約６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}若しくは約６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}若しくは約６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}若しくは約６．９×１０^{6}、７×１０^{6}若しくは約７×１０^{6}、７．１×１０^{6}若しくは約７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}若しくは約７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}若しくは約７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}若しくは約７．４×１０^{6}又は７．５×１０^{6}若しくは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０５４７】

［00799］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、１．０×１０^{6}若しくは約１．０×１０^{6}、１．１×１０^{6}若しくは約１．１×１０^{6}、１．２×１０^{6}若しくは約１．２×１０^{6}、１．３×１０^{6}若しくは約１．３×１０^{6}、１．４×１０^{6}若しくは約１．４×１０^{6}、１．５×１０^{6}若しくは約１．５×１０^{6}、１．６×１０^{6}若しくは約１．６×１０^{6}、１．７×１０^{6}若しくは約１．７×１０^{6}、１．８×１０^{6}若しくは約１．８×１０^{6}、１．９×１０^{6}若しくは約１．９×１０^{6}、２×１０^{6}若しくは約２×１０^{6}、２．１×１０^{6}若しくは約２．１×１０^{6}、２．２×１０^{6}若しくは約２．２×１０^{6}、２．３×１０^{6}若しくは約２．３×１０^{6}、２．４×１０^{6}若しくは約２．４×１０^{6}、２．５×１０^{6}若しくは約２．５×１０^{6}、２．６×１０^{6}若しくは約２．６×１０^{6}、２．７×１０^{6}若しくは約２．７×１０^{6}、２．８×１０^{6}若しくは約２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}若しくは約２．９×１０^{6}、３×１０^{6}若しくは約３×１０^{6}、３．１×１０^{6}若しくは約３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}若しくは約３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}若しくは約３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}若しくは約３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}若しくは約３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}若しくは約３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}若しくは約３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}若しくは約３．８×１０^{6}

、３．９×１０^{6}若しくは約３．９×１０^{6}、４×１０^{6}若しくは約４×１０^{6}、４．１×１０^{6}若しくは約４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}若しくは約４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}若しくは約４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}若しくは約４．４×１０^{6}又は４．５×１０^{6}若しくは約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２．５×１０^{6}若しくは約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．６×１０^{6}若しくは約２．６×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．７×１０^{6}若しくは約２．７×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}、２．８×１０^{6}若しくは約２．８×１０^{6}、２．９×１０^{6}若しくは約２．９×１０^{6}、３×１０^{6}若しくは約３×１０^{6}、３．１×１０^{6}若しくは約３．１×１０^{6}、３．２×１０^{6}若しくは約３．２×１０^{6}、３．３×１０^{6}若しくは約３．３×１０^{6}、３．４×１０^{6}若しくは約３．４×１０^{6}、３．５×１０^{6}若しくは約３．５×１０^{6}、３．６×１０^{6}若しくは約３．６×１０^{6}、３．７×１０^{6}若しくは約３．７×１０^{6}、３．８×１０^{6}若しくは約３．８×１０^{6}、３．９×１０^{6}若しくは約３．９×１０^{6}、４×１０^{6}若しくは約４×１０^{6}、４．１×１０^{6}若しくは約４．１×１０^{6}、４．２×１０^{6}若しくは約４．２×１０^{6}、４．３×１０^{6}若しくは約４．３×１０^{6}、４．４×１０^{6}若しくは約４．４×１０^{6}、４．５×１０^{6}若しくは約４．５×１０^{6}、４．６×１０^{6}若しくは約４．６×１０^{6}、４．７×１０^{6}若しくは約４．７×１０^{6}、４．８×１０^{6}若しくは約４．８×１０^{6}、４．９×１０^{6}若しくは約４．９×１０^{6}、５×１０^{6}若しくは約５×１０^{6}、５．１×１０^{6}若しくは約５．１×１０^{6}、５．２×１０^{6}若しくは約５．２×１０^{6}、５．３×１０^{6}若しくは約５．３×１０^{6}、５．４×１０^{6}若しくは約５．４×１０^{6}、５．５×１０^{6}若しくは約５．５×１０^{6}、５．６×１０^{6}若しくは約５．６×１０^{6}、５．７×１０^{6}若しくは約５．７×１０^{6}、５．８×１０^{6}若しくは約５．８×１０^{6}、５．９×１０^{6}若しくは約５．９×１０^{6}、６×１０^{6}若しくは約６×１０^{6}、６．１×１０^{6}若しくは約６．１×１０^{6}、６．２×１０^{6}若しくは約６．２×１０^{6}、６．３×１０^{6}若しくは約６．３×１０^{6}、６．４×１０^{6}若しくは約６．４×１０^{6}、６．５×１０^{6}若しくは約６．５×１０^{6}、６．６×１０^{6}若しくは約６．６×１０^{6}、６．７×１０^{6}若しくは約６．７×１０^{6}、６．８×１０^{6}若しくは約６．８×１０^{6}、６．９×１０^{6}若しくは約６．９×１０^{6}、７×１０^{6}若しくは約７×１０^{6}、７．１×１０^{6}若しくは約７．１×１０^{6}、７．２×１０^{6}若しくは約７．２×１０^{6}、７．３×１０^{6}若しくは約７．３×１０^{6}、７．４×１０^{6}若しくは約７．４×１０^{6}又は７．５×１０^{6}若しくは約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０５４８】

［00800］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、１．０×１０^{6}又は約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～４．５×１０^{6}又は約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、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２．５×１０^{6}又は約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～７．５×１０^{6}又は約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。

【０５４９】

［00801］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、１．５×１０^{6}又は約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３．５×１０^{6}又は約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、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、３．５×１０^{6}又は約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～６×１０^{6}又は約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。

【０５５０】

［00802］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２×１０^{6}又は約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３×１０^{6}又は約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、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、４×１０^{6}又は約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～５．５×１０^{6}又は約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。

【０５５１】

［00803］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、２×１０^{6}又は約２×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種され、第２の急速拡大培養で外因的に供給されたＡＰＣは、４×１０^{6}又は約４×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の密度で培養フラスコに播種される。

【０５５２】

［00804］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＰＢＭＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２０：１又は約２０：１の範囲から選択される。

【０５５３】

［00805］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＰＢＭＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～１０：１又は約１０：１の範囲から選択される。

【０５５４】

［00806］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＰＢＭＣの数との比は、１．１：１又は約１．１：１～９：１又は約９：１の範囲から選択される。

【０５５５】

［00807］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～８：１又は約８：１の範囲から選択される。

【０５５６】

［00808］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～７：１又は約７：１の範囲から選択される。

【０５５７】

［00809］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～６：１又は約６：１の範囲から選択される。

【０５５８】

［00810］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～５：１又は約５：１の範囲から選択される。

【０５５９】

［00811］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～４：１又は約４：１の範囲から選択される。

【０５６０】

［00812］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：

１～３：１又は約３：１の範囲から選択される。
【０５６１】
［００８１３］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．９：１又は約２．９：１の範囲から選択される。
【０５６２】
［００８１４］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．８：１又は約２．８：１の範囲から選択される。
【０５６３】
［００８１５］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．７：１又は約２．７：１の範囲から選択される。
【０５６４】
［００８１６］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．６：１又は約２．６：１の範囲から選択される。
【０５６５】
［００８１７］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．５：１又は約２．５：１の範囲から選択される。
【０５６６】
［００８１８］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．４：１又は約２．４：１の範囲から選択される。
【０５６７】
［００８１９］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．３：１又は約２．３：１の範囲から選択される。
【０５６８】
［００８２０］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．２：１又は約２．２：１の範囲から選択される。
【０５６９】
［００８２１］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：１～２．１：１又は約２．１：１の範囲から選択される。
【０５７０】
［００８２２］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１又は約１．１：

１～２：１又は約２：１の範囲から選択される。
【０５７１】
［00823］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～１０：１又は約１０：１の範囲から選択される。
【０５７２】
［00824］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～５：１又は約５：１の範囲から選択される。
【０５７３】
［00825］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～４：１又は約４：１の範囲から選択される。
【０５７４】
［00826］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～３：１又は約３：１の範囲から選択される。
【０５７５】
［00827］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．９：１又は約２．９：１の範囲から選択される。
【０５７６】
［00828］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．８：１又は約２．８：１の範囲から選択される。
【０５７７】
［00829］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．７：１又は約２．７：１の範囲から選択される。
【０５７８】
［00830］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．６：１又は約２．６：１の範囲から選択される。
【０５７９】
［00831］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．５：１又は約２．５：１の範囲から選択される。
【０５８０】
［00832］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．

４：１又は約２．４：１の範囲から選択される。
【０５８１】
［00833］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．３：１又は約２．３：１の範囲から選択される。
【０５８２】
［00834］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．２：１又は約２．２：１の範囲から選択される。
【０５８３】
［00835］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１～２．１：１又は約２．１：１の範囲から選択される。
【０５８４】
［00836］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、２：１又は約２：１である。
【０５８５】
［00837］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数と、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数との比は、１．１：１若しくは約１．１：１、１．２：１若しくは約１．２：１、１．３：１若しくは約１．３：１、１．４：１若しくは約１．４：１、１．５：１若しくは約１．５：１、１．６：１若しくは約１．６：１、１．７：１若しくは約１．７：１、１．８：１若しくは約１．８：１、１．９：１若しくは約１．９：１、２：１若しくは約２：１、２．１：１若しくは約２．１：１、２．２：１若しくは約２．２：１、２．３：１若しくは約２．３：１、２．４：１若しくは約２．４：１、２．５：１若しくは約２．５：１、２．６：１若しくは約２．６：１、２．７：１若しくは約２．７：１、２．８：１若しくは約２．８：１、２．９：１若しくは約２．９：１、３：１若しくは約３：１、３．１：１若しくは約３．１：１、３．２：１若しくは約３．２：１、３．３：１若しくは約３．３：１、３．４：１若しくは約３．４：１、３．５：１若しくは約３．５：１、３．６：１若しくは約３．６：１、３．７：１若しくは約３．７：１、３．８：１若しくは約３．８：１、３．９：１若しくは約３．９：１、４：１若しくは約４：１、４．１：１若しくは約４．１：１、４．２：１若しくは約４．２：１、４．３：１若しくは約４．３：１、４．４：１若しくは約４．４：１、４．５：１若しくは約４．５：１、４．６：１若しくは約４．６：１、４．７：１若しくは約４．７：１、４．８：１若しくは約４．８：１、４．９：１若しくは約４．９：１又は５：１若しくは約５：１である。
【０５８６】
［00838］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に補充されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、1×10^8若しくは約1×10^8、1.1×10^8若しくは約1.1×10^8、1.2×10^8若しくは約1.2×10^8、1.3×10^8若しくは約1.3×10^8、1.4×10^8若しくは約1.4×10^8、1.5×10^8若しくは約1.5×10^8、1.6×10^8若しくは約1.6×10^8、1.7×10^8若しくは約1.7×10^8、1.8×10^8若しくは約1.8×10^8、1.9×10^8若しくは約1.9×10^8、2×10^8若しくは約2×10^8、2.1×10^8若しくは約2.1×10^8、2.2×10^8若しくは約2.2×10^8、2.3×10^8若しくは約2.3×10^8、2.4×10^8若しくは約2.4×10^8、2.5×10^8若しくは約２

．５×１０^{8}、２．６×１０^{8}若しくは約２．６×１０^{8}、２．７×１０^{8}若しくは約２．７×１０^{8}、２．８×１０^{8}若しくは約２．８×１０^{8}、２．９×１０^{8}若しくは約２．９×１０^{8}、３×１０^{8}若しくは約３×１０^{8}、３．１×１０^{8}若しくは約３．１×１０^{8}、３．２×１０^{8}若しくは約３．２×１０^{8}、３．３×１０^{8}若しくは約３．３×１０^{8}、３．４×１０^{8}若しくは約３．４×１０^{8}又は３．５×１０^{8}若しくは約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に補充されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、３．５×１０^{8}若しくは約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}若しくは約３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}若しくは約３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}若しくは約３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}若しくは約３．９×１０^{8}、４×１０^{8}若しくは約４×１０^{8}、４．１×１０^{8}若しくは約４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}若しくは約４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}若しくは約４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}若しくは約４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}若しくは約４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}若しくは約４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}若しくは約４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}若しくは約４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}若しくは約４．９×１０^{8}、５×１０^{8}若しくは約５×１０^{8}、５．１×１０^{8}若しくは約５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}若しくは約５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}若しくは約５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}若しくは約５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}若しくは約５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}若しくは約５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}若しくは約５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}若しくは約５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}若しくは約５．９×１０^{8}、６×１０^{8}若しくは約６×１０^{8}、６．１×１０^{8}若しくは約６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}若しくは約６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}若しくは約６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}若しくは約６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}若しくは約６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}若しくは約６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}若しくは約６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}若しくは約６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}若しくは約６．９×１０^{8}、７×１０^{8}若しくは約７×１０^{8}、７．１×１０^{8}若しくは約７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}若しくは約７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}若しくは約７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}若しくは約７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}若しくは約７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}若しくは約７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}若しくは約７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}若しくは約７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}若しくは約７．９×１０^{8}、８×１０^{8}若しくは約８×１０^{8}、８．１×１０^{8}若しくは約８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}若しくは約８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}若しくは約８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}若しくは約８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}若しくは約８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}若しくは約８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}若しくは約８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}若しくは約８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}若しくは約８．９×１０^{8}、９×１０^{8}若しくは約９×１０^{8}、９．１×１０^{8}若しくは約９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}若しくは約９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}若しくは約９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}若しくは約９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}若しくは約９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}若しくは約９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}若しくは約９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}若しくは約９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}若しくは約９．９×１０^{8}又は１×１０^{9}若しくは約１×１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０５８７】

［00839］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、１×１０^{8}又は約１×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～３．５×１０^{8}又は約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、３．５×１０^{8}又は約３．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～１×１０^{9}又は約１×１０^{9}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０５８８】

［00840］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、１．５×１０^{8}又は約１．５×１０^{8}Ａ

ＰＣ～３×１０^{8}又は約３×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、４×１０^{8}又は約４×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～７．５×１０^{8}又は約７．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０５８９】

［00841］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、２×１０^{8}又は約２×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～２．５×１０^{8}又は約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択され、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、４．５×１０^{8}又は約４．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）～５．５×１０^{8}又は約５．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の範囲から選択される。

【０５９０】

［00842］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、２．５×１０^{8}又は約２．５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）であり、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の数は、５×１０^{8}又は約５×１０^{8}ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）である。

【０５９１】

［00843］一実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目に添加されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層数は、第２の急速拡大培養の７日目に添加されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層数のおよそ半分である。一定の実施形態において、方法は、第１のＴＩＬ集団に第１の初回刺激拡大培養の０日目に抗原提示細胞層を追加すること及び第２のＴＩＬ集団に７日目に抗原提示細胞層を追加することを含み、ここで、０日目に添加された抗原提示細胞層の数は、７日目に添加された抗原提示細胞層の数のおよそ５０％である。

【０５９２】

［00844］別の実施形態において、第２の急速拡大培養の７日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層数は、第１の初回刺激拡大培養の０日目に外因的に供給されたＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の層数より大きい。

【０５９３】

［00845］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、２又は約２細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、４又は約４細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。

【０５９４】

［00846］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、１又は約１細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、３又は約３細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。

【０５９５】

［00847］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、１．５又は約１．５細胞層～２．５又は約２．５細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、３又は約３細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。

【０５９６】

［00848］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、１又は約１細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、２又は約２細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。

【０５９７】
［00849］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、１若しくは約１、１．１若しくは約１．１、１．２若しくは約１．２、１．３若しくは約１．３、１．４若しくは約１．４、１．５若しくは約１．５、１．６若しくは約１．６、１．７若しくは約１．７、１．８若しくは約１．８、１．９若しくは約１．９、２若しくは約２、２．１若しくは約２．１、２．２若しくは約２．２、２．３若しくは約２．３、２．４若しくは約２．４、２．５若しくは約２．５、２．６若しくは約２．６、２．７若しくは約２．７、２．８若しくは約２．８、２．９若しくは約２．９又は３若しくは約３細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、３．１若しくは約３．１、３．２若しくは約３．２、３．３若しくは約３．３、３．４若しくは約３．４、３．５若しくは約３．５、３．６若しくは約３．６、３．７若しくは約３．７、３．８若しくは約３．８、３．９若しくは約３．９、４若しくは約４、４．１若しくは約４．１、４．２若しくは約４．２、４．３若しくは約４．３、４．４若しくは約４．４、４．５若しくは約４．５、４．６若しくは約４．６、４．７若しくは約４．７、４．８若しくは約４．８、４．９若しくは約４．９、５若しくは約５、５．１若しくは約５．１、５．２若しくは約５．２、５．３若しくは約５．３、５．４若しくは約５．４、５．５若しくは約５．５、５．６若しくは約５．６、５．７若しくは約５．７、５．８若しくは約５．８、５．９若しくは約５．９、６若しくは約６、６．１若しくは約６．１、６．２若しくは約６．２、６．３若しくは約６．３、６．４若しくは約６．４、６．５若しくは約６．５、６．６若しくは約６．６、６．７若しくは約６．７、６．８若しくは約６．８、６．９若しくは約６．９、７若しくは約７、７．１若しくは約７．１、７．２若しくは約７．２、７．３若しくは約７．３、７．４若しくは約７．４、７．５若しくは約７．５、７．６若しくは約７．６、７．７若しくは約７．７、７．８若しくは約７．８、７．９若しくは約７．９又は８若しくは約８細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。
【０５９８】
［00850］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、１又は約１細胞層～２又は約２細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、３又は約３細胞層～１０又は約１０細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。
【０５９９】
［00851］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、２又は約２細胞層～３又は約３細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、４又は約４細胞層～８又は約８細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。
【０６００】
［00852］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、２又は約２細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、４又は約４細胞層～８又は約８細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。
【０６０１】
［00853］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、１若しくは約１、２若しくは約２又は３若しくは約３細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９又は１０若しくは約１０細胞層の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われる。
【０６０２】
［00854］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば

、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：１０又は約１：１０の範囲から選択される。

【０６０３】

［００８５５］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：８又は約１：８の範囲から選択される。

【０６０４】

［００８５６］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：７又は約１：７の範囲から選択される。

【０６０５】

［００８５７］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：６又は約１：６の範囲から選択される。

【０６０６】

［００８５８］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：５又は約１：５の範囲から選択される。

【０６０７】

［００８５９］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：４又は約１：４の範囲から選択される。

【０６０８】

［００８６０］ 別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、

ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：３又は約１：３の範囲から選択される。

【０６０９】

［00861］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：２又は約１：２の範囲から選択される。

【０６１０】

［00862］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．２又は約１：１．２～１：８又は約１：８の範囲から選択される。

【０６１１】

［00863］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．３又は約１：１．３～１：７又は約１：７の範囲から選択される。

【０６１２】

［00864］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．４又は約１：１．４～１：６又は約１：６の範囲から選択される。

【０６１３】

［00865］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．５又は約１：１．５～１：５又は約１：５の範囲から選択される。

【０６１４】

［00866］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．６又は約

１：１．６～１：４又は約１：４の範囲から選択される。
【０６１５】
［00867］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．７又は約１：１．７～１：３．５又は約１：３．５の範囲から選択される。
【０６１６】
［00868］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．８又は約１：１．８～１：３又は約１：３の範囲から選択される。
【０６１７】
［00869］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．９又は約１：１．９～１：２．５又は約１：２．５の範囲から選択される。
【０６１８】
［00870］別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：２又は約１：２である。
【０６１９】
別の実施形態において、第１の初回刺激拡大培養の０日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と等しい第１の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、第２の急速拡大培養の７日目は、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数と等しい第２の厚さ平均を有する層状ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の存在下で行われ、ここで、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第１の層数と、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣを含む）の第２の層数との比は、１：１．１若しくは約１：１．１、１：１．２若しくは約１：１．２、１：１．３若しくは約１：１．３、１：１．４若しくは約１：１．４、１：１．５若しくは約１：１．５、１：１．６若しくは約１：１．６、１：１．７若しくは約１：１．７、１：１．８若しくは約１：１．８、１：１．９若しくは約１：１．９、１：２若しくは約１：２、１：２．１若しくは約１：２．１、１：２．２若しくは約１：２．２、１：２．３若しくは約１：２．３、１：２．４若しくは約１：２．４、１：２．５若しくは約１：２．５、１：２．６若しくは約１：２．６、１：２．７若しくは約１：２．７、１：２．８若しくは約１：２．８、１：２．９若しくは約１：２．９、１：３若しくは約１：３、１：３．１若しくは約１：３．１、１：３．２若しくは約１：３．２、１：３．３若しくは約１：３．３、１：３．４若しくは約１：３．４、１：３．５若しくは約１：３．５、１：３．６若しくは約１：３．６、１：３．７

若しくは約１：３．７、１：３．８若しくは約１：３．８、１：３．９若しくは約１：３．９、１：４若しくは約１：４、１：４．１若しくは約１：４．１、１：４．２若しくは約１：４．２、１：４．３若しくは約１：４．３、１：４．４若しくは約１：４．４、１：４．５若しくは約１：４．５、１：４．６若しくは約１：４．６、１：４．７若しくは約１：４．７、１：４．８若しくは約１：４．８、１：４．９若しくは約１：４．９、１：５若しくは約１：５、１：５．１若しくは約１：５．１、１：５．２若しくは約１：５．２、１：５．３若しくは約１：５．３、１：５．４若しくは約１：５．４、１：５．５若しくは約１：５．５、１：５．６若しくは約１：５．６、１：５．７若しくは約１：５．７、１：５．８若しくは約１：５．８、１：５．９若しくは約１：５．９、１：６若しくは約１：６、１：６．１若しくは約１：６．１、１：６．２若しくは約１：６．２、１：６．３若しくは約１：６．３、１：６．４若しくは約１：６．４、１：６．５若しくは約１：６．５、１：６．６若しくは約１：６．６、１：６．７若しくは約１：６．７、１：６．８若しくは約１：６．８、１：６．９若しくは約１：６．９、１：７若しくは約１：７、１：７．１若しくは約１：７．１、１：７．２若しくは約１：７．２、１：７．３若しくは約１：７．３、１：７．４若しくは約１：７．４、１：７．５若しくは約１：７．５、１：７．６若しくは約１：７．６、１：７．７若しくは約１：７．７、１：７．８若しくは約１：７．８、１：７．９若しくは約１：７．９、１：８若しくは約１：８、１：８．１若しくは約１：８．１、１：８．２若しくは約１：８．２、１：８．３若しくは約１：８．３、１：８．４若しくは約１：８．４、１：８．５若しくは約１：８．５、１：８．６若しくは約１：８．６、１：８．７若しくは約１：８．７、１：８．８若しくは約１：８．８、１：８．９若しくは約１：８．９、１：９若しくは約１：９、１：９．１若しくは約１：９．１、１：９．２若しくは約１：９．２、１：９．３若しくは約１：９．３、１：９．４若しくは約１：９．４、１：９．５若しくは約１：９．５、１：９．６若しくは約１：９．６、１：９．７若しくは約１：９．７、１：９．８若しくは約１：９．８、１：９．９若しくは約１：９．９又は１：１０若しくは約１：１０から選択される。

【０６２０】

Ｖ．任意選択の細胞培地成分

１．抗ＣＤ３抗体

［00871］プロセス２Ａの一部の実施形態において、本明細書に記載の拡大培養方法で使用される培養培地（ＲＥＰと称されるものを含み、例えば、図１を参照されたい）は、抗ＣＤ３抗体も含む。抗ＣＤ３抗体をＩＬ－２と併用すると、ＴＩＬ集団においてＴ細胞活性化及び細胞分裂が誘導される。この効果は完全長抗体並びにＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片で見ることができ、前者が概して好ましい；例えば、Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719（参照により全体として本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【０６２１】

［00872］当業者が理解し得る通り、本発明において使用が見出される好適な抗ヒトＣＤ３抗体は、限定はされないが、ネズミ科動物、ヒト、霊長類、ラット及びイヌ科動物抗体を含めた、様々な哺乳類からの抗ヒトＣＤ３ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含め、幾つも存在する。詳細な実施形態において、ＯＫＴ３抗ＣＤ３抗体が使用される（Ortho-McNeil、Raritan, NJ又はMiltenyi Biotech、Auburn, CAから市販されている）。

【０６２２】

【表６】

表4: ムロモナブのアミノ酸配列（例示的なOKT-3抗体）

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

【０６２３】

２．４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）アゴニスト

［00873］一実施形態において、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、当該技術分野で公知の任意の４－１ＢＢ結合分子であり得る。４－１ＢＢ結合分子は、ヒト又は哺乳類４－１ＢＢに結合できるモノクローナル抗体又は融合タンパク質であり得る。４－１ＢＢアゴニスト又は４－１ＢＢ結合分子は、免疫グロブリン分子の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）又はサブクラスの免疫グロブリン重鎖を含み得る。４－１ＢＢアゴニスト又は４－１ＢＢ結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化又はキメラ抗体並びに抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生される断片、上記のいずれかのエピトープ結合断片及び４－１ＢＢに結合する抗体の操作された形態、例えばｓｃＦｖ分子も含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。一部の実施形態において、本開示の方法及び組成物における使用のための４－１ＢＢアゴニストは、抗４－１ＢＢ抗体、ヒト抗４－１ＢＢ抗体、マウス抗４－１ＢＢ抗体、哺乳動物抗４－１ＢＢ抗体、モノクローナル抗４－１ＢＢ抗体、ポリクローナル抗４－１ＢＢ抗体、キメラ抗４－１ＢＢ抗体、抗４－１ＢＢアドネクチン、抗４－１ＢＢドメイン抗体、単鎖抗４－１ＢＢ断片、重鎖抗４－１ＢＢ断片、軽鎖抗４－１ＢＢ断片、抗４－１ＢＢ融合タンパク質及びそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーを含む。アゴニスト性抗４－１ＢＢ抗体は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677。好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、アゴニスト性、抗４－１ＢＢヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体（即ち単一細胞株に由来する抗体）である。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ＥＵ－１０１（Eutilex Co. Ltd.）、ウトミルマブ若しくはウレルマブ又はそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーである。好ましい一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブ又はウレルマブ又はそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーである。

【０６２４】

［00874］好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニスト又は４－１ＢＢ結合分子は、融合タンパク質でもあり得る。好ましい実施形態において、三量体又は六量体４－１ＢＢアゴニスト（３つ又は６つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体４－１ＢＢアゴニストは、典型的には２つのリガンド結合ドメインを保有するアゴニスト性モノク

ローナル抗体と比較して、優れた受容体（４－１ＢＢＬ）の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、任意選択によりこれらの融合タンパク質の２つ以上を更に連結する、三量体（三価）又は六量体（又は六価）又はそれより大きい融合タンパク質は、例えば、Gieffers, et al., Mol.Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載される。

【０６２５】

［00875］アゴニスト性４－１ＢＢ抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法で４－１ＢＢ抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、例えばＮＫ細胞の細胞傷害性を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制する、アゴニスト性４－１ＢＢモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。

【０６２６】

［00876］一部の実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に結合することを特徴とする。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ヒト４－１ＢＢ（配列番号９）に結合する結合分子である。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、マウス４－１ＢＢ（配列番号１０）に結合する結合分子である。４－１ＢＢアゴニスト又は結合分子が結合する４－１ＢＢ抗原のアミノ酸配列を表ＤＤに概括する。

【０６２７】

【表７】

表5. 4-1BB抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号9 ヒト4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー、 メンバー9 （ヒト（Homo sapiens））	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG CSCRFPEEEE GGCEL	60 120 180 240 255
配列番号10 マウス4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー、 メンバー9 （マウス（Mus musculus））	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS CRCPQEEEGG GGGYEL	60 120 180 240 256

【０６２８】

［00877］一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１００ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約７０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約６０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約５０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約４０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約３０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０６２９】

[00878] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約７．５×１０^{5} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約７．５×１０^{5} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８×１０^{5} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８．５×１０^{5} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９×１０^{5} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９．５×１０^{5} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約１×１０^{6} １／Ｍ・ｓ以上のｋ$_{assoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０６３０】

[00879] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約２×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．１×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．２×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．３×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．４×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．５×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．６×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約２．７×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．８×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２．９×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約３×１０$^{-5}$ １／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０６３１】

[00880] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合するか、又は約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウス４－１ＢＢに結合する、４－１ＢＢアゴニストを含む。

【０６３２】

[00881] 好ましい実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ＰＦ－０５０８２５６６又はＭＯＲ－７４８０としても知られるウトミルマブ又はその断片、誘導体、変異体若しくはバイオシミラーである。ウトミルマブはPfizer, Inc.から入手できる。ウトミルマブは、免疫グロブリンＧ２－ラムダ、抗［ヒト（Homo sapiens）ＴＮＦＲＳＦ９（腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーメンバー９、４－１ＢＢ、Ｔ細胞抗原ＩＬＡ、ＣＤ１３７）］、ヒト（Homo sapiens）（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ＥＥに示す。ウトミルマブは、Ａｓｎ５９及びＡｓｎ２９２のグリコシル化部位；位置２２－９６（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）、１４３－１９９（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）、２５６－３１６（Ｃ$_{H}$２）及び３６２－４２０（Ｃ$_{H}$３）の重鎖内ジスルフィド架橋；位置２２’－８７’（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）及び１３６’－１９５’（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）の軽鎖内ジスルフィド架橋；ＩｇＧ２Ａアイソフォーム位置２１８－２１８、２１９－２１９、２２２－２２２及び２２５－２２５、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム位置２１８－１３０、２１９－２１９、２２２－２２２及び２２５－２２５並びにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム位置２１９－１３０（２）、２２２－２２２及び２２５－２２５の鎖内重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；ＩｇＧ２Ａアイソフォーム位置１３０－２１３’（２）、ＩｇＧ２Ａ／Ｂアイソフォーム位置２１８－２１３’及び１３０－２１３’並びにＩｇＧ２Ｂアイソフォーム位置２１

８－２１３’（２）の鎖内重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブ並びにその変異体及び断片の調製並びに特性は、米国特許第８，８２１，８６７号；第８，３３７，８５０号；及び第９，４６８，６７８号並びに国際公開第２０１２／０３２４３３　Ａ１号に記載され、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウトミルマブの前臨床的特徴は、Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother.2012, 61, 1721-33に記載される。様々な血液学的及び固形腫瘍の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Clinicaltrials.gov識別子ＮＣＴ０２４４４７９３、ＮＣＴ０１３０７２６７、ＮＣＴ０２３１５０６６及びＮＣＴ０２５５４８１２が含まれる。

【０６３３】

［00882］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号１１で示される重鎖及び配列番号１２で示される軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１１及び配列番号１２に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０６３４】

［00883］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号１３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１４に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０６３５】

［00884］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号１５、配列番号１６及び配列番号１７に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号１８、配列番号１９及び配列番号２０に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにそれらの保存的アミノ酸置換を含む。

【０６３６】

［00885］一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含む４－１ＢＢ抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウトミルマブである。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤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／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウトミルマブである。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウトミルマブである。

【０６３７】

【表８】

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（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号11 ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
配列番号12 ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
配列番号13 ウトミルマブの重鎖 可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号14 ウトミルマブの軽鎖 可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
配列番号15 ウトミルマブの重鎖 CDR1	STYWIS	6
配列番号16 ウトミルマブの重鎖 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
配列番号17 ウトミルマブの重鎖 CDR3	RGYGIFDY	8
配列番号18 ウトミルマブの軽鎖 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
配列番号19 ウトミルマブの軽鎖 CDR2	QDKNRPS	7
配列番号20 ウトミルマブの軽鎖 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【０６３８】

［00886］好ましい実施形態において、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又はその断片、誘導体、変異体若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.から入手できる。ウレルマブは、免疫グロブリンＧ

４－カッパ、抗［ヒト（Homo sapiens）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）］、ヒト（Homo sapiens）（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ＥＥに示す。ウレルマブは、位置２９８（及び２９８’’）のＮ－グリコシル化部位；位置２２－９５（V_H－V_L）、１４８－２０４（C_H1－C_L）、２６２－３２２（C_H2）及び３６８－４２６（C_H3）（並びに位置２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６２’’－３２２’’及び３６８’’－４２６’’）の重鎖内ジスルフィド架橋；位置２３’－８８’（V'_H－V'_L）及び１３６’－１９６’（C'_H1－C'_L）（並びに位置２３’’’－８８’’’及び１３６’’’－１９６’’’）の軽鎖内ジスルフィド架橋；位置２２７－２２７’’及び２３０－２３０’’の鎖内重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；並びに位置１３５－２１６’及び１３５’’－２１６’’’の鎖内重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブ並びにその変異体及び断片の調製及び特性は、米国特許第７，２８８，６３８号及び第８，９６２，８０４号に記載され、そ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的及び臨床的特徴は、http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272で入手可能なSegal, et al., Clin.Cancer Res.2016に記載される。様々な血液学的及び固形腫瘍の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Clinicaltrials.gov識別子ＮＣＴ０１７７５６３１、ＮＣＴ０２１１００８２、ＮＣＴ０２２５３９９２及びＮＣＴ０１４７１２１０が含まれる。

【０６３９】

［00887］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号２１で示される重鎖及び配列番号２２で示される軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２１及び配列番号２２に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０６４０】

［00888］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号２３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２４に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０６４１】
［00889］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、それぞれ配列番号２５、配列番号２６及び配列番号２７に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号２８、配列番号２９及び配列番号３０に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。
【０６４２】
［00890］一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含む４－１ＢＢ抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出された４－１ＢＢアゴニスト抗体であり、４－１ＢＢアゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。４－１ＢＢアゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はウレルマブである。
【０６４３】

【表９】

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（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号21 ウレルマブの重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号22 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号23 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24 ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号25 ウレルマブの重鎖 CDR1	GYYWS	5
配列番号26 ウレルマブの重鎖 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
配列番号27 ウレルマブの重鎖 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13
配列番号28 ウレルマブの軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号29 ウレルマブの軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号30 ウレルマブの軽鎖 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【０６４４】

［00891］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、１Ｄ８、３Ｅｌｏｒ、４Ｂ４（BioLegend 309809）、Ｈ４－１ＢＢ－Ｍ１２７（BD Pharmingen 552532）、ＢＢＫ２（Thermo Fisher MS621PABX）、１４５５０１（Leinco Technologies B591）、ＡＴＣＣ番号ＨＢ－１１２４８として寄託され、米国特許第６，９７４，８６３号に開示されている細胞株によって産生される抗体、５Ｆ４（BioLegend 31 1503）、Ｃ６５－４８５（BD Pharmingen 559446）、米国特許出願公開第２００５／００９５２４４号に開示されている抗体、米国特許第７，２８８，６３８号に開示されている抗体（２０Ｈ４．９－ＩｇＧｌ（ＢＭＳ－６６３０３１）など）、同第６，８８７，６７３号に開示されている抗体（４Ｅ９又はＢＭＳ－５５４２７１など）、同第７，２１４，４９３号に開示されている抗体、同第６，３０３，１２１号に開示されている抗体、同第６，５６９，９９７号に開示されている抗体、同第６，９０５，６８５号に開示されている抗体（４Ｅ９又はＢＭＳ－５５４２７１など）、同第６，３６２，３２５号に開示されている抗体（１Ｄ８又はＢＭＳ－４６９４９２；３Ｈ３又はＢＭＳ－４６９４９７；又は３Ｅｌなど）、同第６，９７４，８６３号に開示されている抗体（５３Ａ２など）；同第６，２１０，６６９号に開示されている抗体（１Ｄ８、３Ｂ８又は３Ｅ１など）、同第５，９２８，８９３号に記載されている抗体、同第６，３０３，１２１号に開示されている抗体、同第６，５６９，９９７号に開示されている抗体、国際公開第２０１２／１７７７８８号、同第２０１５／１１９９２３号及び同第２０１０／０４２４３３号に開示されている抗体並びにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体又はバイオシミラー、からなる群から選択され、ここで、前述の特許又は特許出願公開のそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【０６４５】

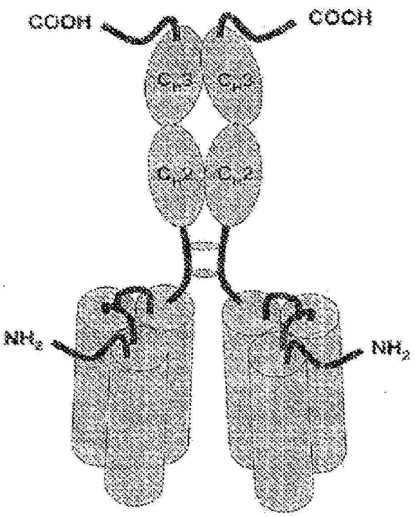
[00892] 一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、国際公開第２００８／０２５５１６　Ａ１号、同第２００９／００７１２０　Ａ１号、同第２０１０／００３７６６　Ａ１号、同第２０１０／０１００５１　Ａ１号及び同第２０１０／０７８９６６　Ａ１号；米国特許出願公開第２０１１／００２７２１８　Ａ１号、同第２０１５／０１２６７０９　Ａ１号、同第２０１１／０１１１４９４　Ａ１号、同第２０１５／０１１０７３４　Ａ１号及び同第２０１５／０１２６７１０　Ａ１号；並びに米国特許第９，３５９，４２０号、同第９，３４０，５９９号、同第８，９２１，５１９号及び同第８，４５０，４６０号に記載されている４－１ＢＢアゴニスト性融合タンパク質であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０６４６】

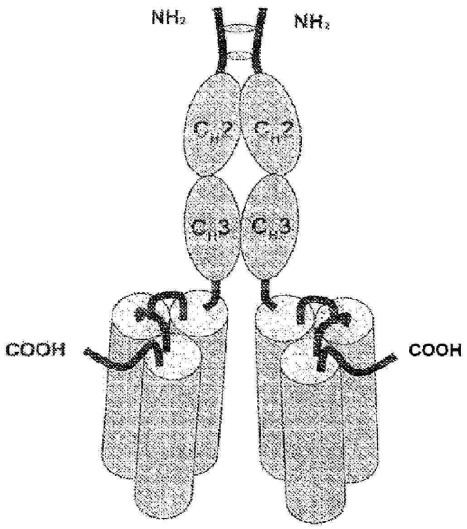
[00893] 一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、構造Ｉ－Ａ（Ｃ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）又は構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示される４－１ＢＢアゴニスト性融合タンパク質又はその断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーである。

【化１】

(I-A)



(I-B)



構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂにおいて、円柱は個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造Ｉ－Ａ及びＩ－Ｂは、例えば、４－１ＢＢＬ又は４－１ＢＢに結合する抗体、に由来する、３つの直鎖状に連結されたＴＮＦＲＳＦ結合ドメインを含み、これは折り畳まれて三価タンパク質を形成し、次いで、ＩｇＧ１－Ｆｃ（C_H3及びC_H2ドメインを含む）を介して第２の三価（triavelent）タンパク質に連結され、次いで、これはジスルフィド結合（小さい細長い楕円形）を介して２つの三価タンパク質を連結するために使用され、構造を安定化し、６つの受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン及びシグナル伝達タンパク質をあわせてシグナル伝達複合体を形成できるアゴニストを提供する。円柱として示されるＴＮＦＲＳＦ結合ドメインは、例えば、親水性残基並びに柔軟性のためのＧｌｙ及びＳｅｒ配列並びに溶解性のためのＧｌｕ及びＬｙｓを含み得るリンカーにより接続されたV_H及びV_L鎖を含む、ｓｃＦｖドメインであり得る。de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44；Ahmad, et al., Clin. & Dev.Immunol.2012, 980250；Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193-208；又は本明細書の別の箇所に組み込まれた参考文献に記載されてい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、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０６４７】

［00894］構造Ｉ－Ａの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表ＧＧに示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全ヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）又はヒンジドメインの一部（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加的ポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。

【０６４８】

【表１０】

表8：C末端Fc抗体断片融合タンパク質設計（構造I-A）を伴う、4-1BB融合タンパク質を含むTNFRSF融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号31 Fcドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号32 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号33 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号34 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号35 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号36 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号37 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号38 リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号39 リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号40 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号41 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【０６４９】

［00895］構造Ｉ－Ｂの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表９に示す。構造Ｉ－ＢのようにＦｃ抗体断片がＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は好ましくは配列番号４２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４３～配列番号４５に示される実施形態から選択される。

【０６５０】

【表１１】

表9：N末端Fc抗体断片融合タンパク質設計（構造I-B）を伴う、4-1BB融合タンパク質を含むTNFRSF融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号42 Fcドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号43 リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号44 リンカー	SSSSSSGSGS GS	12
配列番号45 リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【０６５１】

[00896] 一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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ＧＧに記載されている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、上記の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ並びにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体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。

【０６５２】

[00897] 一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４６による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、可溶性４－１ＢＢＬ配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、配列番号４７による配列を含む１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含む。

【０６５３】

[00898] 一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号１３及び配列番号１４に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号２３及び配列番号２４に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－Ｂによる４－１ＢＢアゴニスト融合タンパク質は、表ＩＩに示されるV_H及びV_L配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上の４－１ＢＢ結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。

【０６５４】

【表１２】

表10：融合タンパク質の4-1BB結合ドメインとして、又はscFv 4-1BBアゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
配列番号47 4-1BBL可溶性ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
配列番号48 4B4-1-1バージョン1の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号49 4B4-1-1バージョン1の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号50 4B4-1-1バージョン2の可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号51 4B4-1-1バージョン2の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号52 H39E3-2の可変重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号53 H39E3-2の可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【０６５５】

［00899］一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加のドメインを更に含み、ここで、追加のドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインである。一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加のドメインを更に含み、ここで、追加のドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインであり、可溶性４－１ＢＢドメインのそれぞれは、ストーク領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一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。

【０６５６】

［00900］一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、ここで、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインのそれぞれは、ストーク領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは、独立して３～８アミノ酸長を有し、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。

【０６５７】

［00901］一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、前述のＶ$_L$ドメインのいず

れかに連結された前述のＶ$_H$ドメインのいずれかを含む４－１ＢＢアゴニスト性ｓｃＦｖ抗体である。

【０６５８】

[00902] 一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、BPS Bioscience４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号７９０９７－２であり、これはBPS Bioscience, San Diego, CA, USAから市販されている。一実施形態において、４－１ＢＢアゴニストは、Creative Biolabs４－１ＢＢアゴニスト抗体カタログ番号ＭＯＭ－１８１７９であり、これはCreative Biolabs, Shirley, NY, USAから市販されている。

【０６５９】

３．ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニスト

[00903] 一実施形態において、ＴＮＦＲＳＦアゴニストは、ＯＸ４０（ＣＤ１３４）アゴニストである。ＯＸ４０アゴニストは、当該技術分野で公知の任意のＯＸ４０結合分子であり得る。ＯＸ４０結合分子は、ヒト又は哺乳類ＯＸ４０に結合できるモノクローナル抗体又は融合タンパク質であり得る。ＯＸ４０アゴニスト又はＯＸ４０結合分子は、免疫グロブリン分子の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）又はサブクラスの免疫グロブリン重鎖を含み得る。ＯＸ４０アゴニスト又は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、ヒト化又はキメラ抗体並びに抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生される断片、上記のいずれかのエピトープ結合断片及び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。一実施形態において、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。一実施形態において、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。一部の実施形態において、本開示の方法及び組成物における使用のためのＯＸ４０アゴニストは、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、単鎖抗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、コンジュゲート、変異体若しくはバイオシミラーを含む。好ましい実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、アゴニスト性、抗ＯＸ４０ヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体（即ち単一細胞株に由来する抗体）である。

【０６６０】

[00904] 好ましい実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト又はＯＸ４０結合分子は、融合タンパク質でもあり得る。ＯＸ４０Ｌに融合した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。好ましい実施形態において、三量体又は六量体ＯＸ４０アゴニスト（３つ又は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、典型的には２つのリガンド結合ドメインを保有するアゴニスト性モノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（ＯＸ４０Ｌ）の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、任意選択によりこれらの融合タンパク質の２つ以上を更に連結する、三量体（三価）又は六量体（又は六価）又はそれより大きい融合タンパク質は、例えば、Gieffers, et al., Mol.Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載される。

【０６６１】

[00905] アゴニスト性ＯＸ４０抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘発することが知られている。Curti, et al., Cancer Res.2013, 73, 7189-98。好ましい実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、毒性を低減するのに十分な方法でＯＸ４０抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において

、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、例えばＮＫ細胞の細胞傷害性を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、補体依存性細胞毒性（ＣＤＣ）を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｆｃ領域機能性を抑制する、アゴニスト性ＯＸ４０モノクローナル抗体又は融合タンパク質である。

【０６６２】

[00906] 一部の実施形態において、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５４）に結合することを特徴とする。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、ヒトＯＸ４０（配列番号５４）に結合する結合分子である。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、マウスＯＸ４０（配列番号５５）に結合する結合分子である。ＯＸ４０アゴニスト又は結合分子が結合するＯＸ４０抗原のアミノ酸配列を表１１に概括する。

【０６６３】

【表１３】

表11：OX40抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号54 ヒトOX40 （ヒト(Homo sapiens)）	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
配列番号55 マウスOX40 （マウス(Mus musculus)）	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

【０６６４】

[00907] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１００ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約７０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約６０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約５０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約４０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約３０ｐＭ以下のK_Dでヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０６６５】

[00908] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約７．５×10^5 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約７．５×10^5 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８×10^5 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８．５×10^5 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９×10^5 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９．５×10^5 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約１×10^6 １／Ｍ・ｓ以上のk_{assoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０６６６】

[00909] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約２×10^{-5} １／ｓ以下のk_{dissoc}でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．１

×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．２×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．４×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．５×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．６×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約２．７×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．８×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２．９×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約３×１０$^{-5}$　１／ｓ以下のｋ$_{dissoc}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０６６７】

[00910] 一部の実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約１０ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約９ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約８ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約７ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約６ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約５ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約４ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約３ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、約２ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合するか、又は約１ｎＭ以下のＩＣ$_{50}$でヒト又はマウスＯＸ４０に結合する、ＯＸ４０アゴニストを含む。

【０６６８】

[00911] 一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、ＭＥＤＩ０５６２又はＭＥＤＩ－０５６２としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、AstraZeneca, Incの子会社MedImmuneから入手できる。タボリキシズマブは、免疫グロブリンＧ１－カッパ、抗［ヒト（Homo sapiens）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ＫＫに示す。タボリキシズマブは、フコシル化複合二分岐ＣＨＯ型グリカンを伴い位置３０１及び３０１’’のＮ－グリコシル化部位；位置２２－９５（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）、１４８－２０４（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）、２６５－３２５（Ｃ$_{H}$２）及び３７１－４２９（Ｃ$_{H}$３）（並びに位置２２’’－９５’’、１４８’’－２０４’’、２６５’’－３２５’’及び３７１’’－４２９’’）の重鎖内ジスルフィド架；位置２３’－８８’（Ｖ$_{H}$－Ｖ$_{L}$）及び１３４’－１９４’（Ｃ$_{H}$１－Ｃ$_{L}$）（並びに位置２３’’’－８８’’’及び１３４’’’－１９４’’’）の軽鎖内ジスルフィド架橋；位置２３０－２３３及び２３３－２３３’’の鎖内重鎖－重鎖ジスルフィド架橋；並びに位置２２４－２１４’及び２２４’’－２１４’’’の鎖内重鎖－軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍の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Clinicaltrials.gov識別子ＮＣＴ０２３１８３９４及びＮＣＴ０２７０５４８２が含まれる。

【０６６９】

[00912] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号５６で示される重鎖及び配列番号５７で示される軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少な

くとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５６及び配列番号５７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０６７０】

［00913］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号５８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５９に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖ抗体を含む。

【０６７１】

［00914］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６０、配列番号６１及び配列番号６２に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号６３、配列番号６４及び配列番号６５に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０６７２】

［00915］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。

【０６７３】

【表１４】

表12: タボリキシズマブに関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号56 タボリキシズマブの 重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号57 タボリキシズマブの 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号58 タボリキシズマブの 重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
配列番号59 タボリキシズマブの 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号60 タボリキシズマブの 重鎖CDR1	GSFSSGYWN	9
配列番号61 タボリキシズマブの 重鎖CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
配列番号62 タボリキシズマブの 重鎖CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
配列番号63 タボリキシズマブの 軽鎖CDR1	QDISNYLN	8
配列番号64 タボリキシズマブの 軽鎖CDR2	LLIYYTSKLH S	11
配列番号65 タボリキシズマブの 軽鎖CDR3	QQGSALPW	8

【０６７４】

[00916] 一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは１１Ｄ４であり、これはPfizer, Inc.から入手可能な完全ヒト抗体である。１１Ｄ４の調製及び特性は、米国特許第７，９６０，５１５号；同第８，２３６，９３０号；及び同第９，０２８，８２４号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。１１Ｄ４のアミノ酸配列を表１３に示す。

【０６７５】

[00917] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号６６で示される重鎖及び配列番号６７で示される軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少な

くとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６６及び配列番号６７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０６７６】

［00918］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、１１Ｄ４の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号６８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６９に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０６７７】

［00919］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７０、配列番号７１及び配列番号７２に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号７３、配列番号７４及び配列番号７５に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０６７８】

［00920］一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１１Ｄ４である。

【０６７９】

【表１５】

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（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号66 11D4の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号67 11D4の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
配列番号68 11D4の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
配列番号69 11D4の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
配列番号70 11D4の重鎖CDR1	SYSMN	5
配列番号71 11D4の重鎖CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
配列番号72 11D4の重鎖CDR3	ESGWYLFDY	9
配列番号73 11D4の軽鎖CDR1	RASQGISSWL A	11
配列番号74 11D4の軽鎖CDR2	AASSLQS	7
配列番号75 11D4の軽鎖CDR3	QQYNSYPPT	9

【０６８０】

［00921］一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは１８Ｄ８であり、これはPfizer, Inc.から入手可能な完全ヒト抗体である。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、そ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。

【０６８１】

［00922］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号７６で示される重鎖及び配列番号７７で示される軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列を有する重鎖及び軽鎖又は抗原結合断片、Ｆａｂ断片、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、それらの変異体若しくはコンジュゲートを含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７６及び配列番号７７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【０６８２】

[00923] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、１８Ｄ８の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号７８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７９に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０６８３】

[00924] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８０、配列番号８１及び配列番号８２に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号８３、配列番号８４及び配列番号８５に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０６８４】

[00925] 一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤は１８Ｄ８である。

【０６８５】

【表１６】

表14：18D8に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号76 18D8の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号77 18D8の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
配列番号78 18D8の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号79 18D8の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号80 18D8の重鎖CDR1	DYAMH	5
配列番号81 18D8の重鎖CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号82 18D8の重鎖CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号83 18D8の軽鎖CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号84 18D8の軽鎖CDR2	DASNRAT	7
配列番号85 18D8の軽鎖CDR3	QQRSNWPT	8

【０６８６】

[00926] 一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＨｕ１１９－１２２であり、これはGlaxoSmithKline plc.から入手可能なヒト化抗体である。Ｈｕ１１９－１２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号並びに国際公開第２０１２／０２７３２８号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１１９－１２２のアミノ酸配列を表１５に示す。

【０６８７】

[00927] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１１９－１２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号８６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８７に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０６８８】

[00928] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号８８、配列

番号８９及び配列番号９０に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号９１、配列番号９２及び配列番号９３に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０６８９】

［00929］一実施形態において、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。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１１９－１２２である。

【０６９０】

【表１７】

表15：Hu119-122に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号86 Hu119-122の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号87 Hu119-122の軽鎖 可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号88 Hu119-122の重鎖CDR1	SHDMS	5
配列番号89 Hu119-122の重鎖CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号90 Hu119-122の重鎖CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号91 Hu119-122の軽鎖CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号92 Hu119-122の軽鎖CDR2	LASNLES	7
配列番号93 Hu119-122の軽鎖CDR3	QHSRELPLT	9

【０６９１】

［00930］一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＨｕ１０６－２２２であり、これはGlaxoSmithKline PLC.から入手可能なヒト化抗体である。Ｈｕ１０６－２２２の調製及び特性は、米国特許第９，００６，３９９号及び同第９，１６３，０８５号並び

に国際公開第２０１２／０２７３２８号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。Ｈｕ１０６－２２２のアミノ酸配列を表１６に示す。

【０６９２】

［00931］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２の重鎖及び軽鎖ＣＤＲ又は可変領域（ＶＲ）を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は配列番号９４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９５に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９９％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９８％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９７％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９６％同一であるV_H及びV_L領域を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【０６９３】

［00932］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ配列番号９６、配列番号９７及び配列番号９８に記載の配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換並びにそれぞれ配列番号９９、配列番号１００及び配列番号１０１に記載の配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン並びにその保存的アミノ酸置換を含む。

【０６９４】

［00933］一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｈｕ１０６－２２２に関して薬物規制当局によって承認されたＯＸ４０アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。一実施形態において、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤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％又は１００％の配列同一性を有し、参照医薬品又は参照生物学的製剤と比較して１つ以上の翻訳後改変を含む、アミノ酸配列を含むＯＸ４０抗体を含み、ここで、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。一部の実施形態において、１つ以上の翻訳後改変は、グリコシル化、酸化、脱アミド化及び切断の１つ以上から選択される。一部の実施形態において、バイオシミラーは、認可された又は認可のために提出されたＯＸ４０アゴニスト抗体であり、ＯＸ４０アゴニスト抗体は、参照医薬品又は参照生物学的製剤の製剤と異なる製剤で提供され、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。ＯＸ４０アゴニスト抗体は、米国ＦＤＡ及び／又は欧州連合のＥＭＡなどの薬物規制当局によって認可されていることがあり得る。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。一部の実施形態において、バイオシミラーは、１つ以上の賦形剤を更に含む組成物として提供され、ここで、１つ以上の賦形剤は、参照医薬品又は参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同一又は異なっており、参照医薬品又は参照生物学的製剤はＨｕ１０６－２２２である。

【０６９５】

【表１８】

表16: Hu106-222に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(1文字のアミノ酸記号)	
配列番号94 Hu106-222の重鎖 可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号95 Hu106-222の軽鎖 可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号96 Hu106-222の重鎖CDR1	DYSMH	5
配列番号97 Hu106-222の重鎖CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号98 Hu106-222の重鎖CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号99 Hu106-222の軽鎖CDR1	KASQDVSTAV A	11
配列番号100 Hu106-222の軽鎖CDR2	SASYLYT	7
配列番号101 Hu106-222の軽鎖CDR3	QQHYSTPRT	9

【０６９６】

[00934] 一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニスト抗体はＭＥＤＩ６４６９（９Ｂ１２とも称される）である。ＭＥＤＩ６４６９はマウスモノクローナル抗体である。Weinberg, et al., J. Immunother.2006, 29, 575-585。一部の実施形態において、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る抗体であり、その開示は参照により全体として本明細書に組み込まれる。一部の実施形態において、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９のＣＤＲ配列を含む。一部の実施形態において、抗体は、ＭＥＤＩ６４６９の重鎖可変領域配列及び／又は軽鎖可変領域配列を含む。

【０６９７】

[00935] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Ｌ１０６ ＢＤ（Pharmingen Product #340420）である。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（BD Pharmingen Product #340420）のＣＤＲを含む。一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、抗体Ｌ１０６（BD Pharmingen Product #340420）の重鎖可変領域配列及び／又は軽鎖可変領域配列を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＡＣＴ３５（Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号２００７３）である。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、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／又は軽鎖可変領域配列を含む。一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、マウスモノクローナル抗体抗ｍＣＤ１３４／ｍＯＸ４０（クローンＯＸ８６）であり、InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NHから市販されている。

【０６９８】

[00936] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、国際公開第９５／１２６７３号、同第９５／２１９２５号、同第２００６／１２１８１０号、同第２０１２／０２７３２８号、同第２０１３／０２８２３１号、同第２０１３／０３８１９１号及び同第２０１４／１４８８９５号；欧州特許第０６７２１４１号；米国特許出願公開第２０１０／１３６０３０号、同第２０１４／３７７２８４号、同第２０１５／１９０５０６号及び同第２

０１５／１３２２８８号；並びに米国特許第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（２０Ｅ５及び１２Ｈ３を含む）に記載されるＯＸ４０アゴニストから選択され、それぞれの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０６９９】

［00937］一実施形態において、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）又は構造Ｉ－Ｂ（Ｎ末端Ｆｃ抗体断片融合タンパク質）に示されるＯＸ４０アゴニスト性融合タンパク質又はその断片、誘導体、コンジュゲート、変異体若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、上記並びに米国特許第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、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。構造Ｉ－Ａのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表ＧＧに示す。Ｆｃドメインは、好ましくは、完全定常ドメイン（配列番号３１のアミノ酸１７～２３０）、完全ヒンジドメイン（配列番号３１のアミノ酸１～１６）又はヒンジドメインの一部（例えば、配列番号３１のアミノ酸４～１６）を含む。Ｃ末端Ｆｃ抗体を接続するための好ましいリンカーは、追加的ポリペプチドの融合に適したリンカーを含む、配列番号３２～配列番号４１に示される実施形態から選択され得る。同様に、構造Ｉ－Ｂのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表９に示す。構造Ｉ－ＢのようにＦｃ抗体断片がＴＮＲＦＳＦ融合タンパク質のＮ末端に融合される場合、Ｆｃモジュールの配列は好ましくは配列番号４２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４３～配列番号４５に示される実施形態から選択される。

【０７００】

［00938］一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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ＯＯに記載されている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、上記の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ並びにそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、変異体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。

【０７０１】

［00939］一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０２による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又は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。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０３による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、配列番号１０４による配列を含む１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含む。

【０７０２】

［00940］一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号５８及び配列番号５９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号６８及び配列番号６９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ド

メインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号７８及び配列番号７９に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号８６及び配列番号８７に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、それぞれ配列番号９４及び配列番号９５に示される配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。一実施形態において、構造Ｉ－Ａ又はＩ－ＢによるＯＸ４０アゴニスト融合タンパク質は、表１７に示されるV_H及びV_L配列とそれぞれ少なくとも９５％同一であるV_H及びV_L領域を含むｓｃＦｖドメインである１つ以上のＯＸ４０結合ドメインを含み、ここで、V_H及びV_Lドメインはリンカーによって接続されている。

【０７０３】

【表１９】

表17: 融合タンパク質のOX40結合ドメイン（例えば、構造I-A及びI-B）として、又はscFv OX40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（1文字のアミノ酸記号）	
配列番号102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183

【０７０４】

【表２０】

配列番号103 OX40L可溶性ドメイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
配列番号104 OX40L可溶性ドメイン （代替）	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
配列番号105 008の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号106 008の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号107 011の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
配列番号108 011の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
配列番号109 021の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
配列番号110 021の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
配列番号111 023の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
配列番号112 023の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
配列番号113 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号114 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号115 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
配列番号116 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号117 ヒト化抗体の重鎖 可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
配列番号118 ヒト化抗体の重鎖 可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
配列番号119 ヒト化抗体の軽鎖 可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号120 ヒト化抗体の軽鎖 可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号121 ヒト化抗体の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号122 ヒト化抗体の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
配列番号123 ヒト化抗体の軽鎖	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111

【０７０５】

【表２１】

可変領域	
配列番号124 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125 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
配列番号126 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

【０７０６】

[00941] 一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加のドメインを更に含み、ここで、追加のドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインである。一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、Ｎ末端及び／又はＣ末端に追加のドメインを更に含み、ここで、追加のドメインは、Ｆａｂ又はＦｃ断片ドメインであり、可溶性ＯＸ４０結合ドメインのそれぞれは、ストーク領域（三量体化に寄与し、細胞膜まで一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。

【０７０７】

[00942] 一実施形態において、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アゴニスト性単鎖融合ポリペプチドであり、ここで、可溶性ＴＮＦスーパーファミリーサイトカインドメインのそれぞれは、ストーク領域を欠き、第１及び第２のペプチドリンカーは、独立して３～８アミノ酸長を有し、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。

【０７０８】

[00943] 一部の実施形態において、ＯＸ４０アゴニストはＭＥＤＩ６３８３である。ＭＥＤＩ６３８３はＯＸ４０アゴニスト性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。

【０７０９】

[00944] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、前述のV_Lドメインのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのいずれかを含むＯＸ４０アゴニスト性ｓｃＦｖ抗体である。

【０７１０】

[00945] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、Creative BiolabsＯＸ４０アゴニストモノクローナル抗体ＭＯＭ－１８４５５であり、これはCreative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USAから市販されている。

【０７１１】

[00946] 一実施形態において、ＯＸ４０アゴニストは、BioLegend, Inc., San Diego, CA, USAから市販されているＯＸ４０アゴニスト性抗体クローンＢｅｒ－ＡＣＴ３５で

ある。
【０７１２】
ＶＩ．任意選択の細胞生存率分析
［00947］任意選択で、プロセス２Ａ（Ｇｅｎ２）又はＧｅｎ３プロセスのステップＢの第１の拡大培養後、当該技術分野において公知の標準アッセイを用いて細胞生存率アッセイを実施することができる。例えば、バルクＴＩＬのサンプルに対してトリパンブルー色素排除アッセイを行うことができ、これは死細胞を選択的に標識して生存率の評価を可能にするものである。生存率の試験に用いられる他のアッセイとしては、限定はされないが、アラマーブルーアッセイ；及びＭＴＴアッセイを挙げることができる。
【０７１３】
１．細胞数、生存率、フローサイトメトリー
［00948］プロセス２Ａ（Ｇｅｎ２）又はＧｅｎ３の一部の実施形態において、細胞数及び／又は生存率が測定される。限定はされないが、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８及びＣＤ５６などのマーカー並びに本明細書に開示又は記載される任意の他のものの発現を抗体によるフローサイトメトリー、例えば限定はされないが、FACSCanto（商標）フローサイトメーター（BD Biosciences）を使用してBD Bio-sciences（BD Biosciences、San Jose, CA）から市販されているものによって測定することができる。細胞は、ディスポーザブルc-chip血球計算盤（VWR、Batavia, IL）を使用して手動でカウントすることができ、及び生存率は、限定はされないがトリパンブルー染色を含め、当該技術分野において公知の任意の方法を用いて評価することができる。プロセス２Ａ（Ｇｅｎ２）及び／又はＧｅｎ３の一部の実施形態において、ＴＩＬは、第１の拡大培養、第２の拡大培養、第１の初回刺激拡大培養又は第２の急速拡大培養のいずれかの後、ＣＤ８＋細胞の増加を示す。プロセス２Ａ（Ｇｅｎ２）の一部の実施形態において、ＴＩＬは、第１の拡大培養及び／又は第２の拡大培養のいずれかの後、ＣＤ８＋細胞の増加を示す。Ｇｅｎ３の一部の実施形態において、ＴＩＬは、第１の初回刺激拡大培養又は第２の急速拡大培養後、ＣＤ８＋細胞の増加を示す。
【０７１４】
［00949］ある場合には、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察するプロトコルを用いて直ちに凍結保存することができる。代わりに、バルクＴＩＬ集団は、以下で考察する通り、ＲＥＰに供し、次に凍結保存することができる。同様に、療法において遺伝子修飾ＴＩＬが使用されることになる場合、バルク又はＲＥＰ　ＴＩＬ集団を好適な処置のための遺伝子修飾に供することができる。
【０７１５】
２．細胞培養
［00950］一実施形態において、ＴＩＬの拡大培養方法は、約５，０００ｍＬ～約２５，０００ｍＬの細胞培地、約５，０００ｍＬ～約１０，０００ｍＬの細胞培地又は約５，８００ｍＬ～約８，７００ｍＬの細胞培地を使用することを含み得る。一実施形態において、ＴＩＬ数の拡大には１種類以下の細胞培養培地が使用される。任意の好適な細胞培養培地は、例えば、AIM-V細胞培地（Ｌ－グルタミン、５０μＭ硫酸ストレプトマイシン及び１０μＭ硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Invitrogen、Carlsbad CA）を使用し得る。この点に関して、本発明の方法では有利には、ＴＩＬ数の拡大に必要な培地の量及び培地の種類の数が減少する。一実施形態において、ＴＩＬ数の拡大は、２日又は３日おき以下の頻度で細胞に新鮮細胞培養培地を加える（細胞をフィードするとも称される）ことを含み得る。ガス透過性容器内の細胞数を増やすことは、細胞を拡大培養するのに必要なフィード頻度を減らすことによって細胞数を増やすのに必要な手順を単純化する。
【０７１６】
［00951］一実施形態において、第１及び／又は第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、細胞数を拡大培養させるために必要な手順を単純化し得る。一実施形態において、第１及び／又は第２のガス透過性容器内の細胞培地は、ベータ－メルカプトエタノール（ＢＭＥ）を欠いている。

【０７１７】
［00952］一実施形態において、ＴＩＬはガス透過性容器内で拡大培養する。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第２００５／０１０６７１７　Ａ１号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものを含め、当該技術分野において公知の方法、組成物及び装置を用いたＰＢＭＣを使用したＴＩＬの拡大培養に用いられている。一実施形態において、ＴＩＬはガス透過性バッグ内で拡大培養される。一実施形態において、ＴＩＬは、Xuri Cell Expansion System W25（GE Healthcare）など、ガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡大培養する細胞拡大培養システムを使用して拡大培養される。一実施形態において、ＴＩＬは、Xuri Cell Expansion System W5（GE Healthcare）としても知られるWAVE Bioreactor Systemなど、ガス透過性バッグ内でＴＩＬを拡大培養する細胞拡大培養システムを使用して拡大培養される。一実施形態において、細胞拡大培養システムは、約１００ｍＬ、約２００ｍＬ、約３００ｍＬ、約４００ｍＬ、約５００ｍＬ、約６００ｍＬ、約７００ｍＬ、約８００ｍＬ、約９００ｍＬ、約１Ｌ、約２Ｌ、約３Ｌ、約４Ｌ、約５Ｌ、約６Ｌ、約７Ｌ、約８Ｌ、約９Ｌ及び約１０Ｌからなる群から選択される容積を有するガス透過性細胞バッグを含む。一実施形態において、ＴＩＬはG-Rexフラスコ（Wilson Wolf Manufacturingから市販されている）において拡大培養することができる。そのような実施形態は、細胞集団が約５×１０^{5}細胞／ｃｍ^{2}から１０×１０^{6}～３０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}に拡大培養することを可能にする。一実施形態において、この拡大培養は、細胞に新鮮な細胞培養培地を加える（細胞をフィードするとも称される）ことなく行われる。一実施形態において、これは、GRexフラスコ内に約１０ｃｍの高さの培地がある限りフィードなしである。一実施形態において、これにフィードはないが、１つ以上のサイトカインが加えられる。一実施形態において、サイトカインを培地と混合する必要なく、サイトカインをボーラスとして添加することができる。かかる容器、装置及び方法は、当該技術分野において公知で、ＴＩＬの拡大培養に用いられており、米国特許出願公開第２０１４／０３７７７３９Ａ１号、国際公開第２０１４／２１００３６　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１１５６１７　Ａ１号、国際公開第２０１３／１８８４２７　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１１／０１３６２２８　Ａ１号、米国特許第８，８０９，０５０　Ｂ２号、国際公開第２０１１／０７２０８８　Ａ２号、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２１６　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１２／０２４４１３３Ａ１号、国際公開第２０１２／１２９２０１　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１３／０１０２０７５　Ａ１号、米国特許第８，９５６，８６０　Ｂ２号、国際公開第２０１３／１７３８３５　Ａ１号、米国特許出願公開第２０１５／０１７５９６６　Ａ１号（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものが含まれる。かかるプロセスは、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292にも記載されている。

【０７１８】
ＶＩＩ．拡大培養したＴＩＬの代謝的健康
［00953］本明細書に開示される方法で拡大培養したＴＩＬについて、予備呼吸能（ＳＲＣ）及び解糖予備能を判定することができる。Seahorse XF細胞ミトストレステストは、ミトコンドリアにおける電子伝達鎖の成分を標的にする呼吸調節因子を用いて細胞の酸素消費速度（ＯＣＲ）を直接測定することによりミトコンドリア機能を測定する。試験化合物（オリゴマイシン、ＦＣＣＰ及びロテノンとアンチマイシンＡとの混合物、以下に記載する）を連続的に注入して、それぞれ、ＡＴＰ産生、最大呼吸及び非ミトコンドリア呼吸を測定する。次にこれらのパラメータ及び基礎呼吸を使用してプロトンリーク及び予備呼吸能を計算する。各調節因子が電子伝達鎖の特異的成分を標的にする。オリゴマイシンはＡＴＰシンターゼ（複合体Ｖ）を阻害し、オリゴマイシン注射後のＯＣＲの低下は、細胞性ＡＴＰ産生に関連するミトコンドリア呼吸と相関する。カルボニルシアニド－４（トリフルオロメトキシ）フェニルヒドラゾン（ＦＣＣＰ）は、プロトン勾配を破綻させてミトコンドリア膜電位を破壊する脱共役剤である。結果として、電子伝達鎖を通じた電子流が抑制されず、複合体ＩＶによって酸素が最大限に消費される。従って、ＦＣＣＰの刺激を受けたＯＣＲを使用して、最大呼吸と基礎呼吸との差として定義される予備呼吸能を計

算することができる。予備呼吸能（ＳＲＣ）は、細胞がエネルギー要求の増加に応答する能力の尺度である。第３の注射は、複合体Ｉ阻害薬であるロテノンと、複合体ＩＩＩ阻害薬であるアンチマイシンＡとの混合物である。この組み合わせはミトコンドリア呼吸を遮断し、ミトコンドリア外部の過程によってドライブされる非ミトコンドリア呼吸の計算を可能にする。

【０７１９】

［00954］一部の実施形態において、代謝アッセイは基礎呼吸である。

【０７２０】

［00955］一般に、ＴＩＬは、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の基礎呼吸速度を有する。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約９０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。一部の実施形態において、ＴＩＬは、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度と統計的に有意に異ならない基礎呼吸速度を有する。

【０７２１】

［00956］一部の実施形態において、代謝アッセイは予備呼吸能である。

【０７２２】

［00957］一部の実施形態において、代謝アッセイは解糖予備能である。一部の実施形態において、代謝アッセイは予備呼吸能である。細胞（呼吸）代謝を測定するため、細胞をミトコンドリア呼吸及び解糖の阻害薬で処理して、以下の尺度からなるＴＩＬの代謝プロファイルを決定した：ベースライン酸化的リン酸化（ＯＣＲによる測定時）、予備呼吸能、ベースライン解糖活性（ＥＣＡＲによる測定時）及び解糖予備能。代謝プロファイルは、ミトコンドリアＡＴＰ産生の遮断時に細胞が解糖を遂行する能力を決定することが可能な、Seahorseコンビネーションミトコンドリア／解糖ストレステストアッセイ（Agilent（登録商標）から市販されているキットを含む）を用いて実施した。一部の実施形態において、細胞がグルコース飢餓状態にあり、次にグルコースを注入し、続いてストレス作用剤を注入する。一部の実施形態において、ストレス作用剤は、オリゴマイシン、ＦＣＣＰ、ロテノン、アンチマイシンＡ及び／又は２－デオキシグルコース（２－ＤＧ）並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される。一部の実施形態において、オリゴマイシンは１０ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、ＦＣＣＰは１０ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、ロテノンは２．５ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、アンチマイシンＡは２．５ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、２－デオキシグルコース（２－ＤＧ）は５００ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、解糖能、解糖予備能及び／又は非解糖酸性化が測定される。一般に、ＴＩＬは、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の解糖予備能を有する。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約９

０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。

【０７２３】

［00958］一部の実施形態において、代謝アッセイは基礎解糖である。一部において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、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倍又は少なくとも１０倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約１０倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約８倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約３倍～約７倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約４倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約３倍の基礎解糖能の増加を有する。

【０７２４】

［00959］一般に、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の予備呼吸能を有する。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約９０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度と統計的に有意な差のない予備呼吸能を有する。

【０７２５】

ＶＩＩＩ．ＴＩＬの機能的特徴付け

［00960］グランザイムＢ産生：グランザイムＢは、ＴＩＬが標的細胞を死滅させる能力の別の尺度である。ＣＤ３、ＣＤ２８及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体を使用して上記に記載した通り再刺激した培地上清について、そのグランザイムＢレベルも、Human Granzyme B DuoSet ELISA Kit（R & D Systems、Minneapolis, MN）を製造者の指示に従い使用して評価した。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）はグランザイムＢ産生が増加する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥ

Ｐ　ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は細胞傷害活性が増加する。

【０７２６】

［00961］一部の実施形態において、テロメア長は、細胞生存率及び／又は細胞機能の尺度として使用することができる。テロメア長の測定：ゲノムＤＮＡ及び細胞学的調製物中のテロメア長を測定するために、様々な方法が使用されてきた。テロメア制限断片（ＴＲＦ）分析は、テロメア長を測定するための究極の判断基準である（de Lange et al., 1990）。ただし、ＴＲＦの主な制限は、大量のＤＮＡ（１．５μｇ）を必要とすることである。テロメア長の測定に広く使用されている２つの技術、即ち蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ；Agilent Technologies、Santa Clara, CA）及び定量的ＰＣＲを本発明で用い得る。一部の実施形態において、ステップＡで初めに回収したＴＩＬと、例えば図７に提供されたステップＤから拡大培養したＴＩＬとの間でテロメア長に変化はない。

【０７２７】

［00962］一部の実施形態において、ＴＩＬの健康はＩＦＮ－ガンマ分泌によって測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能のもう１つの尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することで測定できる。これらの刺激したＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ遊離を測定することにより決定できる。一部の実施形態において、例えば図７に示されるステップＡにおける初めに回収されたＴＩＬと比べて、例えば図７に示されるステップＤのＴＩＬのＩＦＮ－γ産生の増加は、ステップＤのＴＩＬの細胞傷害能の増加の指標である。

【０７２８】

［00963］一部の実施形態において、生物発光リダイレクト溶解アッセイ：標的細胞を溶解するＴＩＬの細胞傷害性は、高感度の用量依存的方法でＴＩＬの細胞傷害性を測定するＴＩＬアッセイのための生物発光リダイレクト溶解アッセイ（効力アッセイ）に従って、生物発光細胞株Ｐ８１５（クローンＧ６）とのＴＩＬの共培養アッセイを使用して評価された。

【０７２９】

［00964］一部の実施形態において、本方法は、上記及び本明細書に記載されるような方法（例えば、実施例及び図面に記載されているものを含む）を用いた、ＴＩＬ生存率を評価するためのアッセイを含む。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば図７に提供される通りのものを含め、上記で考察した通り拡大培養される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、生存率の評価前に凍結保存される。一部の実施形態において、生存率評価は、第１の拡大培養、第２の拡大培養及び追加の第２の拡大培養の実施前にＴＩＬを解凍することを含む。一部の実施形態において、本方法は、ＴＩＬ集団の細胞増殖、細胞毒性、細胞死及び／又はその他の生存率に関連する事項を評価するためのアッセイを提供する。生存率は、上記に記載されるＴＩＬ代謝アッセイのいずれか並びに当該技術分野において公知の細胞生存率の評価について公知の任意の方法によって測定することができる。一部の実施形態において、本方法は、図７に例示されるものを含め、本明細書に記載される方法を用いて拡大培養されたＴＩＬの細胞増殖、細胞毒性、細胞死及び／又はその他の生存率に関連する事項を評価するためのアッセイを提供する。

【０７３０】

［00965］一部の実施形態において、代謝アッセイは基礎呼吸である。一般に、第２の拡大培養ＴＩＬは、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の基礎呼吸速度を有する。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、２Ａプロセス ＴＩＬ（

例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９０％～約９９％である。一部の実施形態において、基礎呼吸速度は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。一部の実施形態において、第２の拡大培養 ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養 ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称される ＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度と統計的に有意な差のない基礎呼吸速度を有する。

【０７３１】

［00966］ 一般に、第２の拡大培養 ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養 ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称される ＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の予備呼吸能を有する。一部の実施形態において、予備呼吸能は、新鮮回収 ＴＩＬの基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９０％～約９９％である。一部の実施形態において、予備呼吸能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。一部の実施形態において、第２の拡大培養 ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養 ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称される ＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度と統計的に有意な差のない予備呼吸能を有する。

【０７３２】

［00967］ 一般に、第２の拡大培養 ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養 ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称される ＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の予備呼吸能を有する。一部の実施形態において、測定される代謝アッセイは解糖予備能である。一部の実施形態において、代謝アッセイは予備呼吸能である。細胞（呼吸）代謝を測定するため、細胞をミトコンドリア呼吸及び解糖の阻害薬で処理して、以下の尺度からなる ＴＩＬの代謝プロファイルを決定した：ベースライン酸化的リン酸化（ＯＣＲによる測定時）、予備呼吸能、ベースライン解糖活性（ＥＣＡＲによる測定時）及び解糖予備能。代謝プロファイルは、ミトコンドリアＡＴＰ産生の遮断時に細胞が解糖を遂行する能力を決定することが可能な、Seahorseコンビネーションミトコンドリア／解糖ストレステストアッセイ（Agilent（登録商標）から市販されているキットを含む）を用いて実施した。一部の実施形態

において、細胞がグルコース飢餓状態にあり、次にグルコースを注入し、続いてストレス作用剤を注入する。一部の実施形態において、ストレス作用剤は、オリゴマイシン、ＦＣＣＰ、ロテノン、アンチマイシンＡ及び／又は２－デオキシグルコース（２－ＤＧ）並びにこれらの組み合わせからなる群から選択される。一部の実施形態において、オリゴマイシンは１０ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、ＦＣＣＰは１０ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、ロテノンは２．５ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、アンチマイシンＡは２．５ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、２－デオキシグルコース（２－ＤＧ）は５００ｍＭで加えられる。一部の実施形態において、解糖能、解糖予備能及び／又は非解糖酸性化が測定される。一般に、ＴＩＬは、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の解糖予備能を有する。一部の実施形態において、解糖予備能は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、新鮮回収ＴＩＬの基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。

【０７３３】

［00968］一部の実施形態において、代謝アッセイは基礎解糖である。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、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倍又は少なくとも１０倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約１０倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約８倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約３倍～約７倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約４倍の基礎解糖能の増加を有する。一部の実施形態において、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、約２倍～約３倍の基礎解糖能の増加を有する。

【０７３４】

［00969］一般に、第２の拡大培養ＴＩＬ又は第２の追加の拡大培養ＴＩＬ（例えば、ｒｅＲＥＰ ＴＩＬと称されるＴＩＬを含め、図７のステップＤに記載されるものなど）は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の少なくとも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％、少なくとも９５％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％の解糖予備能を有する。一部の実施形態において、解糖予備能は、２ＡプロセスＴＩＬ（例えば、図７を参照

されたい）の基礎呼吸速度の約５０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約６０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約７０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約８０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９０％～約９９％である。一部の実施形態において、解糖予備能は、２Ａプロセス ＴＩＬ（例えば、図７を参照されたい）の基礎呼吸速度の約９５％～約９９％である。

【０７３５】

［00970］ グランザイムＢ産生：グランザイムＢは、ＴＩＬが標的細胞を死滅させる能力の別の尺度である。ＣＤ３、ＣＤ２８及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体を使用して上記に記載した通り再刺激した培地上清について、そのグランザイムＢレベルも、Human Granzyme B DuoSet ELISA Kit（R & D Systems、Minneapolis, MN）を製造者の指示に従い使用して評価した。

【０７３６】

［00971］ 一部の実施形態において、本方法は、上記に記載した通りの方法を用いた、ＴＩＬ生存率を評価するためのアッセイを提供する。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば図７に提供される通りのものを含め、上記で考察した通り拡大培養される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、生存率の評価前に凍結保存される。一部の実施形態において、生存率評価は、第１の拡大培養、第２の拡大培養及び追加の第２の拡大培養の実施前にＴＩＬを解凍することを含む。一部の実施形態において、本方法は、ＴＩＬ集団の細胞増殖、細胞毒性、細胞死及び／又はその他の生存率に関連する事項を評価するためのアッセイを提供する。生存率は、上記に記載されるＴＩＬ代謝アッセイのいずれか並びに当該技術分野において公知の細胞生存率の評価について公知の任意の方法によって測定することができる。一部の実施形態において、本方法は、図７に例示されるものを含め、本明細書に記載される方法を用いて拡大培養されたＴＩＬの細胞増殖、細胞毒性、細胞死及び／又はその他の生存率に関連する事項を評価するためのアッセイを提供する。

【０７３７】

［00972］ 本発明は、ＴＩＬ生存率を決定するためのアッセイ方法も提供する。本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）をより大きいＴＩＬ集団に拡大培養することにより、ＴＩＬの生存率をアッセイする方法も提供し、この方法は、

（ｉ）予め拡大培養された第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも5×10^7個のＴＩＬを含む、産生すること

を含む。

【０７３８】

［00973］ （ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも１００倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、第３の集団は、生存率に関して更にアッセイされる、産生することを含む。一部の実施形態において、本方法は、

（ｉｖ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、追加のＯＫＴ－３及び追加

のＡＰＣを補充することにより、追加の第２の拡大培養を実施することであって、追加の第２の拡大培養は、ステップ（ｉｉｉ）で得られたよりも大きいＴＩＬ集団を得るために少なくとも１４日間にわたって実施され、より大きいＴＩＬ集団は、第３のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含み、第３の集団は、生存率について更にアッセイされる、実施すること
を更に含む。

【０７３９】

［00974］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）前に、細胞は、凍結保存される。

【０７４０】

［00975］一部の実施形態において、細胞は、ステップ（ｉ）を実施する前に解凍される。

【０７４１】

［00976］一部の実施形態において、ステップ（ｉｖ）は、分析に十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される。

【０７４２】

［00977］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２１日～約３３日の期間内に実施される。

【０７４３】

［00978］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２１日～約３０日の期間内に実施される。

【０７４４】

［00979］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２１日～約２８日の期間内に実施される。

【０７４５】

［00980］一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２４日以下で実施される。

【０７４６】

［00981］一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）からの細胞は、ＣＤ４、ＣＤ８及びＴＣＲαβを新鮮回収細胞と同様のレベルで発現する。

【０７４７】

［00982］一部の実施形態において、抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。

【０７４８】

［00983］一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｉｉｉ）において９～１７日目のいずれかに細胞培養物に添加される。

【０７４９】

［00984］一部の実施形態において、ステップ（ｉｖ）のより大きいＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【０７５０】

［00985］一部の実施形態において、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【０７５１】

［00986］一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）である。

【０７５２】

［00987］一部の実施形態において、本方法は、高親和性Ｔ細胞受容体をコードする核酸を含む発現ベクターで第１のＴＩＬ集団を形質導入するステップを更に含む。

【０７５３】

［00988］一部の実施形態において、形質導入ステップは、ステップ（ｉ）前に行われる。

【０７５４】

［00989］一部の実施形態において、本方法は、Ｔ細胞シグナル伝達分子の少なくとも１つのエンドドメインに融合した単鎖可変断片抗体を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を含む発現ベクターで第１のＴＩＬ集団を形質導入するステップを更に含む。

【０７５５】

［00990］一部の実施形態において、形質導入ステップは、ステップ（ｉ）前に行われる。

【０７５６】

［00991］一部の実施形態において、ＴＩＬは、生存率に関してアッセイされる。

【０７５７】

［00992］一部の実施形態において、ＴＩＬは、凍結保存後に生存率に関してアッセイされる。

【０７５８】

［00993］一部の実施形態において、ＴＩＬは、凍結保存後及びステップ（ｉｖ）後に生存率に関してアッセイされる。

【０７５９】

［00994］一部の実施形態において、本開示は、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法を提供し、方法は、（ｉ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×１０^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；及び（ｉｖ）治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与することを含む。

【０７６０】

［00995］本開示によれば、ＴＩＬの生存率をアッセイする方法及び／又は対象への投与における更なる使用である。一部の実施形態において、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）のアッセイ方法は、

（ｉ）第１のＴＩＬ集団を得ること；

（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×１０^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；及び

（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも５０倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施される、産生すること；

（ｉｖ）第３のＴＩＬ集団を回収、洗浄及び凍結保存すること；
（ｖ）凍結保存ＴＩＬを極低温で貯蔵すること；
（ｖｉ）第３のＴＩＬ集団を解凍して、解凍された第３のＴＩＬ集団を提供すること；及び
（ｖｉｉ）第３の集団の細胞培養培地にＩＬ－２、ＯＫＴ－３及びＡＰＣを補充することにより、解凍された第３のＴＩＬ集団の一部の追加の第２の拡大培養を少なくとも３日のｒｅＲＥＰ期間にわたって実施することであって、この第３の拡大培養を実施して第４のＴＩＬ集団を得、第４のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数を第３のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と比較して比を求める、実施すること；
（ｖｉｉｉ）ステップ（ｖｉｉ）の比に基づき、解凍されたＴＩＬ集団が患者への投与に好適かどうかを決定すること；
（ｉｘ）ステップ（ｖｉｉｉ）において第４のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第３のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数との比が５：１より大きいと決定されるとき、治療有効投与量の解凍されたＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含む。

【０７６１】

[00996] 一部の実施形態において、ｒｅＲＥＰ期間は、第４のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第３のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数との比が５０：１より大きくなるまで実施される。

【０７６２】

[00997] 一部の実施形態において、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}個である。

【０７６３】

[00998] 一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｖｉｉ）は、約２１日～約３３日の期間内に実施される。一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｖｉｉ）は、約２１日～約３０日の期間内に実施される。一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｖｉｉ）は、約２１日～約２８日の期間内に実施される。一部の実施形態において、ステップ（ｉ）～（ｖｉｉ）は、約２４日以下で実施される。一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）又は（ｖｉｉ）からの細胞は、ＣＤ４、ＣＤ８及びＴＣＲαβを新鮮回収細胞と同様のレベルで発現する。一部の実施形態において、細胞は、ＴＩＬである。

【０７６４】

[00999] 一部の実施形態において、抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である。一部の実施形態において、ＰＢＭＣは、ステップ（ｉｉｉ）における３～１２日目のいずれか及び／又はステップ（ｉｉｉ）における１１～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される。

【０７６５】

[001000] 一部の実施形態において、ステップ（ｉｉｉ）又は（ｖｉｉ）のより大きいＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する。

【０７６６】

[001001] 一部の実施形態において、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する。

【０７６７】

[001002] 一部の実施形態において、ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）である。

【０７６８】

[001003] 一部の実施形態において、高親和性Ｔ細胞受容体をコードする核酸を含む発現ベクターで第１のＴＩＬ集団を形質導入するステップである。

【０７６９】

[001004] 一部の実施形態において、形質導入ステップは、ステップ（ｉ）前に行われる。

【０７７０】
［001005］一部の実施形態において、Ｔ細胞シグナル伝達分子の少なくとも１つのエンドドメインに融合した単鎖可変断片抗体を含むキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードする核酸を含む発現ベクターで第１のＴＩＬ集団を形質導入するステップである。
【０７７１】
［001006］一部の実施形態において、形質導入ステップは、ステップ（ｉ）前に行われる。
【０７７２】
［001007］一部の実施形態において、ＴＩＬは、ステップ（ｖｉｉ）後に生存率に関してアッセイされる。
【０７７３】
［001008］本開示は、更なるＴＩＬのアッセイ方法も提供する。一部の実施形態において、本開示は、ＴＩＬをアッセイする方法を提供し、この方法は、
（ｉ）コア生検サンプルから得られる第１の凍結保存ＴＩＬ集団の一部を得ること；
（ｉｉ）第１の凍結保存ＴＩＬ集団の一部を解凍すること；
（ｉｉｉ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の一部を少なくとも３日間のｒｅＲＥＰ期間にわたって培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、ＴＩＬ数の比を得るために第１のＴＩＬ集団からの一部は、第２のＴＩＬ集団と比較され、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団の一部のＴＩＬ数との比は、５：１より大きく、第２のＴＩＬ集団は、約１０日～約１９日までに少なくとも5×10^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；
（ｉｖ）ステップ（ｉｉｉ）の比及びステップ（ｉｉｉ）のＴＩＬ数に基づき、第１のＴＩＬ集団が患者への治療的投与における使用に好適かどうかを決定すること；
（ｖ）ステップ（ｉｖ）において第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数との比が５：１より大きいと決定されるとき、第１のＴＩＬ集団が治療的投与における使用に好適であると決定すること
を含む。
【０７７４】
［001009］一部の実施形態において、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団の一部のＴＩＬ数との比は、５０：１より大きい。
【０７７５】
［001010］一部の実施形態において、本方法は、本明細書に提供される任意の実施形態に記載される通りの方法により、ステップ（ｉ）からの第１の凍結保存ＴＩＬ集団全体の拡大培養を実施することを更に含む。
【０７７６】
［001011］一部の実施形態において、本方法は、ステップ（ｉ）からの第１の凍結保存ＴＩＬ集団全体を患者に投与することを更に含む。
【０７７７】
ＩＸ．ＴＩＬ製造用閉鎖系
［001012］本発明は、Ｇｅｎ２プロセス又はＧｅｎ３プロセスを使用した、ＴＩＬ培養プロセス中の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／又は削減を可能にし、使用するフラスコの数が少なくなり、コスト削減が可能となる。一部の実施形態において、閉鎖系は、２つの容器を使用する。
【０７７８】
［001013］かかる閉鎖系は、当該技術分野で公知であり、例えば、http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm及びhttps://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.に記載されている。
【０７７９】

[001014] 滅菌接続装置（ＳＴＣＤ）は、互換性のある２つの配管間に滅菌溶接を産生する。この手順により、様々な直径の容器及びチューブを滅菌接続できる。一部の実施形態において、閉鎖系は、ルアーロック及びヒートシール系を含む。一部の実施形態において、系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、閉鎖系は滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。一部の実施形態において、閉鎖系が使用される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、最終産物製剤容器中に製剤化される。

【０７８０】

[001015] 一部の実施形態において、閉鎖系は、腫瘍断片が得られた時点からＴＩＬが患者への投与又は凍結保存の準備が整うまで１つの容器を使用する。一部の実施形態において、２つの容器が使用される場合、第１の容器は閉鎖型Ｇコンテナであり、ＴＩＬ集団は遠心され、第１の閉鎖型Ｇコンテナを開かずに輸注バッグに移される。一部の実施形態において、２つの容器が使用される場合、輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである。閉鎖系又は閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍サンプル及び／又は腫瘍断片が追加されると、系が外側から確実に密閉され、細菌、真菌及び／又は他の微生物汚染がない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【０７８１】

[001016] 一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約５％～約１００％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約５％～約９５％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約５％～約９０％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約１０％～約９０％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約１５％～約８５％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、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％又は約１００％である。

【０７８２】

[001017] 閉鎖系は、微生物汚染の不在下及び／又は大幅に減少させＴＩＬを成長させる。

【０７８３】

[001018] 更に、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧は、細胞が培養されるにつれてそれぞれ変化する。従って、たとえ細胞培養に適した培地が流通していても、ＴＩＬ成長に最適な環境として閉鎖環境を常に維持する必要がある。このため、閉鎖環境の培地内のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧の物理的要因は、センサーによって監視され、そのセンサーの信号は、培養環境の入口に設置されたガス交換器の制御に使用され、閉鎖環境のガス分圧は、細胞培養環境を最適化するため、培地の変化に従ってリアルタイムで調製されることが望ましい。一部の実施形態において、本発明は、閉鎖環境への入口に、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧を測定し、監視装置からの信号に基づいてガス濃度を自動的に調製することにより、細胞培養環境を最適化する監視装置を備えたガス交換器を一体化した閉鎖細胞培養系を提供する。

【０７８４】

[001019] 一部の実施形態において、閉鎖環境内の圧力は連続的又は断続的に制御される。即ち、閉鎖環境内の圧力は、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、即ち、空間が、陽圧状態のＴＩＬの成長に適していることを保証するか、又は陰圧状態の流体の滲出を促進し、従って細胞成長を促進することを確実にする。更に、断続的に負圧を加えることにより、閉鎖環境の容積の一時的な収縮によって閉鎖環境内の循環液を均一且つ効率的に交換することが可能である。

【０７８５】

[001020] 一部の実施形態において、ＴＩＬの成長に最適な培養成分を置換又は追加することができ、ＩＬ－２及び／又はＯＫＴ３などの要因並びに組み合わせを追加し得る。

【０７８６】

Ｘ．任意選択のＴＩＬ遺伝子改変

[001021] Ｇｅｎ２又はＧｅｎ３プロセスの一部の実施形態において、本発明の拡大培養されたＴＩＬは、一過性の方法でタンパク質発現を変化させるために、それぞれ本明細書で提供されるように、閉鎖無菌製造プロセス中を含む、拡大培養ステップ前、その間又はその後に更に操作される。一部の実施形態において、一過性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。一部の実施形態において、本発明の拡大培養されたＴＩＬは、転写因子（ＴＦ）及び／又はＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過性に変化させることができる他の分子で処置される。一部の実施形態において、ＴＦ及び／又はタンパク質発現を一過性に変化させることができる他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／又は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。

【０７８７】

[001022] 特定の実施形態において、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。特定の実施形態において、方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団及び／又は第３のＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【０７８８】

[001023] 一部の実施形態において、本発明は、１つ以上のタンパク質の発現の促進又は１つ以上のタンパク質の発現の阻害及び１セットのタンパク質の促進と、別のセットのタンパク質の阻害との両方の同時の組み合わせのための、ＴＩＬ集団への、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）又は小分子（短鎖）干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）の挿入を含む、リボ核酸（ＲＮＡ）挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【０７８９】

[001024] 一部の実施形態において、本発明の拡大培養されたＴＩＬは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、第１の拡大培養前に、例えば、例えば図８５（特に、図８５Ｂ）に示されるステップＡから得られる、ＴＩＬ集団におけるものを含む、バルクＴＩＬ集団で発生する。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、例えば図８５（例えば、図８５Ｂ）に示されるステップＢで、拡大培養されるＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡大培養中に発生する。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、第１と第２の拡大培養中の移行中のＴＩＬ集団（例えば、本明細書に記載の第２のＴＩＬ集団）、図８５に示される、例えばステップＢから取得され、ステップＣに含まれるＴＩＬ集団におけるものを含む、第１の拡大培養後に発生する。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、例えばステップＣから得られる、ＴＩＬ集団におけるものを含む、第２の拡大培養前及び図８５に示されるステップＤにおけるその拡大培養前にバルクＴＩＬ集団で発生する。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、例えば図８５に示されるステップＤで、拡大培養されるＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）におけるものを含む、第２の拡大培養中に発生する。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、例えば図８５に示されるステップＤにおける、拡大培養から得られるＴＩＬ集団におけるものを含む、第２の拡大培養後に発生する。

【０７９０】

[001025] 一実施形態において、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過性に変化させる方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載され、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過性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のステップを含む。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、当該技術分野で公知であり、例えば、Graham and van der Eb, Virology 1973, 52, 456-467；Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376；及びChen and Okayarea, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752；並びに米国特許第５，５９３，８７５号に記載され、そのそれぞれの

開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過性に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。濾過水中のカチオン性脂質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ライド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスフォチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を使用する方法などのリポソームトランスフェクション法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417並びに米国特許第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、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現を一過性に変化させる方法は、米国特許第５，７６６，９０２号；同第６，０２５，３３７号；同第６，４１０，５１７号；同第６，４７５，９９４号；及び同第７，１８９，７０５号（そのそれぞれ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たトランスフェクションのステップを含む。

【０７９１】

［001026］一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ステムメモリーＴ細胞（ＴＳＣＭ）の増加をもたらす。ＴＳＣＭは、抗原経験のあるセントラルメモリーＴ細胞の初期の前駆細胞である。ＴＳＣＭは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生及び多能性能力を示し、効果的なＴＩＬ産物の生成に一般的に望ましい。ＴＳＣＭは、養子細胞移入のマウスモデルで他のＴ細胞サブセットと比較して強化された抗腫瘍活性を示している（Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011；Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012；Cieri et al. Blood 2013）。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のＴＳＣＭを含む組成物を伴うＴＩＬ集団をもたらす。一部の実施形態において、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％又は少なくとも９５％のＴＳＣＭパーセンテージの増加をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＬ集団における、少なくとも１倍、２倍、３倍、４倍、５倍又は１０倍のＴＳＣＭの増加をもたらす。一部の実施形態において、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％又は少なくとも９５％のＴＳＣＭを伴うＴＩＬ集団をもたらす。一部の実施形態において、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％又は少なくとも９５％のＴＳＣＭを伴う治療用ＴＩＬ集団をもたらす。

【０７９２】

［001027］一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原経験のあるＴ細胞の若返りをもたらす。一部の実施形態において、若返りには、例えば、増殖の増加、Ｔ細胞活性化の増加及び／又は抗原認識の増加が含まれる。

【０７９３】

［001028］一部の実施形態において、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。一部の

実施形態において、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。一部の実施形態において、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。

【０７９４】

［001029］一部の実施形態において、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の変化した発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１（ＰＤＣＤ１又はＣＣ２７９とも称される）、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１及び／又はｃＡＭＰプロテインキナーゼ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。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＴＧＦＢＲ２、ＣＣＲ４／５、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）、ＣＩＳＨ、ＣＣＲ（キメラ共刺激受容体）、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤ、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２、ＣＳＣＲ３、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ１７、ＣＸＣＬ１／ＣＸＣＬ８、ＶＨＬ、ＣＤ４４、ＰＩＫ３ＣＤ、ＳＯＣＳ１及び／又はｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）からなる群から選択される遺伝子を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦＢＲ２を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４／５を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢを標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨを標的とする。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１２を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－１５を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２１を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ １／２ ＩＣＤを標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＧＩＴを標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＧＦβを標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ２を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ４を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ５を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ１を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＲ２を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＳＣＲ３を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ１を標的とする。一部の実施形

態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＸＣＬ８を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ２２を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＬ１７を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬを標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤを標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１を標的とする。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）を標的とする。

【０７９５】

[001030] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、一過性のタンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１α）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ１－β）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ８、ＣＣＬ２２及び／又は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。

【０７９６】

[001031] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβＲ２及び／又はＴＧＦβの減少及び／又は発現低下をもたらす（例えば、ＴＧＦβ経路の遮断をもたらすことを含む）。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＢＬＢ（ＣＢＬ－Ｂ）の減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨの減少及び／又は発現低下をもたらす。

【０７９７】

[001032] 一部の実施形態において、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輸送又は移動を改善するために、ケモカイン受容体の増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、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）の増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ１、ＣＸＣＲ２及び／又はＣＳＣＲ３からなる群から選択されるケモカイン受容体の増加及び／又は過剰発現をもたらす。

【０７９８】

[001033] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５及び／又はＩＬ－２１からなる群から選択されるインターロイキンの増加及び／又は過剰発現をもたらす。

【０７９９】

[001034] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤの増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＶＨＬの増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＤ４４の増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＩＫ３ＣＤの増加及び／又は過剰発現をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＳＯＣＳ１の増加及び／又は過剰発現をもたらす。

【０８００】

[001035] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）の減少及び／又は発現低下をもたらす。

【０８０１】

[001036] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢ

ＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される１つの分子及びそれらの組み合わせの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される２つの分子及びそれらの組み合わせの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１と、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される１つの分子及びそれらの組み合わせとの、減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３及びそれらの組み合わせの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１と、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３及びそれらの組み合わせの１つとの、減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＬＡＧ３の減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＩＳＨの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１及びＣＢＬＢの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＩＳＨの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＬＡＧ３及びＣＢＬＢの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＰＤ－１の減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＬＡＧ３の減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＩＳＨの減少及び／又は発現低下をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＴＩＭ３及びＣＢＬＢの減少及び／又は発現低下をもたらす。

【０８０２】

[001037] 一部の実施形態において、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルス又はレンチウイルス法により、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団又は回収されたＴＩＬ集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

【０８０３】

[001038] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される１つの分子及びそれらの組み合わせの減少及び／又は発現低下並びにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１及びそれらの組み合わせの増加及び／又は発現の増強をもたらす。一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢからなる群から選択される１つの分子及びそれらの組み合わせの減少及び／又は発現低下並びにＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１及びそれらの組み合わせの増加及び／又は発現の増強をもたらす。

【０８０４】

[001039] 一部の実施形態において、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％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の

発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８０％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９０％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９９％の発現の低下が存在する。

【０８０５】

[001040] 一部の実施形態において、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％又は約９５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８５％、約９０％又は約９５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８０％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９０％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９５％の発現の増加が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９９％の発現の増加が存在する。

【０８０６】

[001041] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、転写因子（ＴＦ）及び／又はＴＩＬにおけるタンパク質発現を一過性に変化させることができる他の分子でのＴＩＬの処置によって誘導される。一部の実施形態において、ＳＱＺベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームは、転写因子（ＴＦ）及び／又はタンパク質発現を一過性に変化させることができる他の分子の細胞内送達のために使用される。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実証するそのような方法（Sharei et al. PNAS 2013並びにSharei et al., PLOS ONE 2015及びGreisbeck et al., J. Immunology vol. 195, 2015）が説明されている。例えば、国際公開第２０１３／０５９３４３Ａ１号、国際公開第２０１７／００８０６３Ａ１号及び国際公開第２０１７／１２３６６３Ａ１号（これらの全ては、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。国際公開第２０１３／０５９３４３Ａ１号、国際公開第２０１７／００８０６３Ａ１号及び国際公開第２０１７／１２３６６３Ａ１号に記載されるそのような方法は、転写因子（ＴＦ）及び／又は一過性のタンパク質発現を誘導することができる他の分子にＴＩＬ集団を曝露するために、本発明と共に使用することができ、ここで、前記ＴＦ及び／又は一過性のタンパク質発現を誘導することができる他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／又はＴＩＬ集団における腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の数の増加を提供し、従ってＴＩＬ集団の再プログラミング及び再プログラミングされたＴＩＬ集団の治療効果の再プログラミングされていないＴＩＬ集団と比較した増加をもたらす。一部の実施形態において、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、ＴＩＬの開始集団又は前の（即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／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団をもたらす。

【０８０７】

[001042] 一部の実施形態において、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１、ＮＯＴＣＨ１／２　ＩＣＤ及び／又はＭＹＢを含むが、これらに限定されない。一部の実施形態において、転写因子（ＴＦ）は、ＴＣＦ－１である。一部の実施形態において、転写因子（ＴＦ）は、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤである。一部の実施形態において、転写因子（ＴＦ）は、ＭＹＢである。一部の実施形態において、転写因子（ＴＦ）は、市販のKNOCKOUT血清代替物（Gibco/ThermoFisher）などの人工多能性幹細胞培養物（ｉＰＳＣ）と共に投与されて、追加のＴＩＬ再プログラミングを誘導する。一部の実施形態において、転写

因子（ＴＦ）は、追加のＴＩＬ再プログラミングを誘導するために、ｉＰＳＣカクテルと共に投与される。一部の実施形態において、転写因子（ＴＦ）は、ｉＰＳＣカクテルなしで投与される。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、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％又は約９５％　ＴＳＣＭの増加をもたらす。

【０８０８】

[001043] 一部の実施形態において、上記のように一過性に変化するタンパク質発現の方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法と組み合わされ得、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のステップを含む。特定の実施形態において、方法は、ＴＩＬ集団を遺伝子改変するステップを含む。特定の実施形態において、方法は、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団及び／又は第３のＴＩＬ集団を遺伝子改変することを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レンチウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは、当該技術分野で公知であり、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77；Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75；Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71及び米国特許第６，６２７，４４２号に記載され、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入のステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入システムは、当該技術分野で公知であり、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入システムは、当該技術分野で公知であり、トランスポサーゼの長期発現がトランスジェニック細胞では発生しないように、トランスポサーゼがＤＮＡ発現ベクターとして又は発現可能なＲＮＡ若しくはタンパク質として提供されるシステム、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップとポリＡテールを含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポサーゼを含む。ＳＢ１０、ＳＢ１１、ＳＢ１００ｘなどのサケ科のＴｅｌ様トランスポサーゼ（ＳＢ又はSleeping Beautyトランスポサーゼ）を含む適切なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム及び酵素活性が向上した人工酵素は、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、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０８０９】

[001044] 一部の実施形態において、タンパク質発現の一過性の変化は、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）によって誘導される発現の低下であり、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コンジュゲートした２０ヌクレオチドのアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基のセンス（パッセンジャー）鎖を含む、２'－ＯＨ置換（典型的にはフッ素又は－ＯＣＨ$_3$）の高いパーセンテージを有する化学合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である。一部の実施形態において、方法は、自己送達ＲＮＡ干渉（ｓｄＲＮＡ）の使用を含む、ＴＩＬ集団におけるタンパク質発現の一過性の変化を含み、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コンジュゲートした２０ヌクレオチドのアンチセンス（ガイド）鎖及び１３～１５塩基のセンス（パッセンジャー）鎖を含む、２'－ＯＨ置換（典型的にはフッ素又は－ＯＣＨ$_3$）の高いパーセンテージを有する化学合成された非対称ｓｉＲＮＡ二重鎖である。ｓｄＲＮＡの使用方法は、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（近刊）に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬ集団へのｓｄ

ＲＮＡの送達は、エレクトロポレーション、ＳＱＺ又は他の方法を使用せずに達成され、代わりに、ＴＩＬ集団が培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される、１～３日の期間を使用する。特定の実施形態において、方法は、ＴＩＬ集団を、培地中１μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度で、ｓｄＲＮＡに１～３日の期間曝露することを含む、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達を含む。一実施形態において、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中１０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される、１～３日の期間を使用して達成される。一実施形態において、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される、１～３日の期間を使用して達成される。一実施形態において、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される、１～３日の期間を使用して達成される。一実施形態において、ＴＩＬ集団へのｓｄＲＮＡの送達は、ＴＩＬ集団が培地中０．１μＭ／１０，０００ＴＩＬ～５０μＭ／１０，０００ＴＩＬの濃度でｓｄＲＮＡに曝露される、１～３日の期間を使用して達成され、ここで、ｓｄＲＮＡへの曝露は、培地に新鮮なｓｄＲＮＡを添加することにより、２、３、４又は５回行われる。他の適切なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第２０１１／００３９９１４　Ａ１号、同第２０１３／０１３１１４１　Ａ１号及び同第２０１３／０１３１１４２　Ａ１号並びに米国特許第９，０８０，１７１号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０８１０】

[001045] 一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは製造中にＴＩＬの集団に挿入される。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは、ＮＯＴＣＨ　１／２　ＩＣＤ、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４　ＴＩＭ－３、ＬＡＧ－３、ＴＩＧＩＴ、ＴＧＦβ、ＴＧＦＢＲ２、ｃＡＭＰプロテインキナーゼＡ（ＰＫＡ）、ＢＡＦＦ　ＢＲ３、ＣＩＳＨ及び／又はＣＢＬＢに干渉するＲＮＡをコードする。一部の実施形態において、発現の低下は、例えば、フローサイトメトリー及び／又はｑＰＣＲによって評価されるような遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。一部の実施形態において、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％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約７５％、約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８０％、約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８５％、約９０％又は約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８０％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約８５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９０％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９５％の発現の低下が存在する。一部の実施形態において、少なくとも約９９％の発現の低下が存在する。

【０８１１】

[001046] 本明細書に記載されるように、ｓｉＲＮＡの化学修飾に基づく自己送達可能なＲＮＡｉ技術を本発明の方法と共に使用して、ｓｄＲＮＡを問題なくＴＩＬに送達することができる。骨格修飾と非対称ｓｉＲＮＡ構造及び疎水性リガンドの組み合わせ（例えば、Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018及び米国特許出願公開第２０１６０３０４８７３号を参照されたい）は、ｓｄＲＮＡのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単純に添加することにより、追加の製剤及び方法なしで、ｓｄＲＮＡを培養した哺乳動物細胞に浸透させることを可能にする。この安定性は、単に培地中のｓｄＲＮＡの活性濃度を維持することで、ＲＮＡｉを介した標的遺伝子活性の一定レベルの低下のサポートを可能にする。理論に拘束されるものではないが、ｓｄＲＮＡの骨格安定化は、非分裂細胞において数ヶ月間続き得る、遺伝子発現効果の長期低下を提供する。

【０８１２】
［001047］一部の実施形態において、９５％を超えるＴＩＬのトランスフェクション効率及び様々な特定のｓｄＲＮＡによる標的の発現の低下が生じる。一部の実施形態において、いくつかの未修飾リボース残基を含有するｓｄＲＮＡを、完全に修飾された配列で置換して、ＲＮＡｉ効果の効力及び／又は寿命を増加させた。一部の実施形態において、発現効果の低下は、１２時間、２４時間、３６時間、４８時間、５日間、６日間、７日間又は８日間以上維持される。一部の実施形態において、発現効果の低下は、ＴＩＬのｓｄＲＮＡ処置後、１０日以上で減少する。一部の実施形態において、標的発現の発現において７０％を超える低下が維持される。一部の実施形態において、標的発現の発現において７０％を超える低下は維持されたＴＩＬである。一部の実施形態において、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路における発現の減少により、ＴＩＬがより強力なインビボ効果を示すことが可能となり、これは、一部の実施形態において、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１経路の抑制効果の回避による。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡによるＰＤ－１の発現の低下は、ＴＩＬ増殖の増加をもたらす。
【０８１３】
［001048］低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）は、短鎖干渉ＲＮＡ又はサイレンシングＲＮＡとして知られる場合もあり、一般に長さが１９～２５塩基対の二本鎖ＲＮＡ分子である。ｓｉＲＮＡは、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、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）で使用される。
【０８１４】
［001049］二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、一般にセンス（パッセンジャー）及びアンチセンス（ガイド）鎖であり、一本鎖オーバーハング領域を含み得る、ＲＮＡの相補鎖の対を含む任意の分子を定義するために、一般的に使用できる。ｓｉＲＮＡと対比されるｄｓＲＮＡという用語は、ダイサーを含む切断酵素システムの作用により、より大きいｄｓＲＮＡ分子から放出されるｓｉＲＮＡ分子の配列を含む前駆体分子を一般的に指す。
【０８１５】
［001050］ｓｄＲＮＡ（自己送達可能なＲＮＡ）は、細胞に侵入するのに送達ビヒクルを必要とせず、従来のｓｉＲＮＡと比較して向上した薬理を有する、共有結合修飾されたＲＮＡｉ化合物の新しいクラスである。「自己送達可能なＲＮＡ」又は「ｓｄＲＮＡ」は、疎水性修飾されたＲＮＡ干渉アンチセンスハイブリッドであり、初代細胞ではインビトロで、局所投与ではインビボで、非常に効果的であることが実証されている。毒性のない強力な取り込み及び／又はサイレンシングが実証されている。ｓｄＲＮＡは、一般に、最小の二本鎖領域を有する、化学的に修飾された非対称の核酸分子である。ｓｄＲＮＡ分子は、典型的には、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。更に、ｓｄＲＮＡ分子は、本明細書に記載されるように、従来の及び先端的なステロール型分子などの疎水性コンジュゲートに結合させることができる。ｓｄＲＮＡ及びそのようなｓｄＲＮＡを作製するための関連する方法は、例えば、米国特許出願公開第２０１６０３０４８７３号、国際公開第２０１００３３２４６号、国際公開第２０１７０７０１５１号、国際公開第２００９１０２４２７号、国際公開第２０１１１１９８８７号、国際公開第２０１００３３２４７Ａ２号、国際公開第２００９０４５４５７号、国際公開第２０１１１１９８５２号にも広範に記載され、これら全ては、全ての目的のために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。ｓｄＲＮＡの構造、化学、標的位置、配列の優先傾向などを最適化するために、独自のアルゴリズムが開発され、ｓｄＲＮＡの効力予測に利用されている（例えば、米国特許出願公開第２０１６０３０４８７３号を参照されたい）。これらの分析に基づいて、機能的ｓｄＲＮＡ配列は、一般に、４０％を超える確率で、１μＭの濃度で７０％を超える発現の低下を有すると定義されている。
【０８１６】
［001051］一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、７０％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用される

ｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、７５％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、８０％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、８５％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、９０％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、９５％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、標的遺伝子の発現において、９９％の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭ～約４μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約０．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約１．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約２．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．２５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約３．７５μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。一部の実施形態において、本発明で使用されるｓｄＲＮＡ配列は、約４．０μＭの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。

【０８１７】

［００１０５２］　一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／又は有効性を増加させ、処置される細胞又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。そのような修飾は、２’－Ｏ－メチル修飾、２’－Ｏ－フルオロ修飾、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／又は２’デオキシヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態において、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／又はフェニルを含む１つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。更なる特定の実施形態において、化学修飾されたヌクレオチドは、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。一部の実施形態において、糖は修飾され得、修飾された糖は、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）、即ち２’－アルコキシ、２’－アミノ、２’－Ｓ－アルキル、２’－ハロ（２’－フルオロを含む）、Ｔ－メトキシエトキシ、２’－アリルオキシ（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ＝ＣＨ$_2$）、２’－プロパルギル、２’－プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル及びシアノなどを含み

得るが、これらに限定されない。一実施形態において、糖部分は、ヘキソースであり得、記載されるようにオリゴヌクレオチドに組み込まれる（Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)）。

【０８１８】

[001053] 一部の実施液体において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖である、即ち分子のいずれかの末端にオーバーハングする一本鎖配列を有しない、即ち平滑末端である。一部の実施形態において、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。換言すれば、本発明の二本鎖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、分子の１つ、例えば、アンチセンス配列を含む第１の分子は、それにハイブリダイズする第２の分子より長いものであり得る（分子の一部が一本鎖のまま残る）。一部の実施形態において、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。

【０８１９】

[001054] 一部の実施形態において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／又はループ又はバルジを含有するが、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。一部の実施形態において、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。別の実施形態において、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９０％～９５％にわたって二本鎖である。一部の実施形態において、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９６％～９８％にわたって二本鎖である。一部の実施形態において、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくとも又は最大１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４又は１５のミスマッチを含有する。

【０８２０】

[001055] 一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば、３’又は５’結合を修飾することにより、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る（例えば、米国特許第５，８４９，９０２号及び国際公開第９８／１３５２６号）。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とすることができる。本明細書で使用される「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基又はカップリング基のいずれかとして、オリゴヌクレオチド又はヌクレオモノマーに結合することができる置換基（例えば、ＯＨ基以外）を指す（例えば、ＦＩＴＣ、プロピル（$CH_2-CH_2-CH_3$）、グリコール（$-O-CH_2-CH_2-O-$）リン酸（PO_3^{2+}）、ホスホン酸水素又はホスホルアミダイト）。「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」又は「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【０８２１】

[001056] 一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合される。

【０８２２】

[001057] 一部の実施形態において、化学修飾は、少なくとも１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００の細胞取り込みの強化を導き得る。一部の実施形態において、Ｃ又はＵ残基の少なくとも１つは、疎水性修飾を含む。一部の実施形態において、複数のＣ及びＵが疎水性修飾を含む。一部の実施形態において、Ｃ及びＵの少なくとも１０％、１５％、２０％、３０％、４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又は少なくとも９５％が疎水性修飾を含み得る。一部の実施形態において、Ｃ及びＵの全てが疎水性修飾

を含む。

【０８２３】

［001058］一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ又はｓｄ－ｒｘＲＮＡは、プロトン化可能なアミンの組み込みにより、ｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子のエンドソーム放出の増強を示す。一部の実施形態において、プロトン化可能なアミンは、センス鎖に組み込まれる（ＲＩＳＣ充填後に廃棄される分子の部分において）。一部の実施形態において、本発明のｓｄＲＮＡ化合物は、二重鎖領域（長さが１０～１５塩基の効率的なＲＩＳＣエントリーに必要）及び４～１２ヌクレオチド長の一本鎖領域と；１３ヌクレオチドの二重鎖とを含む、非対称化合物を含む。一部の実施形態において、６ヌクレオチドの一本鎖領域が使用される。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡの一本鎖領域は、２～１２個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。一部の実施形態において、６～８個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が使用される。一部の実施形態において、本発明のｓｄＲＮＡ化合物は、ユニークな化学修飾パターンも含み、これは、安定性を提供し、ＲＩＳＣエントリーと適合性である。

【０８２４】

［001059］例えば、ガイド鎖は、ＲＩＳＣエントリー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も修飾され得る。一部の実施形態において、ガイド鎖における化学修飾パターンは、２’Ｆ修飾されているＣ及びＵヌクレオチドの大部分と、リン酸化されている５’末端とを含む。

【０８２５】

［001060］一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ又はｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの少なくとも３０％が修飾されている。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ又はｓｄ－ｒｘＲＮＡ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％又は９９％が修飾されている。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ又はｓｄ－ｒｘＲＮＡのヌクレオチドの１００％が修飾されている。

【０８２６】

［001061］一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ分子は、最小の二本鎖領域を有する。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、二本鎖である分子の領域は、８、９、１０、１１、１２、１３、１４又は１５ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、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間には１００％の相補性があり得るか、又はガイド鎖とパッセンジャー鎖間に１つ以上のミスマッチがあり得る。一部の実施形態において、二本鎖分子の１つの末端において、分子は、平滑末端であるか、又は１ヌクレオチドのオーバーハングを有する。分子の一本鎖領域は、一部の実施形態において、４～１２ヌクレオチド長である。一部の実施形態において、一本鎖領域は、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２ヌクレオチド長であり得る。一部の実施形態において、一本鎖領域は、４ヌクレオチド長未満又は１２ヌクレオチド長超でもあり得る。特定の実施形態において、一本鎖領域は、６又は７ヌクレオチド長である。

【０８２７】

［001062］一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡ分子は、増加した安定性を有する。一部の場合、化学修飾されたｓｄＲＮＡ又はｓｄ－ｒｘＲＮＡ分子は、任意の中間値を含む、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４時間又は２４時間を超える培地中での半減期を有する。一部の実施形態において、ｓｄ－ｒｘＲＮＡは、１２時間より長い培地

中での半減期を有する。

【０８２８】

[001063] 一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは、効力の増加及び／又は毒性の低下のために最適化される。一部の実施形態において、ガイド及び／又はパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／又はガイド及び／又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は、一部の態様において、ＲＮＡ分子の効力に影響を与えることができ、一方で、２’－フルオロ（２’Ｆ）修飾の２’－Ｏ－メチル（２’ＯＭｅ）修飾による置換は、一部の態様において、分子の毒性に影響を与えることができる。一部の実施形態において、分子の２’Ｆ含有量の低減は、分子の毒性を低減すると予測される。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは２’Ｆ修飾を有しないが、細胞取り込み及び組織浸透において同等の効力を特徴とする。

【０８２９】

[001064] 一部の実施形態において、ガイド鎖は、長さがおよそ１８～１９ヌクレオチドであり、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又は１４を超えるヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、ＲＩＳＣエントリーに干渉することなく安定性の向上を付与する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、５’末端にあるか、又はガイド鎖全体に広がり得る。一部の実施形態において、ガイド鎖の３’末端の１０ヌクレオチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９又は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、２’Ｆ及び／又は２’ＯＭｅ修飾も含むことができ、これは分子全体に位置し得る。一部の実施形態において、ガイド鎖の１位のヌクレオチド（ガイド鎖の最も５’位のヌクレオチド）は、２’ＯＭｅ修飾及び／又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修飾され得る。例えば、１９ｎｔガイド鎖の２～１０位（又は異なる長さのガイド鎖の対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２’Ｆ修飾され得る。ガイド鎖内のＣ及びＵヌクレオチドも２’ＯＭｅ修飾することができる。例えば、１９ｎｔガイド鎖の１１～１８位（又は異なる長さのガイド鎖の対応する位置）のＣ及びＵヌクレオチドは、２’ＯＭｅ修飾され得る。一部の実施形態において、ガイド鎖の最も３’末端のヌクレオチドは修飾されていない。特定の実施形態において、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。他の実施形態において、１位及び１１～１８位のＣ又は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。他の実施形態において、１位及び１１～１８位のＣ又はＵは２’ＯＭｅ修飾されており、ガイド鎖の５’末端はリン酸化されており、２～１０位のＣ又はＵは２’Ｆ修飾されている。

【０８３０】

[001065] 自己送達可能なＲＮＡｉ技術は、追加の製剤又は技術を必要とすることなく、ＲＮＡｉ剤で細胞を直接トランスフェクション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ベースの手法と比べて有意な機能的利点を提供する組成物及び方法の特徴であり、従って、ｓｄＲＮＡ法は、本発明のＴＩＬにおける標的遺伝子の発現を低下させる方法に関するいくつかの実施形態において使用される。ｓｄＲＮＡｉ法により、化学合成された化合物を、エクスビボ及びインビボの両方で、広範な初代細胞及び組織に直接送達することが可能となる。本明細書の本発明の一部の実施形態に記載されているｓｄＲＮＡは、Advirna LLC, Worcester, MA, USAから市販されている。

【０８３１】

[001066] 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、例えば、全体として参照により本明細書に組み込まれるByrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutic

s, 29(10):855-864に開示される。

【０８３２】

[001067] 一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドは、無菌エレクトロポレーションを使用して、本明細書に記載されるＴＩＬに送達することができる。特定の実施形態において、方法は、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドを送達するためのＴＩＬ集団の無菌エレクトロポレーションを含む。

【０８３３】

[001068] 一部の実施形態において、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することができる。一部の実施形態において、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。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド剤は、いかなる送達剤も必要としない自己送達ＲＮＡｉ剤である。特定の実施形態において、方法は、ｓｄＲＮＡオリゴヌクレオチドをＴＩＬ集団に送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【０８３４】

[001069] オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のＴＩＬと接触し（例えば、接触させ、本明細書では投与又は送達とも称される）、ＴＩＬにより取り込まれる（ＴＩＬによる受動的取り込みを含む）。ｓｄＲＮＡは、第１の拡大培養中、例えば図７及び／又は図８５、ステップＢ、第１の拡大培養後、例えば、ステップＣ中、第２の拡大培養前又はその間、例えば、ステップＤ前又はその間、ステップＤ後且つステップＥにおける回収前、ステップＦの回収中又はその後、ステップＦの最終的な製剤化及び／又は輸注バッグへの移動前又はその間及びステップＦのいずれかの任意選択による凍結保存ステップ前に、本明細書に記載されるようにＴＩＬに添加することができる。更に、ｓｄＲＮＡは、ステップＦの任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加することができる。一実施形態において、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする１つ以上のｓｄＲＮＡは、１００ｎＭ～２０ｍＭ、２００ｎＭ～１０ｍＭ、５００ｎｍ～１ｍＭ、１μＭ～１００μＭ、１μＭ～１００μＭからなる群から選択される濃度で、ＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。一実施形態において、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする１つ以上のｓｄＲＮＡは、０．１μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、０．７５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．２５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、１．５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、２μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地、５μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地又は１０μＭ ｓｄＲＮＡ／１０，０００ＴＩＬ／１００μＬ培地からなる群から選択される量で、ＴＩＬ及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。一実施形態において、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＴＩＭ－３、ＣＩＳＨ及びＣＢＬＢを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする１つ以上のｓｄＲＮＡは、プレＲＥＰ又はＲＥＰ段階中に、１日２回、１日１回、２日ごと、３日ごと、４日ごと、５日ごと、６日ごと又は７日ごとに、ＴＩＬ培養物に添加され得る。

【０８３５】

[001070] ｓｄＲＮＡを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地中に高濃度でｓｄＲＮＡを溶解し、受動的取り込みが発生するのに十分な時間を与えることにより、拡大培養プロセス中に本明細書に記載されるようにＴＩＬと接触させることができる。特定の実施形態において、本発明の方法は、ＴＩＬ集団を本明細書に記載されるようなオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。特定の実施形態において、方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、ｓｄＲＮＡを、細胞培養培地に溶解すること及び細胞培養培地をＴＩＬ集団と接触させることを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載されるように、第１の集団、第２の集団及び／又は第３の集団であり得る。

【０８３６】
［001071］一部の実施形態において、細胞へのオリゴヌクレオチドの送達は、リン酸カルシウム、ＤＭＳＯ、グリセロール若しくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む、適切な当該技術分野で認められた方法により、又は例えばカチオン性、アニオン性若しくは中性脂質組成物若しくはリポソームを使用するトランスフェクションにより、当該技術分野で公知の方法を使用して増強され得る（例えば、国際公開第９０／１４０７４号；国際公開第９１／１６０２４号；国際公開第９１／１７４２４号；米国特許第４，８９７，３５５号；Bergan et a 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567）。
【０８３７】
［001072］一部の実施形態において、標的遺伝子の発現を低下させるために、１つを超えるｓｄＲＮＡが使用される。一部の実施形態において、ＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３及び／又はＣＩＳＨを標的とするｓｄＲＮＡの１つ以上が一緒に使用される。一部の実施形態において、ＰＤ－１　ｓｄＲＮＡは、１つを超える遺伝子標的の発現を低下させるために、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３及び／又はＣＩＳＨの１つ以上と共に使用される。一部の実施形態において、ＬＡＧ３　ｓｄＲＮＡは、ＣＩＳＨ標的化ｓｄＲＮＡと組み合わせて使用されて、両方の標的の遺伝子発現を低下させる。一部の実施形態において、本明細書のＰＤ－１、ＴＩＭ－３、ＣＢＬＢ、ＬＡＧ３及び／又はＣＩＳＨの１つ以上を標的とするｓｄＲＮＡは、Advirna LLC、Worcester, MA, USAから市販されている。
【０８３８】
［001073］一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される遺伝子及びそれらの組み合わせを標的とする。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される遺伝子及びそれらの組み合わせを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、別のｓｄＲＮＡは、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、ＣＴＬＡ－４、ＴＩＧＩＴ、ＣＩＳＨ、ＴＧＦβＲ２、ＰＫＡ、ＣＢＬＢ、ＢＡＦＦ（ＢＲ３）からなる群から選択される遺伝子及びそれらの組み合わせを標的とする。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。一部の実施形態において、ｓｄＲＮＡは、ＰＤ－１から選択される遺伝子と、ＬＡＧ－３、ＣＩＳＨ、ＣＢＬＢ、ＴＩＭ３及びそれらの組み合わせの１つとを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＰＤ－１を標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＬＡＧ３を標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＩＳＨを標的とする。一部の実施形態において、１つのｓｄＲＮＡはＴＩＭ３を標的とし、１つのｓｄＲＮＡはＣＢＬＢを標的とする。
【０８３９】
［001074］上記のように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子改変されている腫瘍浸潤リンパ球（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

害並びにそれらの組み合わせの両方のための、ＴＩＬ集団へのヌクレオチド挿入（ＲＮＡ又はＤＮＡ）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法も提供し、ここで、方法は、ＴＩＬを遺伝子編集することを含む。本発明に従う使用に適した、ＴＩＬ集団を遺伝子改変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する。

【０８４０】

[001075] 一部の実施形態において、方法は、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のステップを含むＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法を含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、レンチウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは、当該技術分野で公知であり、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77；Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75；Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71及び米国特許第６，６２７，４４２号に記載され、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入のステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入システムは、当該技術分野で公知であり、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入システムは、当該技術分野で公知であり、トランスポサーゼの長期発現がトランスジェニック細胞では発生しないように、トランスポサーゼがＤＮＡ発現ベクターとして又は発現可能なＲＮＡ若しくはタンパク質として提供されるシステム、例えば、ｍＲＮＡ（例えば、キャップとポリＡテールを含むｍＲＮＡ）として提供されるトランスポサーゼを含む。ＳＢ１０、ＳＢ１１、ＳＢ１００ｘなどのサケ科のＴｅｌ様トランスポサーゼ（ＳＢ又はSleeping Beautyトランスポサーゼ）を含む適切なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム及び酵素活性が向上した人工酵素は、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、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０８４１】

[001076] 一実施形態において、方法は、ＴＩＬ集団、例えば、本明細書に記載されるように、第１の集団、第２の集団及び／又は第３の集団を遺伝子改変する方法を含む。一実施形態において、ＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法は、１つ以上のタンパク質の産生又は阻害（例えば、サイレンシング）のための遺伝子の安定した組み込みのステップを含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306及び米国特許出願公開第２０１４／０２２７２３７　Ａ１号に記載され、そのそれぞれ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（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものなど、他の当該技術分野で公知のエレクトロポレーション法を使用し得る。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、無菌エレクトロポレーション法である。一実施形態において、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。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義され制御された恒久的又は一過性の変化を、変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、一連の少なくと

も３つのＤＣ電気パルスは、以下の特徴の１つ、２つ又は３つを有する。（１）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる；（２）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、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２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスの２つの第２のセットの第２のパルス間隔と異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義され制御された恒久的又は一過性の変化を、変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬの定義され制御された恒久的又は一過性の変化を、変更、操作又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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの単一のオペレーター制御の独立してプログラムされた一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、少なくとも３つのパルスの２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスの２つの第２のセットの第２のパルス間隔と異なる。一実施形態において、エレクトロポレーション法は、パルス電場でＴＩＬを処置して、ＴＩＬにおける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、これは、１００Ｖ／ｃｍ以上の電場強度を有する、少なくとも３つの一連のＤＣ電気パルスをＴＩＬに適用するステップを含み、ここで、一連の少なくとも３つのＤＣ電気パルスは、誘導された細孔が比較的長期間持続するように、且つＴＩＬの生存率が維持されるように、以下の特徴の１つ、２つ又は３つを有する。（１）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、パルス振幅が互いに異なる；（２）少なくとも３つのパルスの少なくとも２つは、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２つの第１のセットの第１のパルス間隔は、少なくとも３つのパルスの２つの第２のセットの第２のパルス間隔と異なる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションのステップを含む。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、当該技術分野で公知であり、例えば、Graham and van der Eb, Virology 1973, 52, 456-467；Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376；並びにChen and Okayarea, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752；並びに米国特許第５，５９３，８７５号に記載され、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬの集団を遺伝子改変する方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。濾過水中のカチオン性脂質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ライド（ＤＯＴＭＡ）及びジオレオイルホスフォチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）の１：１（ｗ／ｗ）リポソーム製剤を使用する方法などのリポソームトランスフェクション法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417並びに米国特許第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、そのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、ＴＩＬ集団を遺伝子改変する方法は、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（そのそれぞれ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たトランスフェクションのステップを含む。ＴＩＬは、本明細書に記載されるように、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団及び／又は第３のＴＩＬ集団であり得る。

【０８４２】

［001077］一実施形態によると、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における二本鎖又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。そのような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り、正確なゲノム編集を可能にする、即ち、それらは、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化し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。ＤＮＡにおける二本鎖切断により、その後、内因性修復機構が切断部位に動員されて、非相同末端結合（ＮＨＥＪ）又は相同性指向修復（ＨＤＲ）によるゲノム編集が媒介される。従って、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンシング、抑制又は増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらし得る。

【０８４３】

［001078］部位特異的なゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）及びＣＲＩＳＰＲ関連ヌクレアーゼ（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、ＤＮＡ認識のモードに基づいて、大きく２つのカテゴリに分類できる。ＺＦＮ及びＴＡＬＥＮはタンパク質－ＤＮＡ相互作用を介して特定のＤＮＡ結合を実現する一方、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鎖ＲＮＡガイド分子により、且つタンパク質－ＤＮＡ相互作用により、特定のＤＮＡ配列を標的化する。例えば、Cox et al., Nature Medicine, 2015, Vol. 21, No. 2を参照されたい。

【０８４４】

［001079］本発明のＴＩＬ拡大培養方法に従って使用され得る遺伝子編集方法の非限定的な例には、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法及びＺＦＮ法が含まれ、これらは以下により詳細に記載される。一実施形態によると、ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、ＧＥＮ３プロセス）に従い、又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、強化された治療効果を提供することができるＴＩＬを生成するために、ＣＲＩＳＰＲ法、ＴＡＬＥ法又はＺＦＮ法の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更に含む。一実施形態によると、遺伝子編集されたＴＩＬは、それらをインビトロで改変されていないＴＩＬと比較することにより、例えば、インビトロエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを未改変のＴＩＬと比較して評価することにより、改善された治療効果について評価され得る。特定の実施形態において、方法は、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥ及び／又はＺＦＮ法を使用して、ＴＩＬ集団を遺伝子編集することを含む。

【０８４５】

［001080］本発明の一部の実施形態において、エレクトロポレーションは、ＣＲＩＳＰＲ、ＴＡＬＥＮ及びＺＦＮシステムなどの遺伝子編集システムの送達に使用される。本発明の一部の実施形態において、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。本発明の一部の実施形態での使用に適した、適切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。BTX-Harvard Apparatusから入手できるAgilePulseシステム又はECM 830、Cellaxess Elektra（Cellectricon）、Nucleofector（Lonza／Amaxa）、GenePulser MXcell（BIORAD）、iPorator-96（Primax）又はsiPORTer96（Ambion）など、本発明での使用に適する可能性のあるいくつかの代替の市販のエレクトロポレーション機器が存在する。本発明の一部の実施形態において、エレクトロポレーションシステムは、残りのＴＩＬ拡大培

養方法により、閉鎖無菌システムを形成する。本発明の一部の実施形態において、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載されるようなパルスエレクトロポレーションシステムであり、残りのＴＩＬ拡大培養方法により、閉鎖無菌システムを形成する。

【０８４６】

[001081] ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセスＧＥＮ３）に従い、又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、ＣＲＩＳＰＲ法（例えば、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９又は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更に含む。特定の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養プロセス中の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の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。代わりに、ＴＩＬ拡大培養プロセス中の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の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部における増強を引き起こす。

【０８４７】

[001082] ＣＲＩＳＰＲは、「クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート」を表す。遺伝子編集のためにＣＲＩＳＰＲシステムを使用する方法は、本明細書ではＣＲＩＳＰＲ法とも称される。ＲＮＡ及びＣａｓタンパク質を組み込み、本発明に従って使用され得る３つのタイプのＣＲＩＳＰＲシステム：タイプＩ、ＩＩ及びＩＩＩが存在する。タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ（Ｃａｓ９により例示される）は、最もよく特徴付けられたシステムの１つである。

【０８４８】

[001083] ＣＲＩＳＰＲ技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の天然の防御機構から適応された。これらの生物は、ＣＲＩＳＰＲ由来ＲＮＡ及びＣａｓ９を含む様々なＣａｓタンパク質を使用して、外来の侵入者のＤＮＡを切り刻んで破壊することにより、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。ＣＲＩＳＰＲは、ヌクレオチド反復及びスペーサーの存在という２つの別個の特徴を有するＤＮＡの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、反復配列間に散在した外来ＤＮＡ（スペーサー）の短いセグメントを伴い、ＣＲＩＳＰＲ領域全体に分布する。タイプＩＩ　ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムでは、スペーサーがＣＲＩＳＰＲゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短鎖ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（ｃｒＲＮＡ）へと処理される。これらのｃｒＲＮＡは、トランス活性化ｃｒＲＮＡ（ｔｒａｃｒＲＮＡ）にアニーリングし、Ｃａｓタンパク質による病原性ＤＮＡの配列特異的な切断及びサイレンシングを指示する。Ｃａｓ９タンパク質による標的認識には、ｃｒＲＮＡ内の「シード」配列及びｃｒＲＮＡ結合領域の上流の保存されたジヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を要する。これにより、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、ｃｒＲＮＡを再設計することにより、実質的にあらゆるＤＮＡ配列を切断するために再標的化され得る。天然系におけるｃｒＲＮＡ及びｔｒａｃｒＲＮＡは、遺伝子工学での使用のために、およそ１００ヌクレオチドの単一ガイドＲＮＡ（ｓｇＲＮＡ）へと単純化できる。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼと必要なｃｒＲＮＡ成分とを発現するプラスミドの共送達により、ヒト細胞へ直接移植できる。標的化の制限を減少させるために、Ｃａｓタンパク質の異なるバリアントを使用し得る（例えば、Ｃｐｆ１などのＣａｓ９のオルソログ）。

【０８４９】

[001084] ＣＲＩＳＰＲ法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、Ｃ

ＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【０８５０】

[001085] ＣＲＩＳＰＲ法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。

【０８５１】

[001086] ＣＲＩＳＰＲ法により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、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，６９７，３５９号；同第８，９９３，２３３号；同第８，７９５，９６５号；同第８，７７１，９４５号；同第８，８８９，３５６号；同第８，８６５，４０６号；同第８，９９９，６４１号；同第８，９４５，８３９号；同第８，９３２，８１４号；同第８，８７１，４４５号；同第８，９０６，６１６号；及び同第８，８９５，３０８号に記載される。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１を発現するためのプラスミドなど、ＣＲＩＳＰＲ法を実行するための資源は、GenScriptなどの企業から市販されている。

【０８５２】

[001087] 一実施形態において、本明細書に記載されているようなＴＩＬ集団の遺伝子改変は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９７９０４９０号に記載されているＣＲＩＳＰＲ／Ｃｐｆ１システムを使用して実施され得る。

【０８５３】

[001088] ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセス２Ａ）に従い、又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、ＴＡＬＥ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。代わりに、ＴＩＬ拡大培養プロセス中のＴＡＬＥ法の使用は、１つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部における増強を引き起こす。

【０８５４】

[001089] ＴＡＬＥは、ＴＡＬＥＮ（「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」）を含む、「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ＴＡＬＥシステムを使用する方法は、本明細書ではＴＡＬＥ法とも称され得る。ＴＡＬＥは、植物病原菌キサントモナス（Xanthomonas）属からの天然に存在するタンパク質であり、それぞれが単一の塩基対を認識する一連の３３～３５アミノ酸の反復ドメインで構成されるＤＮＡ結合ドメインを含有する。ＴＡＬＥの特異性は、反復可変二残基（ＲＶＤ）として知られる２つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーＴＡＬＥリピートは、隣接するＤＮＡ配列を認識するために一緒に結合される。ＤＮＡ結合ドメインにおける特定のＲＶＤは、標的遺伝子座の塩基を認識し、予測可能なＤＮＡ結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。ＴＡＬＥのＤＮＡ結合ドメインは、タイプＩＩＳ ＦｏｋＩエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合され、標的化可能なＴＡＬＥヌクレアーゼが作製される。部位特異的変異を誘発するために、１４～２０塩基対のスペーサー領域で分離された２つの個々のＴＡＬＥＮアームがＦｏｋＩモノマーを近接させて、二量体化し、標的化された二本鎖切断を生成する。

【０８５５】

[001090] 様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模で体系的な研究は、ＴＡＬＥ反復を組み合わせて、実質的に任意のユーザー定義の配列を認識できることを示唆している。カスタム設計のＴＡＬＥアレイは、Cellectis Bioresearch（Paris, France）、Transposagen Biopharmaceuticals（Lexington, KY, USA）及びLife Technologies（Grand Island, NY, USA）からも市販されている。本発明における使用に適したＴＡＬＥ及びＴＡＬＥＮ法は、米国特許出願公開第２０１１／０２０１１１８　Ａ１号；第２０１３／０１１７８６９　Ａ１号；第２０１３／０３１５８８４　Ａ１号；第２０１５／０２０３８７１　Ａ１号及び第２０１６／０１２０９０６　Ａ１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。

【０８５６】

[001091] ＴＡＬＥ法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【０８５７】

[001092] ＴＡＬＥ法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。

【０８５８】

[001093] ＴＡＬＥ法により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、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第８，５８６，５２６号に記載される。

【０８５９】

[001094] ＴＩＬを治療用集団に拡大培養する方法は、本明細書に記載される方法の任意の実施形態（例えば、プロセスＧＥＮ３）に従い、又はＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１７／０５８６１０号、ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６０５号若しくはＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１８／０１２６３３号に記載されているように実施され得、ここで、方法は、ジンクフィンガー又はジンクフィンガーヌクレアーゼ法によってＴＩＬの少なくとも一部を遺伝子編集することを更に含む。特定の実施形態によると、ＴＩＬ拡大培養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の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部におけるサイレンシング又は低下を引き起こす。代わりに、ＴＩＬ拡大培養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の、治療用ＴＩＬ集団の少なくとも一部における増強を引き起こす。

【０８６０】

[001095] 個々のジンクフィンガーは、保存されたββα構造中におよそ３０のアミノ酸を含有する。α－ヘリックスの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、様々な選択性のレベルで、ＤＮＡの主要な溝の３ｂｐに接触する。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、真核生物の転写因子を含み、ジンクフィンガーを含有する、ＤＮＡ結合ドメインである。第２のドメインはヌクレアーゼドメインであり、ＦｏｋＩ制限酵素を含み、ＤＮＡの触媒的切断の原因となっている。

【０８６１】

[001096] 個々のＺＦＮのＤＮＡ結合ドメインは、典型的には、３～６個の個々のジン

クフィンガー反復を含み、それぞれ９～１８塩基対を認識できる。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１組の３フィンガーＺＦＮであっても、理論的には、哺乳動物ゲノムにおける単一の遺伝子座を標的とすることができる。新しいジンクフィンガーアレイを生成する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組み立てプロセスは、３塩基対のＤＮＡ配列をそれぞれ認識できる、３つの別個のジンクフィンガーを組み合わせて、９塩基対の標的部位を認識できる３フィンガーアレイを生成することを含む。代わりに、オリゴマー化プールエンジニアリング（ＯＰＥＮ）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間の状況依存的な相互作用を考慮した無作為化ライブラリーから新しいジンクフィンガーアレイを選択できる。操作されたジンクフィンガーは市販されている。Sangamo Biosciences（Richmond, CA, USA）は、Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, USA）と協力して、ジンクフィンガー構築のための適切なプラットフォーム（CompoZr（登録商標））を開発した。

【０８６２】

［001097］ジンクフィンガー法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することによりサイレンシング又は阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、ＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、ＬＡＧ－３、ＨＡＶＣＲ２（ＴＩＭ－３）、Ｃｉｓｈ、ＴＧＦβ、ＰＫＡ、ＣＢＬ－Ｂ、ＰＰＰ２ＣＡ、ＰＰＰ２ＣＢ、ＰＴＰＮ６、ＰＴＰＮ２２、ＰＤＣＤ１、ＢＴＬＡ、ＣＤ１６０、ＴＩＧＩＴ、ＣＤ９６、ＣＲＴＡＭ、ＬＡＩＲ１、ＳＩＧＬＥＣ７、ＳＩＧＬＥＣ９、ＣＤ２４４、ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ１０Ａ、ＣＡＳＰ８、ＣＡＳＰ１０、ＣＡＳＰ３、ＣＡＳＰ６、ＣＡＳＰ７、ＦＡＤＤ、ＦＡＳ、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ１０、ＳＫＩ、ＳＫＩＬ、ＴＧＩＦ１、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＨＭＯＸ２、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＥＩＦ２ＡＫ４、ＣＳＫ、ＰＡＧ１、ＳＩＴ１、ＦＯＸＰ３、ＰＲＤＭ１、ＢＡＴＦ、ＧＵＣＹ１Ａ２、ＧＵＣＹ１Ａ３、ＧＵＣＹ１Ｂ２及びＧＵＣＹ１Ｂ３が含まれる。

【０８６３】

［001098］ジンクフィンガー法を介してＴＩＬを恒久的に遺伝子編集することにより強化され得る遺伝子の非限定的な例には、ＣＣＲ２、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＸＣＲ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ－２、ＩＬ１２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１が含まれる。

【０８６４】

［001099］ジンクフィンガー法により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、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，５３４，２６１号、第６，６０７，８８２号、第６，７４６，８３８号、第６，７９４，１３６号、第６，８２４，９７８号、第６，８６６，９９７号、第６，９３３，１１３号、第６，９７９，５３９号、第７，０１３，２１９号、第７，０３０，２１５号、第７，２２０，７１９号、第７，２４１，５７３号、第７，２４１，５７４号、第７，５８５，８４９号、第７，５９５，３７６号、第６，９０３，１８５号及び第６，４７９，６２６号に記載される。

【０８６５】

［001100］ジンクフィンガー法により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、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【０８６６】

［001101］一部の実施形態において、ＴＩＬは任意選択により、限定はされないが、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２若しくはＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原を標的とするＴＣＲ又は腫瘍関連細胞表面分子（例えばメソテリン）若しくは系統限定的細胞表面分子（例えばＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含め、追加の機能性を含むように遺伝子改変される。特定の実施形態において、方法は、高親和性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）、例えば、ＭＡＧＥ－１、ＨＥＲ２若しくは

ＮＹ－ＥＳＯ－１などの腫瘍関連抗原を標的とするＴＣＲ又は腫瘍関連細胞表面分子（例えばメソテリン）若しくは系統限定的細胞表面分子（例えばＣＤ１９）に結合するキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むＴＩＬ集団を遺伝子改変することを含む。適切には、ＴＩＬ集団は、本明細書に記載されるように、第１の集団、第２の集団及び／又は第３の集団であり得る。

【０８６７】

ＸＩ．ＴＩＬ製造用閉鎖系

［００１１０２］本発明は、例えばＧｅｎ２又はＧｅｎ３プロセスと併せた、ＴＩＬ培養プロセス中の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／又は削減を可能にし、使用するフラスコの数が少なくなり、コスト削減が可能となる。一部の実施形態において、閉鎖系は２つの容器を使用する。

【０８６８】

［００１１０３］かかる閉鎖系は、当該技術分野で公知であり、例えば、http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm及びhttps://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.に記載されている。

【０８６９】

［００１１０４］滅菌接続装置（ＳＴＣＤ：Sterile Connecting Device）は、互換性のある２つの配管間に滅菌溶接を産生する。この手順により、様々な直径の容器及びチューブを滅菌接続できる。一部の実施形態において、閉鎖系は、記載されるようなルアーロック及びヒートシール系を含む。一部の実施形態において、系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、閉鎖系は滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。一部の実施形態において、本明細書に記載されるような閉鎖系が使用される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、本明細書に記載される方法に従って最終製品製剤容器中に製剤化される。

【０８７０】

［００１１０５］一部の実施形態において、閉鎖系は、腫瘍断片が得られた時点からＴＩＬが患者への投与又は凍結保存の準備が整うまで１つの容器を使用する。一部の実施形態において、２つの容器が使用される場合、第１の容器は閉鎖型Ｇコンテナであり、ＴＩＬ集団は遠心され、第１の閉鎖型Ｇコンテナを開かずに輸注バッグに移される。一部の実施形態において、２つの容器が使用される場合、輸注バッグは、HypoThermosol含有輸注バッグである。閉鎖系又は閉鎖ＴＩＬ細胞培養系は、腫瘍サンプル及び／又は腫瘍断片が追加されると、系が外側から確実に密閉され、細菌、真菌及び／又はその他の微生物汚染がない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

【０８７１】

［００１１０６］一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約５％～約１００％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約５％～約９５％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約５％～約９０％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約１０％～約９０％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は約１５％～約８５％である。一部の実施形態において、微生物汚染の減少は、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％又は約１００％である。

【０８７２】

［００１１０７］閉鎖系は、微生物汚染の不在下及び／又は大幅に減少させＴＩＬを成長させる。

【０８７３】

［００１１０８］更に、ＴＩＬ細胞培養環境のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧は、細胞が培養されるにつれてそれぞれ変化する。従って、たとえ細胞培養に適した培地が流通していても、ＴＩＬ成長に最適な環境として閉鎖環境を常に維持する必要がある。このため、閉鎖環境の培地内のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧の物理的要因は、センサーによっ

て監視され、そのセンサーの信号は、培養環境の入口に設置されたガス交換器の制御に使用され、閉鎖環境のガス分圧は、細胞培養環境を最適化するため、培地の変化に従ってリアルタイムで調整されることが望ましい。一部の実施形態において、本発明は、閉鎖環境への入口に、閉鎖環境のｐＨ、二酸化炭素分圧及び酸素分圧を測定し、監視装置からの信号に基づいてガス濃度を自動的に調整することにより、細胞培養環境を最適化する監視装置を備えたガス交換器を一体化した閉鎖細胞培養系を提供する。

【０８７４】

［００１１０９］ 一部の実施形態において、閉鎖環境内の圧力は連続的又は断続的に制御される。即ち、閉鎖環境内の圧力は、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、即ち、空間が、陽圧状態のＴＩＬの成長に適していることを保証するか、又は陰圧状態の流体の滲出を促進し、従って細胞成長を促進することを確実にする。更に、断続的に負圧を加えることにより、閉鎖環境の容積の一時的な収縮によって閉鎖環境内の循環液を均一且つ効率的に交換することが可能である。

【０８７５】

［００１１１０］ 一部の実施形態において、ＴＩＬの成長に最適な培養成分を置換又は追加することができ、ＩＬ－２及び／又はＯＫＴ３などの要因並びに組み合わせを追加し得る。

【０８７６】

ＸＩＩ．任意選択のＴＩＬ凍結保存

［００１１１１］ Ｇｅｎ２又はＧｅｎ３プロセスによって調製されたバルクＴＩＬ集団（例えば、第２のＴＩＬ集団）又は拡大培養されたＴＩＬ集団（例えば、第３のＴＩＬ集団）は、任意選択により凍結保存できる。一部の実施形態において、治療用ＴＩＬ集団で凍結保存が行われる。一部の実施形態において、凍結保存は、第２の拡大培養後に回収したＴＩＬで生じる。一部の実施形態において、図８５（特に例えば図８５Ｂ）の例示的ステップＦのＴＩＬで凍結保存が行われる。一部の実施形態において、ＴＩＬは輸注バッグ中に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、輸注バッグでの置換前に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、凍結保存されるが輸注バッグ中には置かれない。一部の実施形態において、凍結保存は凍結保存培地を使用して実施される。一部の実施形態において、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、概して、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）の中にＴＩＬ集団を入れることにより達成される。この溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間貯蔵し、任意選択で凍結保存のため気体窒素フリーザーに移す。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。

【０８７７】

［００１１１２］ 適切な場合、細胞をフリーザーから取り出し、３７℃の水浴中で溶液の約５分の４が解凍されるまで解凍する。細胞は概して完全培地中に再懸濁され、任意選択で１回以上洗浄される。一部の実施形態において、当該技術分野において公知の通り解凍ＴＩＬをカウントし、生存率に関して評価することができる。

【０８７８】

［００１１１３］ 好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団はＣＳ１０凍結保存培地（CryoStor 10、BioLife Solutions）を用いて凍結保存される。好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団は凍結保存培地（ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含有する）を用いて凍結保存される。好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団は、１：１（容積：容積）の比のＣＳ１０及び細胞培養培地を用いて凍結保存される。好ましい実施形態において、ＴＩＬの集団は、約１：１（容積：容積）の比のＣＳ１０及び細胞培養培地を使用し、更に追加のＩＬ－２を含んで凍結保存される。

【０８７９】

［００１１１４］ 上記で考察し、且つ図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供されるステップＡ～Ｅにおいて例示した通り、ＴＩＬ拡大培養プロセス全体を通じて数々の時点で凍結保存を行うことができる。一部の実施形態において、（例えば、図８５（特に、例えば図８

５Ｂ）のステップＤに従って提供される）第２の拡大培養後の拡大培養されたＴＩＬ集団は、凍結保存することができる。凍結保存は、概して、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）の中にＴＩＬ集団を置くことにより達成し得る。この溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、－８０℃で２４時間貯蔵し、任意選択により凍結保存のため気体窒素フリーザーに移す。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照されたい。一部の実施形態において、ＴＩＬは５％ＤＭＳＯ中に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは細胞培養培地＋５％ＤＭＳＯ中に凍結保存される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、本明細書に提供される方法に従い凍結保存される。

【０８８０】

[001115] 適切な場合、細胞をフリーザーから取り出し、３７℃の水浴中で溶液の約５分の４が解凍されるまで解凍する。細胞は概して完全培地中に再懸濁され、任意選択で１回以上洗浄される。一部の実施形態において、当該技術分野において公知の通り解凍ＴＩＬをカウントし、生存率に関して評価することができる。

【０８８１】

[001116] ある場合には、ステップＢのＴＩＬ集団は、以下で考察するプロトコルを用いて直ちに凍結保存することができる。代わりに、バルクＴＩＬ集団にステップＣ及びステップＤを施し、ステップＤ後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾ＴＩＬを治療に使用する場合、ステップＢ又はステップＤのＴＩＬ集団は、適切な処置のため遺伝子修飾の対象となり得る。

【０８８２】

ＸＩＩＩ．拡大培養したＴＩＬの表現型特徴

[001117] 一部の実施形態において、ＴＩＬは拡大培養後に、本明細書及び実施例に記載されるものを含め、多数の表現型マーカーの発現に関して分析される。一実施形態において、１つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。一部の実施形態において、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＢの第１の拡大培養後に分析される。一部の実施形態において、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＣの移行中に分析される。一部の実施形態において、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＣに係る移行中且つ凍結保存後に分析される。一部の実施形態において、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＤに係る第２の拡大培養後に分析される。一部の実施形態において、ＴＩＬの表現型特徴は、ステップＤに係る２回以上の拡大培養後に分析される。

【０８８３】

[001118] 一部の実施形態において、マーカーは、ＣＤ８及びＣＤ２８からなる群から選択される。一部の実施形態において、ＣＤ８の発現が調べられる。一部の実施形態において、ＣＤ２８の発現が調べられる。一部の実施形態において、ＣＤ８及び／又はＣＤ２８の発現は、他のプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生したＴＩＬにおいて、より高い（例えば、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される、２Ａプロセスと比較して、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される、Ｇｅｎ３プロセス）。一部の実施形態において、ＣＤ８の発現は、他のプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生したＴＩＬにおいて、より高い（例えば、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される、２Ａプロセスと比較して、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される、Ｇｅｎ３プロセス）。一部の実施形態において、ＣＤ２８の発現は、他のプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生したＴＩＬにおいて、より高い（例えば、例えば図８５（特に、例えば図８５Ａ）に提供される、２Ａプロセスと比較して、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される、Ｇｅｎ３プロセス）。一実施形態において、１つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【０８８４】

[001119] 一実施形態において、第１のＴＩＬ集団、第２のＴＩＬ集団、第３のＴＩＬ集団又はＣＤ８及び／又はＣＤ２８発現に基づく回収ＴＩＬの選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を拡大培養する方法のいずれのステップ中も実施されない。

【０８８５】
［001120］一部の実施形態において、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生したＴＩＬにおいて、より高い（例えば、例えば図８５（特に、例えば図８５Ａ）に提供される、２Ａプロセスと比較して、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供される、Ｇｅｎ３プロセス）。一部の実施形態において、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、ＣＣＲ７及びＣＤ６２Ｌからなる群から選択される。
【０８８６】
［001121］一実施形態において、再刺激ＴＩＬは、サイトカイン遊離アッセイを用いてサイトカイン遊離に関しても判定することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）分泌について評価され得る。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、ＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に提供されるように、ステップＤ後の第２の急速拡大培養後のＥＬＩＳＡアッセイによって測定される。一部の実施形態において、ＴＩＬの健康はＩＦＮーガンマ（ＩＦＮ－γ）分泌によって測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は活性ＴＩＬの指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能のもう１つの尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、ＣＤ３、ＣＤ２８及びＣＤ１３７／４－１ＢＢに対する抗体で刺激されたＴＩＬの培地中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することで測定できる。これらの刺激したＴＩＬからの培地中のＩＦＮ－γレベルは、ＩＦＮ－γ遊離を測定することにより決定できる。一部の実施形態において、図８５（特に、例えば図８５Ａ）で提供される２Ａプロセスの、例えばステップＤと比較した、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）ＴＩＬで提供されるＧｅｎ３プロセスの、例えばステップＤにおける、ＩＦＮ－γ産生の増加は、ステップＤのＴＩＬの細胞傷害性の可能性の増加を示す。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は１倍、２倍、３倍、４倍又は５倍以上増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は１倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は２倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は３倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は４倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は５倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γはQuantikine ELISA kitを使用して測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γはＴＩＬエキソビボで測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法（例えば、図８５Ｂの方法を含む）により作製されたＴＩＬを含む、ＴＩＬエキソビボにおいて測定される。
【０８８７】
［001122］Ｔ及びＢリンパ球の多様な抗原受容体は、限られてい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。Ｖ（可変）、Ｄ（多様性）、Ｊ（結合）及びＣ（定数）の遺伝子セグメントは、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側での適用を決定する。本発明は、Ｔ細胞レパートリーの多様性を示し、増加させるＴＩＬを生成する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法により得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに回収したＴＩＬ及び／又は例えば、図８５（特に、と他えば、図８５Ｂ）に具体化された方法以外の方法を含む、本明細書で提供する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。一部の実施形態において、図８５（特に、例えば図８５Ａ）に例示されているように、本方法によって得られたＴＩＬは、新たに回収したＴＩＬ及び／又はプロセス２Ａ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。一部の実施形態において、第１の拡大培養で得られたＴＩＬは、Ｔ細胞レパートリー多様性の増加を示す。一部の実施形態において、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び／又はＴ細胞受容体の多様性の増加である。一部の実施形態において、免疫グロブリンの多様性は、免疫グロブリン重鎖にある。一部の実施形態において、免疫グロブリンの

多様性は、免疫グロブリン軽鎖にある。一部の実施形態において、多様性はＴ細胞受容体にある。一部の実施形態において、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１つにある。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファ及び／又はベータの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）アルファの発現が増加する。一部の実施形態において、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）ベータの発現が増加する。一部の実施形態において、ＴＣＲａｂ（即ちＴＣＲα／β）の発現が増加する。一部の実施形態において、本明細書に記載されるプロセス（例えば、Ｇｅｎ３プロセス）は、他のプロセス、例えば、サンプル内のユニークなペプチドＣＤＲの数に基づいてＧｅｎ２と称されるプロセス（例えば、図１２～１４を参照されたい）と比較して、より高いクローン多様性を示す。

【０８８８】

［001123］一部の実施形態において、表現型の特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【０８８９】

ＸＩＶ．追加のプロセスの実施形態

［001124］一部の実施形態において、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法を提供し、この方法は、（ａ）対象からの１つ以上の腫瘍断片又はコアから第１のＴＩＬ集団を得ること；（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り、第１の初回刺激拡大培養を実施することであって、第１の初回刺激拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約１～１７日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より多い、実施すること；（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り、第２の急速拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の急速拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１日間～１１日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；及び（ｄ）ステップ（ｃ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することを含む。一部の実施形態において、第２の急速拡大培養のステップは、（１）第２のＴＩＬ集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ内の小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（２）第２のＴＩＬ集団を小スケール培養物から第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばG-REX 500MCSコンテナに移すことにより、培養物のスケールアップを達成するために複数のステップに分割され、ここで、第２の容器において、小スケール培養物からの第２のＴＩＬ集団は、より大きいスケールの培養物中で、約４～７日間の期間にわたり培養される。一部の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（１）第２のＴＩＬ集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、第１の小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（２）第１の小スケール培養物からの第２のＴＩＬ集団を、サイズが第１の容器と同じである、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の第２の容器に移し、配分することにより、培養物のスケールアウトを達成するために複数のステップに分割され、ここで、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された第１の小スケール培養物からの第２のＴＩＬ集団の一部は、約４～７日間の期間にわたり、第２の小スケール培養物中で培養される。一部の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（１）第２のＴＩＬ集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（２）第１の小スケール培養物からの第２のＴＩＬ集団を、サイズが第１の容器（例えば、G-REX 500MCSコンテナ）よりも大きい、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の第２の容器に移し、配分することにより、培養物のスケールアウト及びスケールアップを達成するために複数のステップに分割され、ここで、各第２の容器において、小スケール培養物からそのような第２の容器へ移された第２のＴＩＬ集団の一部は、約４～７日間の期

間にわたり、より大きいスケールの培養物中で培養される。一部の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（１）第２のＴＩＬ集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、小スケール培養物中で約４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（２）第１の小スケール培養物からの第２のＴＩＬ集団を、サイズが第１の容器（例えば、G-REX 500MCSコンテナ）よりも大きい、少なくとも２、３又は４個の第２の容器に移し、配分することにより、培養物のスケールアウト及びスケールアップを達成するために複数のステップに分割され、ここで、各第２の容器において、小スケール培養物からそのような第２の容器へ移された第２のＴＩＬ集団の一部は、約５日間の期間にわたり、より大きいスケールの培養物中で培養される。

【０８９０】

[001125] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、第１のＴＩＬ集団を、外因性の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を更に含む培養培地に接触させることによって実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）の培養培地中のＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）の培養培地中のＡＰＣの数よりも大きい。

【０８９１】

[001126] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において培養培地に追加の外因性のＡＰＣが補充されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９２】

[001127] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２０：１又は約２０：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９３】

[001128] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～１０：１又は約１０：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９４】

[001129] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～９：１又は約９：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９５】

[001130] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～８：１又は約８：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９６】

[001131] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～７：１又は約７：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９７】

[001132] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～６：１又は約６：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９８】

[001133] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～５：１又は約５：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０８９９】

[001134] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～４：１又は約４：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれか１つに記載された方法を提供する。

【０９００】

[001135] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～３：１又は約３：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０１】

[001136] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．９：１又は約２．９：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０２】

[001137] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．８：１又は約２．８：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０３】

[001138] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．７：１又は約２．７：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０４】

[001139] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．６：１又は約２．６：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０５】

[001140] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．５：１又は約２．５：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０６】

[001141] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．４：１又は約２．４：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０７】

[001142] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．３：１又は約２．３：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０８】

[001143] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．２：１又は約２．２：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９０９】

[001144] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２．１：１又は約２．１：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１０】

[001145] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１又は約１．１：１～２：１又は約２：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１１】

[001146] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～１０：１又は約１０：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１２】

[001147] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～５：１又は約５：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１３】

[001148] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～４：１又は約４：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１４】

[001149] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～３：１又は約３：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１５】

[001150] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．９：１又は約２．９：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１６】

[001151] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．８：１又は約２．８：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１７】

[001152] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．７：１又は約２．７：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１８】

[001153] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．６：１又は約２．６：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９１９】

[001154] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．５：１又は約２．５：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２０】

[001155] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．４：１又は約２．４：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２１】

[001156] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．３：１又は約２．３：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２２】

[001157] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．２：１又は約２．２：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２３】

[001158] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１～２．１：１又は約２．１：１の範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２４】

[001159] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、２：１又は約２：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２５】

[001160] 別の実施形態において、本発明は、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数と、ステップ（ｂ）で添加されたＡＰＣの数との比が、１．１：１若しくは約１．１：１、１．２：１若しくは約１．２：１、１．３：１若しくは約１．３：１、１．４：１若しくは約１．４：１、１．５：１若しくは約１．５：１、１．６：１若しくは約１．６：１、１．７：１若しくは約１．７：１、１．８：１若しくは約１．８：１、１．９：１若しくは約１．９：１、２：１若しくは約２：１、２．１：１若しくは約２．１：１、２．２：１若しくは約２．２：１、２．３：１若しくは約２．３：１、２．４：１若しくは約２．４：１、２．５：１若しくは約２．５：１、２．６：１若しくは約２．６：１、２．７：１若しくは約２．７：１、２．８：１若しくは約２．８：１、２．９：１若しくは約２．９：１、３：１若しくは約３：１、３．１：１若しくは約３．１：１、３．２：１若しくは約３．２：１、３．３：１若しくは約３．３：１、３．４：１若しくは約３．４：１、３．５：１若しくは約３．５：１、３．６：１若しくは約３．６：１、３．７：１若しくは約３．７：１、３．８：１若しくは約３．８：１、３．９：１若しくは約３．９：１、４：１若しくは約４：１、４．１：１若しくは約４．１：１、４．２：１若しくは約４．２：１、４．３：１若しくは約４．３：１、４．４：１若しくは約４．４：１、４．５：１若しくは約４．５：１、４．６：１若しくは約４．６：１、４．７：１若しくは

約４．７：１、４．８：１若しくは約４．８：１、４．９：１若しくは約４．９：１又は５：１若しくは５：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２６】

［００１１６１］ 別の実施形態において、本発明は、最初の第１の拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、１×１０^{8}若しくは約１×１０^{8}、１．１×１０^{8}若しくは約１．１×１０^{8}、１．２×１０^{8}若しくは約１．２×１０^{8}、１．３×１０^{8}若しくは約１．３×１０^{8}、１．４×１０^{8}若しくは約１．４×１０^{8}、１．５×１０^{8}若しくは約１．５×１０^{8}、１．６×１０^{8}若しくは約１．６×１０^{8}、１．７×１０^{8}若しくは約１．７×１０^{8}、１．８×１０^{8}若しくは約１．８×１０^{8}、１．９×１０^{8}若しくは約１．９×１０^{8}、２×１０^{8}若しくは約２×１０^{8}、２．１×１０^{8}若しくは約２．１×１０^{8}、２．２×１０^{8}若しくは約２．２×１０^{8}、２．３×１０^{8}若しくは約２．３×１０^{8}、２．４×１０^{8}若しくは約２．４×１０^{8}、２．５×１０^{8}若しくは約２．５×１０^{8}、２．６×１０^{8}若しくは約２．６×１０^{8}、２．７×１０^{8}若しくは約２．７×１０^{8}、２．８×１０^{8}若しくは約２．８×１０^{8}、２．９×１０^{8}若しくは約２．９×１０^{8}、３×１０^{8}若しくは約３×１０^{8}、３．１×１０^{8}若しくは約３．１×１０^{8}、３．２×１０^{8}若しくは約３．２×１０^{8}、３．３×１０^{8}若しくは約３．３×１０^{8}、３．４×１０^{8}若しくは約３．４×１０^{8}又は３．５×１０^{8}若しくは約３．５×１０^{8}ＡＰＣであり、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、３．５×１０^{8}若しくは約３．５×１０^{8}、３．６×１０^{8}若しくは約３．６×１０^{8}、３．７×１０^{8}若しくは約３．７×１０^{8}、３．８×１０^{8}若しくは約３．８×１０^{8}、３．９×１０^{8}若しくは約３．９×１０^{8}、４×１０^{8}若しくは約４×１０^{8}、４．１×１０^{8}若しくは約４．１×１０^{8}、４．２×１０^{8}若しくは約４．２×１０^{8}、４．３×１０^{8}若しくは約４．３×１０^{8}、４．４×１０^{8}若しくは約４．４×１０^{8}、４．５×１０^{8}若しくは約４．５×１０^{8}、４．６×１０^{8}若しくは約４．６×１０^{8}、４．７×１０^{8}若しくは約４．７×１０^{8}、４．８×１０^{8}若しくは約４．８×１０^{8}、４．９×１０^{8}若しくは約４．９×１０^{8}、５×１０^{8}若しくは約５×１０^{8}、５．１×１０^{8}若しくは約５．１×１０^{8}、５．２×１０^{8}若しくは約５．２×１０^{8}、５．３×１０^{8}若しくは約５．３×１０^{8}、５．４×１０^{8}若しくは約５．４×１０^{8}、５．５×１０^{8}若しくは約５．５×１０^{8}、５．６×１０^{8}若しくは約５．６×１０^{8}、５．７×１０^{8}若しくは約５．７×１０^{8}、５．８×１０^{8}若しくは約５．８×１０^{8}、５．９×１０^{8}若しくは約５．９×１０^{8}、６×１０^{8}若しくは約６×１０^{8}、６．１×１０^{8}若しくは約６．１×１０^{8}、６．２×１０^{8}若しくは約６．２×１０^{8}、６．３×１０^{8}若しくは約６．３×１０^{8}、６．４×１０^{8}若しくは約６．４×１０^{8}、６．５×１０^{8}若しくは約６．５×１０^{8}、６．６×１０^{8}若しくは約６．６×１０^{8}、６．７×１０^{8}若しくは約６．７×１０^{8}、６．８×１０^{8}若しくは約６．８×１０^{8}、６．９×１０^{8}若しくは約６．９×１０^{8}、７×１０^{8}若しくは約７×１０^{8}、７．１×１０^{8}若しくは約７．１×１０^{8}、７．２×１０^{8}若しくは約７．２×１０^{8}、７．３×１０^{8}若しくは約７．３×１０^{8}、７．４×１０^{8}若しくは約７．４×１０^{8}、７．５×１０^{8}若しくは約７．５×１０^{8}、７．６×１０^{8}若しくは約７．６×１０^{8}、７．７×１０^{8}若しくは約７．７×１０^{8}、７．８×１０^{8}若しくは約７．８×１０^{8}、７．９×１０^{8}若しくは約７．９×１０^{8}、８×１０^{8}若しくは約８×１０^{8}、８．１×１０^{8}若しくは約８．１×１０^{8}、８．２×１０^{8}若しくは約８．２×１０^{8}、８．３×１０^{8}若しくは約８．３×１０^{8}、８．４×１０^{8}若しくは約８．４×１０^{8}、８．５×１０^{8}若しくは約８．５×１０^{8}、８．６×１０^{8}若しくは約８．６×１０^{8}、８．７×１０^{8}若しくは約８．７×１０^{8}、８．８×１０^{8}若しくは約８．８×１０^{8}、８．９×１０^{8}若しくは約８．９×１０^{8}、９×１０^{8}若しくは約９×１０^{8}、９．１×１０^{8}若しくは約９．１×１０^{8}、９．２×１０^{8}若しくは約９．２×１０^{8}、９．３×１０^{8}若しくは約９．３×１０^{8}、９．４×１０^{8}若しくは約９．４×１０^{8}、９．５×１０^{8}若しくは約９．５×１０^{8}、９．６×１０^{8}若しくは約９．６×１０^{8}、９．７×１０^{8}若しくは約９．７×１０^{8}、９．８×１０^{8}若しくは約９．８×１０^{8}、９．９×１０^{8}若しくは約９．９×１０^{8}又は１×１０^{9}若しくは約１×１０^{9}ＡＰＣである。ように

変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２７】

［００１１６２］ 別の実施形態において、本発明は、最初の第１の拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、１×１０^{8}又は約１×１０^{8}ＡＰＣ～３．５×１０^{8}又は約３．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、３．５×１０^{8}又は約３．５×１０^{8}ＡＰＣ～１×１０^{9}又は約１×１０^{9}ＡＰＣの範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２８】

［００１１６３］ 別の実施形態において、本発明は、最初の第１の拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、１．５×１０^{8}又は約１．５×１０^{8}ＡＰＣ～３×１０^{8}又は約３×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、４×１０^{8}又は約４×１０^{8}ＡＰＣ～７．５×１０^{8}又は約７．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９２９】

［００１１６４］ 別の実施形態において、本発明は、最初の第１の拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、２×１０^{8}又は約２×１０^{8}ＡＰＣ～２．５×１０^{8}又は約２．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択され、第２の急速拡大培養で添加されたＡＰＣの数が、４．５×１０^{8}又は約４．５×１０^{8}ＡＰＣ～５．５×１０^{8}又は約５．５×１０^{8}ＡＰＣの範囲から選択されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３０】

［００１１６５］ 別の実施形態において、本発明は、２．５×１０^{8}又は約２．５×１０^{8}個のＡＰＣが、最初の第１の拡大培養に添加され、５×１０^{8}又は約５×１０^{8}個のＡＰＣが、第２の急速拡大培養に添加されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３１】

［００１１６６］ 別の実施形態において、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核球（ＰＢＭＣ）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３２】

［００１１６７］ 別の実施形態において、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、そのそれぞれの容器において第１のＴＩＬ集団がステップ（ａ）で得られ、第２のＴＩＬ集団がステップ（ｂ）で得られ、第３のＴＩＬ集団がステップ（ｃ）で得られ、ステップ（ｃ）の複数の容器からの治療用ＴＩＬ集団を併せて、ステップ（ｄ）から回収されるＴＩＬ集団が得られるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３３】

［００１１６８］ 別の実施形態において、本発明は、第１のＴＩＬ集団が、ステップ（ａ）において対象からの複数の腫瘍断片又はコアから入手されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３４】

［００１１６９］ 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３５】

［００１１７０］ 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３６】

［００１１７１］ 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３７】

[001172] 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３８】

[001173] 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９３９】

[001174] 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４０】

[001175] 別の実施形態において、本発明は、複数の別個の容器が、少なくとも２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、１０個、１１個、１２個、１３個、１４個、１５個、１６個、１７個、１８個、１９個又は２０個の別個の容器を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４１】

[001176] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）で第１のＴＩＬ集団に対して第１の初回刺激拡大培養が実施される各容器について、ステップ（ｃ）における第２の急速拡大培養が、そのような第１のＴＩＬ集団から産生された第２のＴＩＬ集団に対して同じ容器内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４２】

[001177] 別の実施形態において、本発明は、別個の容器がそれぞれ第１のガス透過性表面積を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４３】

[001178] 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４４】

[001179] 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４５】

[001180] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣは、第１のガス透過性表面積上に、１又は約１の細胞層～３又は約３の細胞層の厚さ平均で積層される。

【０９４６】

[001181] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、１．５又は約１．５の細胞層～２．５又は約２．５の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９４７】

[001182] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、２又は約２の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更され

た、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９４８】
［001183］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、１若しくは約１、１．１若しくは約１．１、１．２若しくは約１．２、１．３若しくは約１．３、１．４若しくは約１．４、１．５若しくは約１．５、１．６若しくは約１．６、１．７若しくは約１．７、１．８若しくは約１．８、１．９若しくは約１．９、２若しくは約２、２．１若しくは約２．１、２．２若しくは約２．２、２．３若しくは約２．３、２．４若しくは約２．４、２．５若しくは約２．５、２．６若しくは約２．６、２．７若しくは約２．７、２．８若しくは約２．８、２．９若しくは約２．９又は３若しくは約３の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９４９】
［001184］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、３又は約３の細胞層～１０又は約１０の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５０】
［001185］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、４又は約４の細胞層～８又は約８の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５１】
［001186］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９又は１０若しくは約１０の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５２】
［001187］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、４若しくは約４、４．１若しくは約４．１、４．２若しくは約４．２、４．３若しくは約４．３、４．４若しくは約４．４、４．５若しくは約４．５、４．６若しくは約４．６、４．７若しくは約４．７、４．８若しくは約４．８、４．９若しくは約４．９、５若しくは約５、５．１若しくは約５．１、５．２若しくは約５．２、５．３若しくは約５．３、５．４若しくは約５．４、５．５若しくは約５．５、５．６若しくは約５．６、５．７若しくは約５．７、５．８若しくは約５．８、５．９若しくは約５．９、６若しくは約６、６．１若しくは約６．１、６．２若しくは約６．２、６．３若しくは約６．３、６．４若しくは約６．４、６．５若しくは約６．５、６．６若しくは約６．６、６．７若しくは約６．７、６．８若しくは約６．８、６．９若しくは約６．９、７若しくは約７、７．１若しくは約７．１、７．２若しくは約７．２、７．３若しくは約７．３、７．４若しくは約７．４、７．５若しくは約７．５、７．６若しくは約７．６、７．７若しくは約７．７、７．８若しくは約７．８、７．９若しくは約７．９又は８若しくは約８の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５３】
［001188］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１の初回刺激拡大培養が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で実施され、ステップ（ｃ）において、第２の急速拡大培養が、第２のガス透過性表面積を含む第２の容器内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５４】
［001189］ 別の実施形態において、本発明は、第２の容器が第１の容器よりも大きくな

るように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５５】
［001190］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１の初回刺激拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣは、第１のガス透過性表面積上に、１又は約１の細胞層～３又は約３の細胞層の厚さ平均で積層される。
【０９５６】
［001191］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、１．５又は約１．５の細胞層～２．５又は約２．５の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５７】
［001192］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、２又は約２の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５８】
［001193］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、１若しくは約１、１．１若しくは約１．１、１．２若しくは約１．２、１．３若しくは約１．３、１．４若しくは約１．４、１．５若しくは約１．５、１．６若しくは約１．６、１．７若しくは約１．７、１．８若しくは約１．８、１．９若しくは約１．９、２若しくは約２、２．１若しくは約２．１、２．２若しくは約２．２、２．３若しくは約２．３、２．４若しくは約２．４、２．５若しくは約２．５、２．６若しくは約２．６、２．７若しくは約２．７、２．８若しくは約２．８、２．９若しくは約２．９又は３若しくは約３の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９５９】
［001194］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第２のガス透過性表面積上に、３又は約３の細胞層～１０又は約１０の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９６０】
［001195］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第２のガス透過性表面積上に、４又は約４の細胞層～８又は約８の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９６１】
［001196］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第２のガス透過性表面積上に、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９又は１０若しくは約１０の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９６２】
［001197］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第２のガス透過性表面積上に、４若しくは約４、４．１若しくは約４．１、４．２若しくは約４．２、４．３若しくは約４．３、４．４若しくは約４．４、４．５若しくは約４．５、４．６若しくは約４．６、４．７若しくは約４．７、４．８若しくは約４．８、４．９若しくは約４．９、５若しくは約５、５．１若しくは約５．１、５．２若しくは約５．２

、５．３若しくは約５．３、５．４若しくは約５．４、５．５若しくは約５．５、５．６若しくは約５．６、５．７若しくは約５．７、５．８若しくは約５．８、５．９若しくは約５．９、６若しくは約６、６．１若しくは約６．１、６．２若しくは約６．２、６．３若しくは約６．３、６．４若しくは約６．４、６．５若しくは約６．５、６．６若しくは約６．６、６．７若しくは約６．７、６．８若しくは約６．８、６．９若しくは約６．９、７若しくは約７、７．１若しくは約７．１、７．２若しくは約７．２、７．３若しくは約７．３、７．４若しくは約７．４、７．５若しくは約７．５、７．６若しくは約７．６、７．７若しくは約７．７、７．８若しくは約７．８、７．９若しくは約７．９又は８若しくは約８の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９６３】

[001198] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１の初回刺激拡大培養が、第１のガス透過性表面積を含む第１の容器内で実施され、ステップ（ｃ）において、第２の急速拡大培養が、第１の容器内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９６４】

[001199] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣは、第１のガス透過性表面積上に、１又は約１の細胞層～３又は約３の細胞層の厚さ平均で積層される。

【０９６５】

[001200] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、１．５又は約１．５の細胞層～２．５又は約２．５の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９６６】

[001201] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、２又は約２の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９６７】

[001202] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、１若しくは約１、１．１若しくは約１．１、１．２若しくは約１．２、１．３若しくは約１．３、１．４若しくは約１．４、１．５若しくは約１．５、１．６若しくは約１．６、１．７若しくは約１．７、１．８若しくは約１．８、１．９若しくは約１．９、２若しくは約２、２．１若しくは約２．１、２．２若しくは約２．２、２．３若しくは約２．３、２．４若しくは約２．４、２．５若しくは約２．５、２．６若しくは約２．６、２．７若しくは約２．７、２．８若しくは約２．８、２．９若しくは約２．９又は３若しくは約３の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９６８】

[001203] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、３又は約３の細胞層～１０又は約１０の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９６９】

[001204] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、４又は約４の細胞層～８又は約８の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供す

る。
【０９７０】
［001205］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しくは約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９又は１０若しくは約１０の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９７１】
［001206］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）において、ＡＰＣが、第１のガス透過性表面積上に、４若しくは約４、４．１若しくは約４．１、４．２若しくは約４．２、４．３若しくは約４．３、４．４若しくは約４．４、４．５若しくは約４．５、４．６若しくは約４．６、４．７若しくは約４．７、４．８若しくは約４．８、４．９若しくは約４．９、５若しくは約５、５．１若しくは約５．１、５．２若しくは約５．２、５．３若しくは約５．３、５．４若しくは約５．４、５．５若しくは約５．５、５．６若しくは約５．６、５．７若しくは約５．７、５．８若しくは約５．８、５．９若しくは約５．９、６若しくは約６、６．１若しくは約６．１、６．２若しくは約６．２、６．３若しくは約６．３、６．４若しくは約６．４、６．５若しくは約６．５、６．６若しくは約６．６、６．７若しくは約６．７、６．８若しくは約６．８、６．９若しくは約６．９、７若しくは約７、７．１若しくは約７．１、７．２若しくは約７．２、７．３若しくは約７．３、７．４若しくは約７．４、７．５若しくは約７．５、７．６若しくは約７．６、７．７若しくは約７．７、７．８若しくは約７．８、７．９若しくは約７．９又は８若しくは約８の細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【０９７２】
［001207］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：１０又は約１：１０の範囲から選択される。
【０９７３】
［001208］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：９又は約１：９の範囲から選択される。
【０９７４】
［001209］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：８又は約１：８の範囲から選択される。
【０９７５】
［001210］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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

ることによって実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：７又は約１：７の範囲から選択される。

【０９７６】

[001211] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：６又は約１：６の範囲から選択される。

【０９７７】

[001212] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：５又は約１：５の範囲から選択される。

【０９７８】

[001213] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：４又は約１：４の範囲から選択される。

【０９７９】

[001214] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：３又は約１：３の範囲から選択される。

【０９８０】

[001215] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１又は約１：１．１～１：２又は約１：２の範囲から選択される。

【０９８１】

[001216] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ

）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．２又は約１：１．２～１：８又は約１：８の範囲から選択される。

【０９８２】

［００１２１７］　別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．３又は約１：１．３～１：７又は約１：７の範囲から選択される。

【０９８３】

［００１２１８］　別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．４又は約１：１．４～１：６又は約１：６の範囲から選択される。

【０９８４】

［００１２１９］　別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．５又は約１：１．５～１：５又は約１：５の範囲から選択される。

【０９８５】

［００１２２０］　別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．６又は約１：１．６～１：４又は約１：４の範囲から選択される。

【０９８６】

［００１２２１］　別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．７又は約１：１．７～１：３．５又は約１：３．５の範囲から選択される。

【０９８７】

［００１２２２］　別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．８又は約１：１．

８～１：３又は約１：３の範囲から選択される。

【０９８８】

［001223］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．９又は約１：１．９～１：２．５又は約１：２．５の範囲から選択される。

【０９８９】

［001224］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：２又は約１：２の範囲から選択される。

【０９９０】

［001225］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、最初の第１の拡大培養が、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実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供し、ここで、ステップ（ｃ）で添加されたＡＰＣの数は、ステップ（ｂ）で追加されたＡＰＣの数よりも大きく、ステップ（ｂ）で積層されたＡＰＣの平均層数と、ステップ（ｃ）で積層されたＡＰＣの平均層数との比は、１：１．１若しくは約１：１．１、１：１．２若しくは約１：１．２、１：１．３若しくは約１：１．３、１：１．４若しくは約１：１．４、１：１．５若しくは約１：１．５、１：１．６若しくは約１：１．６、１：１．７若しくは約１：１．７、１：１．８若しくは約１：１．８、１：１．９若しくは約１：１．９、１：２若しくは約１：２、１：２．１若しくは約１：２．１、１：２．２若しくは約１：２．２、１：２．３若しくは約１：２．３、１：２．４若しくは約１：２．４、１：２．５若しくは約１：２．５、１：２．６若しくは約１：２．６、１：２．７若しくは約１：２．７、１：２．８若しくは約１：２．８、１：２．９若しくは約１：２．９、１：３若しくは約１：３、１：３．１若しくは約１：３．１、１：３．２若しくは約１：３．２、１：３．３若しくは約１：３．３、１：３．４若しくは約１：３．４、１：３．５若しくは約１：３．５、１：３．６若しくは約１：３．６、１：３．７若しくは約１：３．７、１：３．８若しくは約１：３．８、１：３．９若しくは約１：３．９、１：４若しくは約１：４、１：４．１若しくは約１：４．１、１：４．２若しくは約１：４．２、１：４．３若しくは約１：４．３、１：４．４若しくは約１：４．４、１：４．５若しくは約１：４．５、１：４．６若しくは約１：４．６、１：４．７若しくは約１：４．７、１：４．８若しくは約１：４．８、１：４．９若しくは約１：４．９、１：５若しくは約１：５、１：５．１若しくは約１：５．１、１：５．２若しくは約１：５．２、１：５．３若しくは約１：５．３、１：５．４若しくは約１：５．４、１：５．５若しくは約１：５．５、１：５．６若しくは約１：５．６、１：５．７若しくは約１：５．７、１：５．８若しくは約１：５．８、１：５．９若しくは約１：５．９、１：６若しくは約１：６、１：６．１若しくは約１：６．１、１：６．２若しくは約１：６．２、１：６．３若しくは約１：６．３、１：６．４若しくは約１：６．４、１：６．５若しくは約１：６．５、１：６．６若しくは約１：６．６、１：６．７若しくは約１：６．７、１：６．８若しくは約１：６．８、１：６．９若しくは約１：６．９、１：７若しくは約１：７、１：７．１若しくは約１：７．１、１：７．２若しくは約１：７．２、１：７．３若しくは約１：７．３、１：７．４若しくは約１：７．４、１：７．５若しくは約１：７．５、１：７．６若しくは約１：７．６、１：７．７若しくは約１：７．７、１：７．

８若しくは約１：７．８、１：７．９若しくは約１：７．９、１：８若しくは約１：８、１：８．１若しくは約１：８．１、１：８．２若しくは約１：８．２、１：８．３若しくは約１：８．３、１：８．４若しくは約１：８．４、１：８．５若しくは約１：８．５、１：８．６若しくは約１：８．６、１：８．７若しくは約１：８．７、１：８．８若しくは約１：８．８、１：８．９若しくは約１：８．９、１：９若しくは約１：９、１：９．１若しくは約１：９．１、１：９．２若しくは約１：９．２、１：９．３若しくは約１：９．３、１：９．４若しくは約１：９．４、１：９．５若しくは約１：９．５、１：９．６若しくは約１：９．６、１：９．７若しくは約１：９．７、１：９．８若しくは約１：９．８、１：９．９若しくは約１：９．９又は１：１０若しくは約１：１０から選択される。

【０９９１】

[001226] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団のＴＩＬ数との比が、１．５：１又は約１．５：１～１００：１又は約１００：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９２】

[001227] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団のＴＩＬ数との比が、５０：１又は約５０：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９３】

[001228] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団のＴＩＬ数との比が、２５：１又は約２５：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９４】

[001229] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団のＴＩＬ数との比が、２０：１又は約２０：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９５】

[001230] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団中のＴＩＬ数と第１のＴＩＬ集団のＴＩＬ数との比が、１０：１又は約１０：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９６】

[001231] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団より数が少なくとも５０倍又は約５０倍多くなるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９７】

[001232] 別の実施形態において、本発明は、第２のＴＩＬ集団が、第１のＴＩＬ集団より数が、少なくとも１倍若しくは約１倍、２倍若しくは約２倍、３倍若しくは約３倍、４倍若しくは約４倍、５倍若しくは約５倍、６倍若しくは約６倍、７倍若しくは約７倍、８倍若しくは約８倍、９倍若しくは約９倍、１０倍若しくは約１０倍、１１倍若しくは約１１倍、１２倍若しくは約１２倍、１３倍若しくは約１３倍、１４倍若しくは約１４倍、１５倍若しくは約１５倍、１６倍若しくは約１６倍、１７倍若しくは約１７倍、１８倍若しくは約１８倍、１９倍若しくは約１９倍、２０倍若しくは約２０倍、２１倍若しくは約２１倍、２２倍若しくは約２２倍、２３倍若しくは約２３倍、２４倍若しくは約２４倍、２５倍若しくは約２５倍、２６倍若しくは約２６倍、２７倍若しくは約２７倍、２８倍若しくは約２８倍、２９倍若しくは約２９倍、３０倍若しくは約３０倍、３１倍若しくは約３１倍、３２倍若しくは約３２倍、３３倍若しくは約３３倍、３４倍若しくは約３４倍、３５倍若しくは約３５倍、３６倍若しくは約３６倍、３７倍若しくは約３７倍、３８倍若しくは約３８倍、３９倍若しくは約３９倍、４０倍若しくは約４０倍、４１倍若しくは約４１倍、４２倍若しくは約４２倍、４３倍若しくは約４３倍、４４倍若しくは約４４倍、

４５倍若しくは約４５倍、４６倍若しくは約４６倍、４７倍若しくは約４７倍、４８倍若しくは約４８倍、４９倍若しくは約４９倍又は５０倍若しくは約５０倍多くなるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９８】

[001233] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）における第２の期間の開始から２日若しくは約２日又は３日又は約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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【０９９９】

[001234] 別の実施形態において、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｄ）の回収されたＴＩＬ集団を凍結保存するステップを更に含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０００】

[001235] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｄ）後、（ｅ）ステップ（ｄ）における回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグ（任意選択によりHypothermosolを含有する）に移す追加のステップを実施することを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００１】

[001236] 別の実施形態において、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｅ）における回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存するステップを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００２】

[001237] 別の実施形態において、本発明は、凍結保存プロセスが、回収されたＴＩＬ集団と凍結保存培地との比は比率１：１を使用して実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００３】

[001238] 別の実施形態において、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核球（ＰＢＭＣ）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００４】

[001239] 別の実施形態において、本発明は、ＰＢＭＣが、照射され、且つ同種異系であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００５】

[001240] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）で細胞培養物に添加されるＡＰＣの総数が2.5×10^{8}であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００６】

[001241] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）で細胞培養物に添加されるＡＰＣの総数が5×10^{8}であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００７】

[001242] 別の実施形態において、本発明は、ＡＰＣがＰＢＭＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００８】

[001243] 別の実施形態において、本発明は、ＰＢＭＣが、照射され、且つ同種異系であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１００９】

[001244] 別の実施形態において、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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１０】

［001245］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｄ）の回収が、膜ベースの細胞プロセスシステムを使用して実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１１】

［001246］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｄ）の回収が、LOVO細胞プロセスシステムを使用して実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１２】

［001247］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり５又は約５～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１３】

［001248］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり１０又は約１０～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１４】

［001249］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり１５又は約１５～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１５】

［001250］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり２０又は約２０～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１６】

［001251］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり２５又は約２５～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１７】

［001252］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり３０又は約３０～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１８】

［001253］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり３５又は約３５～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０１９】

［001254］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり４０又は約４０～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２０】

［001255］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり４５又は約４５～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２１】

［001256］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数の断片が、１容器あたり５０又は約５０～６０又は約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２２】

［001257］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、複数のコア又は断片が、１容器あたり、２若しくは約２、３若しくは約３、４若しくは約４、５若しく

は約５、６若しくは約６、７若しくは約７、８若しくは約８、９若しくは約９、１０若しくは約１０、１１若しくは約１１、１２若しくは約１２、１３若しくは約１３、１４若しくは約１４、１５若しくは約１５、１６若しくは約１６、１７若しくは約１７、１８若しくは約１８、１９若しくは約１９、２０若しくは約２０、２１若しくは約２１、２２若しくは約２２、２３若しくは約２３、２４若しくは約２４、２５若しくは約２５、２６若しくは約２６、２７若しくは約２７、２８若しくは約２８、２９若しくは約２９、３０若しくは約３０、３１若しくは約３１、３２若しくは約３２、３３若しくは約３３、３４若しくは約３４、３５若しくは約３５、３６若しくは約３６、３７若しくは約３７、３８若しくは約３８、３９若しくは約３９、４０若しくは約４０、４１若しくは約４１、４２若しくは約４２、４３若しくは約４３、４４若しくは約４４、４５若しくは約４５、４６若しくは約４６、４７若しくは約４７、４８若しくは約４８、４９若しくは約４９、５０若しくは約５０、５１若しくは約５１、５２若しくは約５２、５３若しくは約５３、５４若しくは約５４、５５若しくは約５５、５６若しくは約５６、５７若しくは約５７、５８若しくは約５８、５９若しくは約５９又は６０若しくは約６０のコア又は断片を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２３】

[001258] 別の実施形態において、本発明は、各コア又は断片が、１mm^3又は約１mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２４】

[001259] 別の実施形態において、本発明は、各コア又は断片が、１mm^3又は約１mm^3～１０mm^3又は約１０mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２５】

[001260] 別の実施形態において、本発明は、各コア断片が、１mm^3又は約１mm^3～９mm^3又は約９mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２６】

[001261] 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１mm^3又は約１mm^3～８mm^3又は約８mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２７】

[001262] 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１mm^3又は約１mm^3～７mm^3又は約７mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２８】

[001263] 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１mm^3又は約１mm^3～６mm^3又は約６mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０２９】

[001264] 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１mm^3又は約１mm^3～５mm^3又は約５mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３０】

[001265] 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１mm^3又は約１mm^3～４mm^3又は約４mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３１】

[001266] 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１mm^3又は約１mm^3～３mm^3又は約３mm^3の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいず

れかに記載された方法を提供する。

【１０３２】

［００１２６７］ 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１ｍｍ^{3}又は約１ｍｍ^3～２ｍｍ^{3}又は約２ｍｍ^{3}の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３３】

［００１２６８］ 別の実施形態において、本発明は、各断片が、１ｍｍ^{3}若しくは約１ｍｍ^3、２ｍｍ^{3}若しくは約２ｍｍ^3、３ｍｍ^{3}若しくは約３ｍｍ^3、４ｍｍ^{3}若しくは約４ｍｍ^3、５ｍｍ^{3}若しくは約５ｍｍ^3、６ｍｍ^{3}若しくは約６ｍｍ^3、７ｍｍ^{3}若しくは約７ｍｍ^3、８ｍｍ^{3}若しくは約８ｍｍ^3、９ｍｍ^{3}若しくは約９ｍｍ^{3}又は１０ｍｍ^{3}若しくは約１０ｍｍ^{3}の体積を有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３４】

［００１２６９］ 別の実施形態において、本発明は、細胞培養培地が、Ｇコンテナ又はXuri細胞培養バッグである容器内に提供されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３５】

［００１２７０］ 別の実施形態において、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が、約１０，０００ＩＵ／ｍＬ～約５，０００ＩＵ／ｍＬであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３６】

［００１２７１］ 別の実施形態において、本発明は、細胞培養培地中のＩＬ－２濃度が、約６，０００ＩＵ／ｍＬであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３７】

［００１２７２］ 別の実施形態において、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３８】

［００１２７３］ 別の実施形態において、本発明は、凍結保存培地が７％～１０％のＤＭＳＯを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０３９】

［００１２７４］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間が、１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間、７日間若しくは約７日間、８日間若しくは約８日間、９日間若しくは約９日間、１０日間若しくは約１０日間、１１日間若しくは約１１日間、１２日間若しくは約１２日間、１３日間若しくは約１３日間、１４日間若しくは約１４日間、１５日間若しくは約１５日間、１６日間若しくは約１６日間又は１７日間若しくは約１７日間の期間内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４０】

［００１２７５］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）の第２の期間が、１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間、７日間若しくは約７日間、８日間若しくは約８日間、９日間若しくは約９日間、１０日間若しくは約１０日間又は１１日間若しくは約１１日間の期間内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４１】

［００１２７６］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間及びステッ

プ（ｃ）の第２の期間が、それぞれ個別に１日間若しくは約１日間、２日間若しくは約２日間、３日間若しくは約３日間、４日間若しくは約４日間、５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間、７日間若しくは約７日間、８日間若しくは約８日間、９日間若しくは約９日間、１０日間若しくは約１０日間、１１日間若しくは約１１日間又は１２日間若しくは約１２日間の期間内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４２】

［001277］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間及びステップ（ｃ）の第２の期間が、それぞれ個別に５日間若しくは約５日間、６日間若しくは約６日間、７日間若しくは約７日間、８日間若しくは約８日間、９日間若しくは約９日間、１０日間若しくは約１０日間、１１日間若しくは約１１日間又は１２日間若しくは約１２日間の期間内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４３】

［001278］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）の第１の期間及びステップ（ｃ）の第２の期間が、それぞれ個別に７日間若しくは約７日間の期間内で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４４】

［001279］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１４日又は約１４日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４５】

［001280］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１５日又は約１５日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４６】

［001281］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１６日又は約１６日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４７】

［001282］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１７日又は約１７日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４８】

［001283］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１８日又は約１８日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０４９】

［001284］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１９日又は約１９日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５０】

［001285］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２０日又は約２０日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５１】

［001286］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２１日又は約２１日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５２】

［００１２８７］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２２日又は約２２日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５３】

［００１２８８］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２３日又は約２３日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５４】

［００１２８９］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２４日又は約２４日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５５】

［００１２９０］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２５日又は約２５日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５６】

［００１２９１］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２６日又は約２６日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５７】

［００１２９２］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２７日又は約２７日～２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５８】

［００１２９３］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１４日又は約１４日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０５９】

［００１２９４］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１５日又は約１５日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０６０】

［００１２９５］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１６日又は約１６日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０６１】

［００１２９６］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１７日又は約１７日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０６２】

［００１２９７］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１８日又は約１８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０６３】

［００１２９８］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１９日又は約１９日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０６４】

［００１２９９］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２０日又は約２０日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載

された方法を提供する。
【１０６５】
［001300］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２１日又は約２１日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０６６】
［001301］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２２日又は約２２日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０６７】
［001302］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２３日又は約２３日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０６８】
［001303］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２４日又は約２４日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０６９】
［001304］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２５日又は約２５日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７０】
［001305］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２６日又は約２６日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７１】
［001306］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２７日又は約２７日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７２】
［001307］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２８日又は約２８日で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７３】
［001308］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計１６日又は約１６日以下で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７４】
［001309］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２０日又は約２０日以下で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７５】
［001310］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２４日又は約２４日以下で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７６】
［001311］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）～（ｄ）が、合計２８日又は約２８日以下で実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１０７７】

[001312] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｄ）で回収した治療用ＴＩＬ集団中が、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０７８】

[001313] 別の実施形態において、本発明は、治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数が、２．３×１０^{10}又は約２．３×１０^{10}～１３．７×１０^{10}又は約１３．７×１０^{10}個であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０７９】

[001314] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団が、有効性の増加、インターフェロンガンマ産生の増加及び／又はポリクローナル性の増加を提供するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８０】

[001315] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）における第３のＴＩＬ集団が、１６日間より長いプロセスにより調製されたＴＩＬと比較して、少なくとも１倍～５倍多いか又はそれを超える、インターフェロンガンマ産生を提供するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８１】

[001316] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｃ）の第３のＴＩＬ集団から得られたエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞が、ステップ（ｂ）の第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ８及びＣＤ２８発現の増加を呈するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８２】

[001317] 別の実施形態において、本発明は、本方法で列挙される各容器が、閉鎖容器であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８３】

[001318] 別の実施形態において、本発明は、本方法で列挙される各容器が、Ｇ－コンテナであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８４】

[001319] 別の実施形態において、本発明は、本方法で列挙される各容器が、GREX-10であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８５】

[001320] 別の実施形態において、本発明は、本方法で列挙される各容器が、GREX-100であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８６】

[001321] 別の実施形態において、本発明は、本方法で列挙される各容器が、GREX-500であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１０８７】

[001322] 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療用集団を提供する。

【１０８８】

[001323] 別の実施形態において、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）の治療用集団を提供し、ここで、治療用ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞

（ＡＰＣ）又はＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調製されたＴＩＬと比較して、有効性の増加、インターフェロンガンマ産生の増加及び／又はポリクローナル性の増加を提供する。

【１０８９】

［001324］別の実施形態において、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）の治療用集団を提供し、ここで、治療用ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調製されたＴＩＬと比較して、有効性の増加、インターフェロンガンマ産生の増加及び／又はポリクローナル性の増加を提供する。

【１０９０】

［001325］別の実施形態において、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）の治療用集団を提供し、ここで、治療用ＴＩＬ集団は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調製されたＴＩＬと比較して、有効性の増加、インターフェロンガンマ産生の増加及び／又はポリクローナル性の増加を提供する。

【１０９１】

［001326］別の実施形態において、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）の治療用集団を提供し、ここで、治療用ＴＩＬ集団は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せず、且つＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調製されたＴＩＬと比較して、有効性の増加、インターフェロンガンマ産生の増加及び／又はポリクローナル性の増加を提供する。

【１０９２】

［001327］別の実施形態において、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）の治療用集団を提供し、ここで、治療用ＴＩＬ集団は、１６日間より長いプロセスによって調製されたＴＩＬと比較して、有効性の増加、インターフェロンガンマ産生の増加及び／又はポリクローナル性の増加を提供する。

【１０９３】

［001328］別の実施形態において、本発明は、インターフェロンガンマ産生の増加を提供する、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。

【１０９４】

［001329］別の実施形態において、本発明は、ポリクローナル性の増加を提供する、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。

【１０９５】

［001330］別の実施形態において、本発明は、有効性の増加を提供する、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。

【１０９６】

［001331］別の実施形態において、本発明は、治療用ＴＩＬ集団が、１６日間より長いプロセスにより調製された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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。

【１０９７】

［001332］別の実施形態において、本発明は、治療用ＴＩＬ集団が、１６日間より長いプロセスにより調製された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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。

【１０９８】

［001333］別の実施形態において、本発明は、治療用ＴＩＬ集団が、１６日間より長いプロセスにより調製された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変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。

【１０９９】
［001334］別の実施形態において、本発明は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調整された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）の治療用集団を提供する。
【１１００】
［001335］別の実施形態において、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調整された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）の治療用集団を提供する。
【１１０１】
［001336］別の実施形態において、本発明は、ＡＰＣを添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調整された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、治療用ＴＩＬ集団を提供する。
【１１０２】
［001337］別の実施形態において、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調整された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、治療用ＴＩＬ集団を提供する。
【１１０３】
［001338］別の実施形態において、本発明は、ＡＰＣを添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調整された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、治療用ＴＩＬ集団を提供する。
【１１０４】
［001339］別の実施形態において、本発明は、ＯＫＴ３を添加せずにＴＩＬの第１の拡大培養を実施するプロセスにより調整された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、治療用ＴＩＬ集団を提供する。
【１１０５】
［001340］別の実施形態において、本発明は、（ａ）第１のＴ細胞集団を培養して、増殖をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を初回刺激することにより、ドナーから入手した腫瘍断片又はコアから得られた第１のＴ細胞集団の第１の初回刺激拡大培養を実施すること；（ｂ）ステップ（ａ）で初回刺激された第１のＴ細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第２のＴ細胞集団を得るために、第１のＴ細胞集団を培養して、増殖をもたらし、第１のＴ細胞集団の活性化を追加刺激することにより、第１のＴ細胞集団の第２の急速拡大培養を実施すること；及び（ｃ）第２のＴ細胞集団を回収することを含む、Ｔ細胞を拡大培養する方法を提供する。別の実施形態において、第２の急速拡大培養のステップは、（ａ）第１のＴ細胞集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ内の小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）第１のＴ細胞集団を小スケール培養物から第１の容器よりも大きい第２の容器、例えばG-REX 500MCSコンテナに移し、小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団を、第２の容器内のより大きいスケールの培養物中で、約４～７日間の期間にわたり培養することにより、培養物のスケールアップを達成するために複数のステップに分割される。別の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（ａ）第１のＴ細胞集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、第１の小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）第１の小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団を、サイズが第１の容器と同じである、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の第２の容器に移し、配分することであって、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された第１の小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団の一部は、約４～７日間の期間にわたり、第２の小スケール培養物中で培養されることにより、培養物のスケールアウトを達成するために複数のステップに分割さ

れる。別の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（ａ）第１のＴ細胞集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、小スケール培養物中で約３～４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団を、サイズが第１の容器（例えば、G-REX 500MCSコンテナ）よりも大きい、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９又は２０個の第２の容器に移し、配分することであって、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団の一部は、約４～７日間の期間にわたり、より大きいスケール培養物中で培養されることにより、培養物のスケールアウト及びスケールアップを達成するために複数のステップに分割される。別の実施形態において、急速拡大培養のステップは、（ａ）第１のＴ細胞集団を第１の容器、例えばG-REX 100MCSコンテナ中、小スケール培養物中で約４日間の期間にわたり培養することにより、第２の急速拡大培養を実施すること、次いで（ｂ）小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団を、サイズが第１の容器（例えば、G-REX 500MCSコンテナ）よりも大きい、２、３又は４個の第２の容器に移し、配分することであって、各第２の容器において、そのような第２の容器に移された小スケール培養物からの第１のＴ細胞集団の一部は、約５日間の期間にわたり、より大きいスケール培養物中で培養されることにより、培養物のスケールアウト及びスケールアップを達成するために複数のステップに分割される。

【１１０６】

[001341] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）の第１の初回刺激拡大培養が、最大１７日間の期間中に実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１０７】

[001342] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）の第２の急速拡大培養が、最大１１日間の期間中に実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１０８】

[001343] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）の第１の初回刺激拡大培養が、１７日間の期間中に実施され、ステップ（ｂ）の第２の急速拡大培養が、最大９日間の期間中に実施されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１０９】

[001344] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、ＯＫＴ－３及びＩＬ－２を含む第１の培養培地で培養されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１０】

[001345] 別の実施形態において、本発明は、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１１】

[001346] 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む第２の培養培地で培養されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１２】

[001347] 別の実施形態において、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の培養培地で培養され、第１の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第１の抗原提示細胞（ＡＰＣ）集団を含み、第１のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーにとって外因性であり、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に積層され、ステップ（ｂ）において、第１のＴ細胞集団が、容器内

の第２の培養培地で培養され、第２の培養培地が、ＯＫＴ－３、ＩＬ－２及び第２のＡＰＣ集団を含み、第２のＡＰＣ集団が、第１のＴ細胞集団のドナーにとって外因性であり、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に積層され、第２のＡＰＣ集団が、第１のＡＰＣ集団よりも大きいように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１３】

［００１３４８］ 別の実施形態において、本発明は、第２のＡＰＣ集団のＡＰＣの数と、第１のＡＰＣ集団のＡＰＣの数との比が、約２：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１４】

［００１３４９］ 別の実施形態において、本発明は、第１のＡＰＣ集団のＡＰＣの数が、２．５×１０^{8}であり、第２のＡＰＣ集団のＡＰＣの数が、５×１０^{8}であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１５】

［００１３５０］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に、２層のＡＰＣの細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１６】

［００１３５１］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、第１のガス透過性表面上に、４～８層のＡＰＣから選択される細胞層の厚さ平均で積層されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１７】

［００１３５２］ 別の実施形態において、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積層されたＡＰＣの層の平均数と、ステップ（ａ）において第１のガス透過性表面上に積層されたＡＰＣの層の平均数との比が、２：１であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１８】

［００１３５３］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１１９】

［００１３５４］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１２０】

［００１３５５］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１２１】

［００１３５６］ 別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１２２】
［001357］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１２３】
［001358］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１２４】
［001359］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１２５】
［001360］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１２６】
［001361］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約１．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約４．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約２．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約７．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１２７】
［001362］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約１．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約３．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約６．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１２８】
［001363］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約３．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}～５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約５．５×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の範囲から選択された濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【１１２９】
［001364］別の実施形態において、本発明は、ステップ（ａ）において、第１のＡＰＣ集団が、２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約２．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の濃度で、第１のガス透過性表面上に播種され、ステップ（ｂ）において、第２のＡＰＣ集団が、４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}又は約４．０×１０^{6}ＡＰＣ／ｃｍ^{2}の濃度で、第１のガス透過性表面上に播種されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１３０】
［001365］別の実施形態において、本発明は、ＡＰＣが末梢血単核球（ＰＢＭＣ）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１３１】
［001366］別の実施形態において、本発明は、ＰＢＭＣが、照射され、且つ第１のＴ細胞集団のドナーに対して外因性であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１３２】
［001367］別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞が、腫瘍浸潤リンパ球であり、ステップ（ａ）において、第１のＴ細胞集団が、第１のＴＩＬ集団であり、ステップ（ｂ）において、第２のＴ細胞集団が、第２のＴＩＬ集団であり、第２のＴＩＬ集団が、治療用ＴＩＬ集団であり、ステップ（ｃ）において、治療用ＴＩＬ集団が回収されるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１３３】
［001368］別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞が骨髄浸潤リンパ球（ＭＩＬ）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１３４】
［001369］別の実施形態において、本発明は、Ｔ細胞表現型がＣＤ３＋及びＣＤ４５＋であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された方法を提供する。
【１１３５】
ＸＶ．医薬組成物、投薬量及び投与レジメン
［001370］一実施形態において、本開示の方法を使用して拡大培養したＴＩＬは医薬組成物として患者に投与される。一実施形態において、医薬組成物は滅菌緩衝液中のＴＩＬの懸濁液である。本開示のＰＢＭＣを使用して拡大培養したＴＩＬは、当該技術分野において公知の通りの任意の好適な経路によって投与され得る。一部の実施形態において、Ｔ細胞は単回動脈内又は静脈内注入として投与され、これは好ましくは約３０～６０分間継続される。他の適切な投与経路には、腹腔内投与、髄腔内投与及びリンパ管内投与が含まれる。
【１１３６】
［001371］任意の適切な用量のＴＩＬを投与することができる。一部の実施形態において、特に癌が黒色腫である場合、平均が約７．８×１０^{10}個のＴＩＬである約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一実施形態において、約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約３×１０^{10}～約１２×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約５×１０^{10}～約８×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約６×１０^{10}～約８×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、約７×１０^{10}～約８×１０^{10}個のＴＩＬが投与される。一部の実施形態において、治療有効投与量は約２．３×１０^{10}～約１３．７×１０^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、特に、癌が黒色腫である場合、治療有効投与量は約７．８×１０^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は約１．２×１０^{10}～約４．３×１０^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は約３×１０^{10}～約１２×１０^{1}

^{0}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は約４×１０^{10}～約１０×１０^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は約５×１０^{10}～約８×１０^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は約６×１０^{10}～約８×１０^{10}個のＴＩＬである。一部の実施形態において、治療有効投与量は約７×１０^{10}～約８×１０^{10}個のＴＩＬである。

【１１３７】

[001372] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの数は、約１×１０^{6}、２×１０^{6}、３×１０^{6}、４×１０^{6}、５×１０^{6}、６×１０^{6}、７×１０^{6}、８×１０^{6}、９×１０^{6}、１×１０^{7}、２×１０^{7}、３×１０^{7}、４×１０^{7}、５×１０^{7}、６×１０^{7}、７×１０^{7}、８×１０^{7}、９×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、３×１０^{8}、４×１０^{8}、５×１０^{8}、６×１０^{8}、７×１０^{8}、８×１０^{8}、９×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、３×１０^{9}、４×１０^{9}、５×１０^{9}、６×１０^{9}、７×１０^{9}、８×１０^{9}、９×１０^{9}、１×１０^{10}、２×１０^{10}、３×１０^{10}、４×１０^{10}、５×１０^{10}、６×１０^{10}、７×１０^{10}、８×１０^{10}、９×１０^{10}、１×１０^{11}、２×１０^{11}、３×１０^{11}、４×１０^{11}、５×１０^{11}、６×１０^{11}、７×１０^{11}、８×１０^{11}、９×１０^{11}、１×１０^{12}、２×１０^{12}、３×１０^{12}、４×１０^{12}、５×１０^{12}、６×１０^{12}、７×１０^{12}、８×１０^{12}、９×１０^{12}、１×１０^{13}、２×１０^{13}、３×１０^{13}、４×１０^{13}、５×１０^{13}、６×１０^{13}、７×１０^{13}、８×１０^{13}及び９×１０^{13}個である。一実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの数は、１ｘ１０^{6}～５ｘ１０^{6}、５ｘ１０^{6}～１ｘ１０^{7}、１ｘ１０^{7}～５ｘ１０^{7}、５ｘ１０^{7}～１ｘ１０^{8}、１ｘ１０^{8}～５ｘ１０^{8}、５ｘ１０^{8}～１ｘ１０^{9}、１ｘ１０^{9}～５ｘ１０^{9}、５ｘ１０^{9}～１ｘ１０^{10}、１ｘ１０^{10}～５ｘ１０^{10}、５ｘ１０^{10}～１ｘ１０^{11}、５ｘ１０^{11}～１ｘ１０^{12}、１ｘ１０^{12}～５ｘ１０^{12}及び５ｘ１０^{12}～１ｘ１０^{13}個の範囲内である。

【１１３８】

[001373] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、例えば、医薬組成物の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％、０．０００１％又はｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖより低い。

【１１３９】

[001374] 一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１９．７５％、１９．５０％、１９．２５％、１９％、１８．７５％、１８．５０％、１８．２５％、１８％、１７．７５％、１７．５０％、１７．２５％、１７％、１６．７５％、１６．５０％、１６．２５％、１６％、１５．７５％、１５．５０％、１５．２５％、１５％、１４．７５％、１４．５０％、１４．２５％、１４％、１３．７５％、１３．５０％、１３．２５％、１３％、１２．７５％、１２．５０％、１２．２５％、１２％、１１．７５％、１１．５０％、１１．２５％、１１％、１０．７５％、１０．５０％、１０．２５％、１０％、９．７５％、９．５０％、９．２５％、９％、８．７５％、８．５０％、８．２５％、８％、７．７５％、７．５０％、７．２５％、７％、６．７５％、６．５０％、６．２５％、６％、５．７５％、５．５０％、５．２５％、５％、４．７５％、４．５０％、４．２５％、４％、３．７５％、３．５０％、３．２５％、３％、２．７５％、２．５０％、２．２５％、２％、１．７５％、１．５０％、１２５％、１％、０．５％、０．４％、０．３％、０．２％、０．１％、０．０９％、０．０８％、０．０７％

、０．０６％、０．０５％、０．０４％、０．０３％、０．０２％、０．０１％、０．００９％、０．００８％、０．００７％、０．００６％、０．００５％、０．００４％、０．００３％、０．００２％、０．００１％、０．０００９％、０．０００８％、０．０００７％、０．０００６％、０．０００５％、０．０００４％、０．０００３％、０．０００２％又は０．０００１％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖより高い。

【１１４０】

［００１３７５］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の約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％又は約１％～約１０％ｗ／ｗ、ｗ／ｖ又はｖ／ｖの範囲内である。

【１１４１】

［００１３７６］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの濃度は、医薬組成物の約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又はｖ／ｖの範囲内である。

【１１４２】

［００１３７７］一部の実施形態において、本発明の医薬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又は０．０００１ｇ以下である。

【１１４３】

［００１３７８］一部の実施形態において、本発明の医薬組成物中に提供されるＴＩＬの量は、０．０００１ｇ、０．０００２ｇ、０．０００３ｇ、０．０００４ｇ、０．０００５ｇ、０．０００６ｇ、０．０００７ｇ、０．０００８ｇ、０．０００９ｇ、０．００１ｇ、０．００１５ｇ、０．００２ｇ、０．００２５ｇ、０．００３ｇ、０．００３５ｇ、０．００４ｇ、０．００４５ｇ、０．００５ｇ、０．００５５ｇ、０．００６ｇ、０．００６５ｇ、０．００７ｇ、０．００７５ｇ、０．００８ｇ、０．００８５ｇ、０．００９ｇ、０．００９５ｇ、０．０１ｇ、０．０１５ｇ、０．０２ｇ、０．０２５ｇ、０．０３ｇ、０．０３５ｇ、０．０４ｇ、０．０４５ｇ、０．０５ｇ、０．０５５ｇ、０．０６ｇ、０．０６５ｇ、０．０７ｇ、０．０７５ｇ、０．０８ｇ、０．０８５ｇ、０．０９ｇ、０．０９５ｇ、０．１ｇ、０．１５ｇ、０．２ｇ、０．２５ｇ、０．３ｇ、０．３５ｇ、０．４ｇ、０．４５ｇ、０．５ｇ、０．５５ｇ、０．６ｇ、０．６５ｇ、０．７ｇ、０．７５ｇ、０．８ｇ、０．８５ｇ、０．９ｇ、０．９５ｇ、１ｇ、１．５ｇ、２ｇ、２．５、３ｇ、３．５、４ｇ、４．５ｇ、５ｇ、５．５ｇ、６ｇ、６．５ｇ、７ｇ、７．５ｇ、８ｇ、８．５ｇ、９ｇ、９．５ｇ又は１０ｇ超である。

【１１４４】

［００１３７９］本発明の医薬組成物において提供される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、処置されるべき対

象の性別及び年齢、処置されるべき対象の体重並びに担当医の選好及び経験に依存するであろう。臨床的に確立されたＴＩＬの投与量も適切な場合には使用され得る。ＴＩＬの投与量など、本明細書の方法を使用して投与される医薬組成物の量は、処置されるヒト又は哺乳動物、疾患又は状態の重症度、投与速度、活性医薬成分の性質及び処方医の裁量に依存するであろう。

【１１４５】

[001380] 一部の実施形態において、ＴＩＬは単回投与で投与され得る。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。一部の実施形態において、ＴＩＬは複数回投与で投与され得る。投与は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回又は６回を超え得る。投与は、月に１回、２週間に１回、週に１回又は隔日に１回であり得る。ＴＩＬの投与は必要な限り継続し得る。

【１１４６】

[001381] 一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、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}個である。一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、$1x10^{6}$～$5x10^{6}$、$5x10^{6}$～$1x10^{7}$、$1x10^{7}$～$5x10^{7}$、$5x10^{7}$～$1x10^{8}$、$1x10^{8}$～$5x10^{8}$、$5x10^{8}$～$1x10^{9}$、$1x10^{9}$～$5x10^{9}$、$5x10^{9}$～$1x10^{10}$、$1x10^{10}$～$5x10^{10}$、$5x10^{10}$～$1x10^{11}$、$5x10^{11}$～$1x10^{12}$、$1x10^{12}$～$5x10^{12}$及び$5x10^{12}$～$1x10^{13}$個の範囲内である。

【１１４７】

[001382] 一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約４．３ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約３．２ｍｇ／ｋｇ、約０．３５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約２．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約０．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．３ｍｇ／ｋｇ、約０．３ｍｇ／ｋｇ～約１．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．４５ｍｇ／ｋｇ～約１ｍｇ／ｋｇ、約０．５５ｍｇ／ｋｇ～約０．８５ｍｇ／ｋｇ、約０．６５ｍｇ／ｋｇ～約０．８ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約０．７５ｍｇ／ｋｇ、約０．７ｍｇ／ｋｇ～約２．１５ｍｇ／ｋｇ、約０．８５ｍｇ／ｋｇ～約２ｍｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ～約１．８５ｍｇ／ｋｇ、約１．１５ｍｇ／ｋｇ～約１．７ｍｇ／ｋｇ、約１．３ｍｇ／ｋｇｍｇ～約１．６ｍｇ／ｋｇ、約１．３５ｍｇ／ｋｇ～約１．５ｍｇ／ｋｇ、約２．１５ｍｇ／ｋｇ～約３．６ｍｇ／ｋｇ、約２．３ｍｇ／ｋｇ～約３．４ｍｇ／ｋｇ、約２．４ｍｇ／ｋｇ～約３．３ｍｇ／ｋｇ、約２．６ｍｇ／ｋｇ～約３．１５ｍｇ／ｋｇ、約２．７ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ、約２．８ｍｇ／ｋｇ～約３ｍｇ／ｋｇ又は約２．８５ｍｇ／ｋｇ～約２．９５ｍｇ／ｋｇの範囲内である。

【１１４８】

[001383] 一部の実施形態において、ＴＩＬの有効投与量は、約１ｍｇ～約５００ｍｇ、約１０ｍｇ～約３００ｍｇ、約２０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約２５ｍｇ～約２００ｍｇ、約１ｍｇ～約５０ｍｇ、約５ｍｇ～約４５ｍｇ、約１０ｍｇ～約４０ｍｇ、約１５ｍｇ～約３５ｍｇ、約２０ｍｇ～約３０ｍｇ、約２３ｍｇ～約２８ｍｇ、約５０ｍｇ～約１５０

ｍｇ、約６０ｍｇ～約１４０ｍｇ、約７０ｍｇ～約１３０ｍｇ、約８０ｍｇ～約１２０ｍｇ、約９０ｍｇ～約１１０ｍｇ又は約９５ｍｇ～約１０５ｍｇ、約９８ｍｇ～約１０２ｍｇ、約１５０ｍｇ～約２５０ｍｇ、約１６０ｍｇ～約２４０ｍｇ、約１７０ｍｇ～約２３０ｍｇ、約１８０ｍｇ～約２２０ｍｇ、約１９０ｍｇ～約２１０ｍｇ、約１９５ｍｇ～約２０５ｍｇ又は約１９８～約２０７ｍｇの範囲内である。

【１１４９】

［００１３８４］ 有効量のＴＩＬは、鼻腔内及び経皮経路、動脈内注射によること、静脈内、腹腔内、非経口的、筋肉内、皮下、局所、移植によること又は吸入によることを含め、同様の有用性を有する薬剤について一般に認められている任意の投与方式により、単回用量又は複数回用量のいずれで投与され得る。

【１１５０】

［００１３８５］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を含む輸注バッグを提供する。

【１１５１】

［００１３８６］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載される治療用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。

【１１５２】

［００１３８７］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物を含む輸注バッグを提供する。

【１１５３】

［００１３８８］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団の凍結保存調製物を提供する。

【１１５４】

［００１３８９］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載される治療用ＴＩＬ集団及び凍結保存培地を含む、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）組成物を提供する。

【１１５５】

［００１３９０］ 別の実施形態において、本発明は、凍結保存培地がＤＭＳＯを含有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物を提供する。

【１１５６】

［００１３９１］ 別の実施形態において、本発明は、凍結保存培地が７～１０％のＤＭＳＯを含有するように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物を提供する。

【１１５７】

［００１３９２］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物の凍結保存調製物を提供する。

【１１５８】

ＸＶＩ．患者の処置方法

［００１３９３］ 処置方法は、最初のＴＩＬ収集及びＴＩＬの培養から始まる。かかる方法については、両方とも当該技術分野において例えばJin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35(3):283-292（全体として参照により本明細書に組み込まれる）により記載されている。処置方法の実施形態は、実施例を含む以下のセクション全体で説明される。

【１１５９】

［００１３９４］ 本明細書に記載の方法、例えば上記のステップＡ～Ｆに記載の方法を含むか、又は上記のステップＡ～Ｆに記載の方法（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）にも示される）に従って作製された拡大培養ＴＩＬは、癌患者の処置における特定の使用（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並びに補足内容）が見出される。一部の実施形態において、ＴＩＬは、先述の通り転移性黒色腫の寄託切除物から成長させた（Dudley, et al., J

Immunother., 2003, 26:332-342を参照されたい；全体として参照により本明細書に組み込まれる）。新鮮腫瘍は無菌条件下で剥離し得る。正式な病理解析のため、代表サンプルを収集し得る。２ｍｍ^3～３ｍｍ^{3}の単一の断片が使用され得る。一部の実施形態において、患者１人あたり５、１０、１５、２０、２５又は３０のサンプルを入手する。一部の実施形態において、患者１人あたり２０、２５又は３０のサンプルを入手する。一部の実施形態において、患者１人あたり２０、２２、２４、２６又は２８のサンプルを入手する。一部の実施形態において、患者１人あたり２４のサンプルを入手する。サンプルを２４ウェルプレートの個々のウェルに置き、高用量ＩＬ－２（６，０００ＩＵ／ｍＬ）を含む成長培地中に維持し、腫瘍の破壊及び／又はＴＩＬの増殖に関してモニターし得る。処理後に生細胞が残っている任意の腫瘍を酵素消化して単一細胞懸濁液にし、本明細書に記載される通り凍結保存し得る。

【１１６０】

[001395] 一部の実施形態において、表現型分析（ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８及びＣＤ５６）のため、増殖に成功したＴＩＬをサンプリングし、利用可能な場合には自己腫瘍に対して試験し得る。ＴＩＬは、一晩の共培養によりインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）レベル＞２００ｐｇ／ｍＬ及びバックグラウンドの２倍となった場合に応答性であると見なすことができる。（Goff, et al., J Immunother., 2010, 33:840-847；全体として参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態において、自己応答性又は十分な成長パターンのエビデンスを有する培養物が、急速拡大培養（ＲＥＰ）と称されることもある第２の拡大培養を含め、第２の拡大培養（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤにおいて提供される通りの第２の拡大培養）に選択され得る。一部の実施形態において、高い自己応答性（例えば、第２の拡大培養中の高い増殖）を有する拡大培養ＴＩＬが、追加の第２の拡大培養に選択される。一部の実施形態において、自己応答性（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤに提供される通りの第２の拡大培養中の高い増殖）を有するＴＩＬが、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＤに係る追加の第２の拡大培養に選択される。

【１１６１】

[001396] 一部の実施形態において、患者はＡＣＴ（養子細胞移入）に直接移されず、例えば、一部の実施形態において、腫瘍回収後及び／又は第１の拡大培養後、細胞はすぐには利用されない。一部の実施形態において、ＴＩＬは凍結保存し、患者への投与の２日前に解凍することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは凍結保存し、患者への投与の１日前に解凍することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは凍結保存し、患者への投与の直前に解凍することができる。

【１１６２】

[001397] 輸注バッグＴＩＬの凍結保存サンプルの細胞表現型は、表面マーカーＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＣＲ７及びＣＤ４５ＲＡ（BD BioSciences）に関するフローサイトメトリー（例えば、FlowJo（商標））並びに本明細書に記載される方法のいずれかによって分析することができる。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法を用いることにより測定した。血清ＩＦＮ－ｇの上昇は、＞１００ｐｇ／ｍＬ及び４　３ベースラインレベル超（greater than 4 3 baseline levels）と定義した。

【１１６３】

[001398] 一部の実施形態において、本明細書で提供される方法、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示される方法により作製されるＴＩＬは、ＴＩＬの臨床有効性の驚くべき改善を提供する。一部の実施形態において、本明細書で提供される方法、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示される方法により作製されるＴＩＬは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示される方法以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法により作製されるＴＩＬと比べて臨床有効性が増加する。一部の実施形態において、本明細書に記載されているもの以外の方法は、プロセス１Ｃ及び／又はジェネレーション１（Ｇｅｎ１）と称される方法を含む。一部の実施形態において、有効性の増加は、ＤＣＲ、ＯＲＲ及び／又は他の臨床応答によって測定される。一部の実施形態に

おいて、本明細書で提供される方法、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示される方法により作製されるＴＩＬは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示される方法以外の、例えばＧｅｎ１プロセスを含む、本明細書に記載されるもの以外の方法により作製されるＴＩＬと比べて同様の応答時間及び安全プロファイルを示す。

【１１６４】

［００１３９９］一部の実施形態において、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、処置有効性及び／又は臨床有効性の増加の指標である。一部の実施形態において、ＴＩＬで処置された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性ＴＩＬの指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能のもう１つの尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、本発明の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示されるものを含む方法により調製されたＴＩＬで処置された対象の血液、血清又はＴＩＬエキソビボ中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することにより測定できる。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者における処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍、２倍、３倍、４倍又は５倍以上増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、２倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、３倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、４倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、５倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γはQuantikine ELISA kitを使用して測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に記載されるものを含む、本発明の方法により調製されたＴＩＬで処置された対象のＴＩＬエキソビボで測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に記載されるものを含む、本発明の方法により調製されたＴＩＬで処置された対象の血液で測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に記載されるものを含む、本発明の方法により調製されたＴＩＬで処置された対象のＴＩＬ血清で測定される。

【１１６５】

［００１４００］一部の実施形態において、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に記載されるものを含む本発明の方法により調製されたＴＩＬは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示されない、例えばプロセス１Ｃメソッドと称されるものを含む他の方法により作製されるＴＩＬと比較してポリクローナル性の増加を示す。一部の実施形態において、有意に改善されたポリクローナル性及び／又は増加したポリクローナル性は、処置有効性及び／又は臨床有効性の増加の指標である。一部の実施形態において、ポリクローナル性とは、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。一部の実施形態において、ポリクローナル性の増加は、本発明の方法に作製されたＴＩＬを投与された患者に関する処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、例えば、図８５（特に、例

えば図８５Ｂ）に具体化された方法以外の方法を含む、本明細書で提供する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倍又は１０００倍が増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、２倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１０倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１００倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、５００倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１１６６】

[001401] 有効性の尺度には、当該技術分野において公知であり、本明細書に記載されるように、疾患制御率（ＤＣＲ：Disease Control Rate）並びに全奏効率（ＯＲＲ：Overall Response Rate）が含まれ得る。

【１１６７】

１．癌及びその他の疾患の処置方法

[001402] 本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患の処置方法で使用することができる。一実施形態において、それらは過剰成長性障害の処置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ている通りその他の障害の処置にも使用され得る。

【１１６８】

[001403] 一部の実施形態において、過剰成長性障害は癌である。一部の実施形態において、過剰成長性障害は固形腫瘍癌である。一部の実施形態において、固形腫瘍癌は、神経膠芽腫（ＧＢＭ）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、腎癌及び腎細胞癌からなる群から選択される。一部の実施形態において、過剰成長性障害は血液学的悪性腫瘍である。一部の実施形態において、固形腫瘍癌は、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。

【１１６９】

[001404] 一部の実施形態において、癌は、高頻度変異癌表現型である。高頻度変異癌は、Campbell, et al.に広く記載されている（Cell, 171:1042-1056 (2017)；全ての目的のために全体として参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態において、高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり９～１０個の変異を含む。一部の実施形態において、小児の高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり９．９１個の変異を含む。一部の実施形態において、成人の高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり９個の変異を含む。一部の実施形態において、増強された高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり１０～１００個の変異を含む。一部の実施形態において、増強された

小児の高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり１０～１００個の変異を含む。一部の実施形態において、増強された成人の高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり１０～１００個の変異を含む。一部の実施形態において、超高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり１００個を超える変異を含む。一部の実施形態において、小児の超高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり１００個を超える変異を含む。一部の実施形態において、成人の超高頻度変異腫瘍は、１メガベース（Ｍｂ）あたり１００個を超える変異を含む。

【１１７０】

[001405] 一部の実施形態において、高頻度変異腫瘍は、複製修復経路に変異を有する。一部の実施形態において、高頻度変異腫瘍は、複製修復関連ＤＮＡポリメラーゼに変異を有する。一部の実施形態において、高頻度変異腫瘍はマイクロサテライト不安定性を有する。一部の実施形態において、超高頻度変異腫瘍は、複製修復関連ＤＮＡポリメラーゼに変異を有し、マイクロサテライト不安定性を有する。一部の実施形態において、腫瘍の高頻度変異は、免疫チェックポイント阻害剤に対する応答と相関している。一部の実施形態において、高頻度変異腫瘍は、免疫チェックポイント阻害剤による処置に耐性である。一部の実施形態において、高頻度変異腫瘍は、本発明のＴＩＬを使用して処置することができる。一部の実施形態において、腫瘍の高頻度変異は、環境要因（外因性曝露）によって引き起こされる。例えば、ＵＶ光線は、悪性黒色腫における多数の変異の主な原因であり得る（例えば、Pfeifer, G.P., You, Y.H.,及びBesaratinia, A.(2005).Mutat.Res.571, 19-31.；Sage, E.(1993).Photochem.Photobiol.57, 163-174を参照されたい）。一部の実施形態において、腫瘍の高頻度変異は、直接の変異誘発物質への曝露により、肺及び喉頭の腫瘍並びに他の腫瘍について、タバコ煙中の６０を超える発癌物質によって引き起こされ得る（例えば、Pleasance, E.D., Stephens, P.J., O’Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., et al. (2010). Nature 463, 184-190を参照されたい）。一部の実施形態において、腫瘍における高頻度変異は、アポリポタンパク質Ｂ ｍＲＮＡ編集酵素、触媒ポリペプチド様（ＡＰＯＢＥＣ）ファミリーメンバーの調節不全によって引き起こされ、これは、広範な癌においてＣからＴへの移行のレベルの増加をもたらすことが示されている（例えば、Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., et al.(2013). Nat. Genet. 45, 970-976を参照されたい）。一部の実施形態において、腫瘍の高頻度変異は、主要な複製酵素であるＰｏｌ３及びＰｏｌｄ１によって実行される、プルーフリーディングを損なう変異による欠陥のあるＤＮＡ複製修復によって引き起こされる。一部の実施形態において、腫瘍の高頻度変異は、結腸直腸癌、子宮内膜癌及び他の癌の高頻度変異に関連するＤＮＡミスマッチ修復の欠陥によって引き起こされる(例えば、Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C.C., et al.; (2013). Nature 497, 67-73.；Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J.A., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., Newsham, I.F., et al.; (2012). Nature 487, 330-337を参照されたい）。一部の実施形態において、ＤＮＡ複製修復変異は、体質性又は両アレル性のミスマッチ修復欠損症（ＣＭＭＲＤ）、リンチ症候群及びポリメラーゼプルーフリーディング関連ポリポーシス（ＰＰＡＰ）などの癌素因症候群にも見られる。

【１１７１】

[001406] 一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団を用いて癌を処置する方法を含み、ここで、癌は、高頻度変異癌である。一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団を用いて癌を処置する方法を含み、ここで、癌は、増強された高頻度変異癌である。一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団を用いて癌を処置する方法を含み、ここで、癌は、超高頻度変異癌である。

【１１７２】

[001407] 一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団で癌を処置する方法を含み、こ

こで患者は本開示に係るＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法は、２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）のシクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日及び５日間（ＴＩＬ注入の２７～２３日前）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日である。一実施形態において、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量まで８時間ごとに７２０，０００ＩＵ／ｋｇでＩＬ－２の静脈内注入を受ける。

【１１７３】

[001408] 示された疾患又は障害の処置、予防及び／又は管理における本明細書に記載の化合物及び化合物の組み合わせの有効性は、ヒト疾患の処置のためのガイダンスを提供する当該技術分野でにおいて公知の様々なモデルを使用して試験することができる。例えば、卵巣癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Mullany, et al., Endocrinology 2012, 153, 1585-92；及びFong, et al., J. Ovarian Res. 2009, 2, 12に記載がある。膵臓癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、Herreros-Villanueva, et al., World J. Gastroenterol. 2012, 18, 1286-1294に記載がある。乳癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Fantozzi, Breast Cancer Res. 2006, 8, 212に記載がある。黒色腫の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Damsky, et al., Pigment Cell & Melanoma Res. 2010, 23, 853-859に記載がある。肺癌の処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Meuwissen, et al., Genes & Development, 2005, 19, 643-664に記載がある。肺癌処置の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Kim, Clin. Exp. Otorhinolaryngol. 2009, 2, 55-60；及びSano, Head Neck Oncol. 2009, 1, 32に記載がある。

【１１７４】

[001409] 一部の実施形態において、ＩＦＮ－ガンマ（ＩＦＮ－γ）は、過剰成長性傷害の処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ＴＩＬで処置された対象の血液中のＩＦＮ－γは、活性ＴＩＬの指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ産生の効力アッセイが用いられる。ＩＦＮ－γ産生は、細胞傷害能のもう１つの尺度である。ＩＦＮ－γ産生は、本発明の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示されるものを含む方法により調製されたＴＩＬで処置された対象の血液中のサイトカインＩＦＮ－γのレベルを決定することにより測定できる。一部の実施形態において、本方法で得られたＴＩＬは、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）及び本出願全体に例示されるように、Ｇｅｎ３プロセスと称される方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された対象と比較して、本方法のＴＩＬで処置された対象の血液中のＩＦＮ－γの増加をもたらす。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γの増加は、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者における処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍、２倍、３倍、４倍又は５倍以上増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、２倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、３倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、４倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γ分泌は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提

供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、５倍増加する。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γはQuantikine ELISA kitを使用して測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γはQuantikine ELISA kitを使用して測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者からのＴＩＬエキソビボにおいて測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者の血液において測定される。一部の実施形態において、ＩＦＮ－γは、本発明の方法により作製されたＴＩＬで処置された患者の血清において測定される。

【１１７５】

［001410］一部の実施形態において、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に記載されるものを含む本発明の方法により調製されたＴＩＬは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に例示されない、例えばプロセス１Ｃメソッドと称されるものを含む他の方法により作製されるＴＩＬと比較してポリクローナル性の増加を示す。一部の実施形態において、有意に改善されたポリクローナル性及び／又は増加したポリクローナル性は、癌処置の処置有効性及び／又は臨床有効性の増加の指標である。一部の実施形態において、ポリクローナル性とは、Ｔ細胞レパートリーの多様性を指す。一部の実施形態において、ポリクローナル性の増加は、本発明の方法によって作製されたＴＩＬの投与に関する処置有効性の指標である。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に具体化された方法以外の方法を含む、本明細書で提供する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倍又は１０００倍が増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、２倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１０倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１００倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、５００倍増加する。一部の実施形態において、ポリクローナル性は、未処置患者と比較して、及び／又は本明細書で提供するもの以外の方法、例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）で具体化された方法以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで処置された患者と比較して、１０００倍増加する。

【１１７６】

２．共投与方法

［001411］一部の実施形態において、本明細書に記載されるように作製されるＴＩＬ（例えば、図８５（特に、例えば図８５Ｂ）のステップＡ～Ｆに記載される方法から得られたＴＩＬを含む）は、以下に記載する抗体など、１つ以上の免疫チェックポイント調節因子と併用して投与することができる。例えば、ＰＤ－１を標的とする、且つ本発明のＴＩＬと共投与し得る抗体としては、例えば、限定はされないが、ニボルマブ（ＢＭＳ－９３６５５８、Bristol-Myers Squibb；Opdivo（登録商標））、ペンブロリズマブ（ランブロリズマブ、ＭＫ０３４７５又はＭＫ－３４７５、Merck；Keytruda（登録商標））、ヒト化抗ＰＤ－１抗体ＪＳ００１（ShangHai JunShi）、モノクローナル抗ＰＤ－１抗体

ＴＳＲ－０４２（Tesaro, Inc.）、ピジリズマブ（抗ＰＤ－１　ｍＡｂ　ＣＴ－０１１、Medivation）、抗ＰＤ－１モノクローナル抗体ＢＧＢ－Ａ３１７（BeiGene）及び／又は抗ＰＤ－１抗体ＳＨＲ－１２１０（ShangHai HengRui）、ヒトモノクローナル抗体ＲＥＧＮ２８１０（Regeneron）、ヒトモノクローナル抗体ＭＤＸ－１１０６（Bristol-Myers Squibb）及び／又はヒト化抗ＰＤ１　ＩｇＧ４抗体ＰＤＲ００１（Novartis）が挙げられる。一部の実施形態において、ＰＤ－１抗体は、クローン：ＲＭＰ１－１４（ラットＩｇＧ）－BioXcellカタログ番号BP0146からのものである。本明細書に記載される通りのステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬとの共投与方法における使用に好適な他の好適な抗体は、米国特許第８，００８，４４９号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示される抗ＰＤ－１抗体である。一部の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分はＰＤ－Ｌ１に特異的に結合し、ＰＤ－１とのその相互作用を阻害し、それにより免疫活性を増加させる。ＰＤ－Ｌ１に結合してＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との間の相互作用を破壊し、且つ抗腫瘍免疫応答を刺激する当該技術分野において公知の任意の抗体が、本明細書に記載される通りのステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬとの共投与方法における使用に好適である。例えば、ＰＤ－Ｌ１を標的とする臨床試験中の抗体としては、ＢＭＳ－９３６５５９（Bristol-Myers Squibb）及びＭＰＤＬ３２８０Ａ（Genentech）が挙げられる。ＰＤ－Ｌ１を標的とする他の好適な抗体は、米国特許第７，９４３，７４３号（参照により本明細書に組み込まれる）に開示される。当業者は、ＰＤ－１又はＰＤ－Ｌ１に結合し、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を破壊し、且つ抗腫瘍免疫応答を刺激する任意の抗体が、本明細書に記載される通りのステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬとの共投与方法における使用に好適であることを理解するであろう。一部の実施形態において、ステップＡ～Ｆにより作製されるＴＩＬの組み合わせを投与される対象は、患者が抗ＰＤ－１抗体単独の投与に不応性の癌型を有するとき抗ＰＤ－１抗体と共投与される。一部の実施形態において、患者が難治性黒色腫を有するとき、患者はＴＩＬを抗ＰＤ－１と併用して投与される。一部の実施形態において、患者が非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有するとき、患者はＴＩＬを抗ＰＤ－１と併用して投与される。

【１１７７】

３．任意選択による患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング

[001412] 一実施形態において、本発明は、ＴＩＬ集団で癌を処置する方法を含み、ここで患者は本開示に係るＴＩＬの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前処置される。一実施形態において、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前処置された患者の癌処置に使用するためのＴＩＬの集団を含む。一実施形態において、ＴＩＬの集団は注入による投与用である。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法は、２日間（ＴＩＬ注入の２７日前及び２６日前）のシクロホスファミド６０ｍｇ／ｋｇ／日及び５日間（ＴＩＬ注入の２７～２３日前）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^2／日である。一実施形態において、骨髄非破壊的化学療法及び本開示に係るＴＩＬ注入（０日目）後、患者は生理学的忍容量まで８時間毎に静脈内に７２０，０００ＩＵ／ｋｇのＩＬ－２（アルデスロイキン、PROLEUKINとして市販）の静脈内注入を受ける。特定の実施形態において、ＴＩＬの集団は、ＩＬ－２と組み合わせて癌を処置するのに使用され、ＩＬ－２はＴＩＬの集団後に投与される。

【１１７８】

[001413] 実験的知見は、腫瘍特異的Ｔリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性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処置効果を高めるのに重要な役割を果たすことを示す。従って、本発明の一部の実施形態は、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」とも称される）を利用する。

【１１７９】

[001414] 一般的に、リンパ球枯渇はフルダラビン又はシクロホスファミド（活性型はマホスファミドと称される）及びその組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法については、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（これらは全て、参照により全体として本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【１１８０】

[001415] 一部の実施形態において、フルダラビンは、０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬフルダラビンの濃度で投与される。一部の実施形態において、フルダラビンは、１μｇ／ｍＬフルダラビンの濃度で投与される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、１日、２日、３日、４日、５日、６日又は７日以上にわたって実施される。一部の実施形態において、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／日又は４５ｍｇ／ｋｇ／日の投薬量で投与される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間にわたって実施される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間にわたって実施される。一部の実施形態において、フルダラビン処置は、２５ｍｇ／ｋｇ／日で４～５日間にわたって実施される。

【１１８１】

[001416] 一部の実施形態において、シクロホスファミドの活性型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の濃度で入手される。一部の実施形態において、シクロホスファミドの活性型であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により１μｇ／ｍＬの濃度で入手される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、１日、２日、３日、４日、５日、６日又は７日以上にわたって実施される。一部の実施形態において、シクロホスファミドは、１００ｍｇ／ｍ^2／日、１５０ｍｇ／ｍ^2／日、１７５ｍｇ／ｍ^2／日、２００ｍｇ／ｍ^2／日、２２５ｍｇ／ｍ^2／日、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、２７５ｍｇ／ｍ^2／日又は３００ｍｇ／ｍ^2／日の投薬量で投与される。一部の実施形態において、シクロホスファミドは静脈内（即ちｉ．ｖ．）投与される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、３５ｍｇ／ｋｇ／日で２～７日間にわたって実施される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で、４～５日間にわたって実施される。一部の実施形態において、シクロホスファミド処置は、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で、４日間にわたって実施される。

【１１８２】

[001417] 一部の実施形態において、リンパ球枯渇は、フルダラビン及びシクロホスファミドを共に患者に投与することによって行われる。一部の実施形態において、４日間にわたって、フルダラビンは２５ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で投与され、シクロホスファミドは、２５０ｍｇ／ｍ^2／日、ｉ．ｖ．で投与される。

【１１８３】

[001418] 一実施形態において、リンパ球枯渇は、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与ステップと、それに続く２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンの投与により実施される。

４．ＩＬ－２レジメン

【１１８４】

[001419] 一実施形態において、ＩＬ－２レジメンは、治療有効部分の投与の翌日から静脈内投与される高用量ＩＬ－２レジメンを含み、治療用ＴＩＬ集団の治療有効部分を投与した１日後から静脈に内投与され始め、高用量ＩＬ－２レジメンはアルデスロイキン又はそのバイオシミラー若しくはそれらの変異体を含み、アルデロイキン又はそのバイオシミラー若しくは変異体が８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入を使用して、最大１４用量で、０．０３７ｍｇ／ｋｇ又は０．０４４ｍｇ／ｋｇ　ＩＵ／ｋｇ（患者の体重）の用量で投与される。９日間の休息後、このスケジュールを更に１４回、合計で最大２８回まで繰り返し得る。

【１１８５】

[001420] 一実施形態において、ＩＬ－２レジメンは、漸減性ＩＬ－２レジメンを含む。漸減性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、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態において、漸減性ＩＬ－２レジメンは、１８×１０^6 ＩＵ／ｍ^{2}の６時間にわたる静脈内投、それに続く１８×１０^6 ＩＵ／ｍ^{2}の１２時間にわたる静脈内投与、その後、１８×１０^6 ＩＵ／ｍ^{2}の２４時間にわたる静脈内投与、その後、４．５×１０^6 ＩＵ／ｍ^{2}の７２時間にわたる静脈内投与を含む。この処置サイクルは、最大４サイクル、２８日毎に繰り返し得る。一実施形態において、漸減性ＩＬ－２レジメンは、１日目の１８，０００，０００ＩＵ／ｍ^2、２日目の９，０００，０００ＩＵ／ｍ^2、３日目及び４日目の４，５００，０００ＩＵ／ｍ^{2}を含む。

【１１８６】

[001421] 一実施形態において、ＩＬ－２レジメンは、０．１０ｍｇ／日～５０ｍｇ／日の用量で、１、２、４、６、７、１４又は２１日毎にペグ化ＩＬ－２を投与することを含む。

【１１８７】

５．養子細胞移入

[001422] 養子細胞移入（ＡＣＴ）は、有効な形態の免疫療法であり、抗腫瘍活性を有する免疫細胞を癌患者に移入することを含む。ＡＣＴは、抗腫瘍活性を有するリンパ球のインビトロ同定、それらの細胞の数を増やすインビトロ拡大培養及び癌担持宿主へのその注入を伴う治療手法である。養子移入に使用されるリンパ球は、切除された腫瘍の間質に由来し得る（腫瘍浸潤リンパ球又はＴＩＬ）。ＡＣＴのためのＴＩＬは、本明細書に記載される通り調製することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは、例えば図８５（特に、例えば図８５Ｂ）に記載される通りの方法により調製される。ＴＩＬは、抗腫瘍Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）又はキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように遺伝子改変されている場合に血液からも誘導され得るか、混合リンパ球腫瘍細胞培養物（ＭＬＴＣ）でエンリッチされ得るか、又は自己抗原提示細胞及び腫瘍由来ペプチドを使用してクローニングされ得る。注入しようとする癌担持宿主にリンパ球が由来するＡＣＴは、自己ＡＣＴと称される。米国特許出願公開第２０１１／００５２５３０号は、主に転移性黒色腫に罹患している患者の治療に向けた、癌退縮を促進するため養子細胞療法を実施する方法に関する（これらの方法に関して全体として参照により組み込まれる）。一部の実施形態において、ＴＩＬは、本明細書に記載される通り投与することができる。一部の実施形態において、ＴＩＬは単回用量で投与することができる。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。一部の実施形態において、ＴＩＬ及び／又は細胞傷害性リンパ球は複数回用量で投与され得る。投与は、１年に１回、２回、３回、４回、５回、６回又は６回を超え得る。投与は、月に１回、２週間に１回、週に１回又は隔日に１回であり得る。ＴＩＬ及び／又は細胞傷害性リンパ球の投与は必要な限り継続され得る。

【１１８８】

６．追加の処置方法

[001423] 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療有効投与量の治療用ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、癌を有する対象を処置する方法を提供する。

【１１８９】

[001424] 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療有効投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、癌を有する対象を処置する方法を提供する。

【１１９０】

[001425] 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団及びＴＩＬ組成物の治療有効投与量を投与する前に、それぞれ、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されているように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。

【１１９１】
［００１４２６］別の実施形態において、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間シクロホスファミドを投与し、続いて２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間フルダラビンを投与するステップを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９２】
［００１４２７］別の実施形態において、本発明は、対象にＴＩＬ細胞を投与した翌日に始まる高用量ＩＬ－２レジメンで対象を処置するステップを更に含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９３】
［００１４２８］別の実施形態において、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９４】
［００１４２９］別の実施形態において、本発明は、癌が固形腫瘍であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９５】
［００１４３０］別の実施形態において、本発明は、癌が、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌又は腎細胞癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９６】
［００１４３１］別の実施形態において、本発明は、癌が黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）及び胃腸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９７】
［００１４３２］別の実施形態において、本発明は、癌が黒色腫であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９８】
［００１４３３］別の実施形態において、本発明は、癌がＨＮＳＣＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１１９９】
［００１４３４］別の実施形態において、本発明は、癌が子宮頸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１２００】
［００１４３５］別の実施形態において、本発明は、癌がＮＳＣＬＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１２０１】
［００１４３６］別の実施形態において、本発明は、癌が神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１２０２】
［００１４３７］別の実施形態において、本発明は、癌が胃腸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。

【１２０３】
［001438］ 別の実施形態において、本発明は、癌が高頻度変異癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１２０４】
［001439］ 別の実施形態において、本発明は、癌が小児高頻度変異癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された癌を有する対象を処置する方法を提供する。
【１２０５】
［001440］ 別の実施形態において、本発明は、治療有効投与量の治療用ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、癌を有する対象を処置する方法における使用のための、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団を提供する。
【１２０６】
［001441］ 別の実施形態において、本発明は、治療有効投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、癌を有する対象を処置する方法における使用のための、上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物を提供する。
【１２０７】
［001442］ 別の実施形態において、本発明は、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又は上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物の治療有効投与量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ているように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又は上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物を提供する。
【１２０８】
［001443］ 別の実施形態において、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間シクロホスファミドを投与し、続いて２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間フルダラビンを投与するステップを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。
【１２０９】
［001444］ 別の実施形態において、本発明は、患者にＴＩＬ細胞を投与した翌日に始まる高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップを更に含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。
【１２１０】
［001445］ 別の実施形態において、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。
【１２１１】
［001446］ 別の実施形態において、本発明は、癌が固形腫瘍であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。
【１２１２】
［001447］ 別の実施形態において、本発明は、癌が、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌又は腎細胞癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。
【１２１３】
［001448］ 別の実施形態において、本発明は、癌が黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、Ｎ

ＳＣＬＣ、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）及び胃腸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２１４】

［００１４４９］ 別の実施形態において、本発明は、癌が黒色腫であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２１５】

［００１４５０］ 別の実施形態において、本発明は、癌がＨＮＳＣＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２１６】

［００１４５１］ 別の実施形態において、本発明は、癌が子宮頸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２１７】

［００１４５２］ 別の実施形態において、本発明は、癌がＮＳＣＬＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２１８】

［００１４５３］ 別の実施形態において、本発明は、癌が神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２１９】

［００１４５４］ 別の実施形態において、本発明は、癌が胃腸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２２０】

［００１４５５］ 別の実施形態において、本発明は、癌が高頻度変異癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２２１】

［００１４５６］ 別の実施形態において、本発明は、癌が小児高頻度変異癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物を提供する。

【１２２２】

［００１４５７］ 別の実施形態において、本発明は、治療有効投与量の治療用ＴＩＬ集団を対象に投与することを含む、対象における癌を処置する方法における、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団の使用を提供する。

【１２２３】

［００１４５８］ 別の実施形態において、本発明は、治療有効投与量のＴＩＬ組成物を対象に投与することを含む、対象における癌を処置する方法における、上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２２４】

［００１４５９］ 別の実施形態において、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与すること、次いで、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団の治療有効投与量又は上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物の治療有効投与量を対象に投与することを含む、対象における癌を処置する方法における、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又は上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２２５】

[001460] 別の実施形態において、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間シクロホスファミドを投与し、続いて２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間フルダラビンを投与するステップを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２２６】

[001461] 別の実施形態において、本発明は、患者にＴＩＬ細胞を投与した翌日に始まる高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップを更に含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団の使用又は上記の該当する先の段落のいずれかに記載されたＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２２７】

[001462] 別の実施形態において、本発明は、高用量ＩＬ－２レジメンが、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含むように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２２８】

[001463] 別の実施形態において、本発明は、癌が固形腫瘍であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２２９】

[001464] 別の実施形態において、本発明は、癌が、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）、胃腸癌、腎癌又は腎細胞癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３０】

[001465] 別の実施形態において、本発明は、癌が黒色腫、ＨＮＳＣＣ、子宮頸癌、ＮＳＣＬＣ、神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）及び胃腸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３１】

[001466] 別の実施形態において、本発明は、癌が黒色腫であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３２】

[001467] 別の実施形態において、本発明は、癌がＨＮＳＣＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３３】

[001468] 別の実施形態において、本発明は、癌が子宮頸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３４】

[001469] 別の実施形態において、本発明は、癌がＮＳＣＬＣであるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３５】

[001470] 別の実施形態において、本発明は、癌が神経膠芽腫（ＧＢＭを含む）であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。

【１２３６】
［００１４７１］別の実施形態において、本発明は、癌が胃腸癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【１２３７】
［００１４７２］別の実施形態において、本発明は、癌が高頻度変異癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【１２３８】
［００１４７３］別の実施形態において、本発明は、癌が小児高頻度変異癌であるように変更された、上記の該当する先の段落のいずれかに記載された治療用ＴＩＬ集団又はＴＩＬ組成物の使用を提供する。
【１２３９】
７．例示的処置の実施形態
［００１４７４］一部の実施形態において、本開示は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）集団によって癌を処置する方法を提供し、この方法は、（ａ）患者から入手した腫瘍断片又はコアから第１のＴＩＬ集団を得るステップ；（ｂ）第１の細胞培養培地中で第１のＴＩＬ集団の初期拡大培養を実施することにより第２のＴＩＬ集団を得るステップであって、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より少なくとも５倍多く、第１の細胞培養培地は、ＩＬ－２を含む、ステップ；（ｃ）第２の細胞培養培地中で骨髄系人工抗原提示細胞（骨髄系ａＡＰＣ）集団を使用して第２のＴＩＬ集団の急速拡大培養を実施することにより第３のＴＩＬ集団を得るステップであって、急速拡大培養の開始から７日後に第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも５０倍多く；及び第２の細胞培養培地がＩＬ－２及びＯＫＴ－３を含むステップ；（ｄ）癌を有する患者に治療上有効な分量の第３のＴＩＬ集団を投与するステップを含む。一部の実施形態において、第２の細胞培養培地中にＩＬ－２は約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、及びＯＫＴ－３抗体は約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。一部の実施形態において、第１の拡大培養は１４日以下の期間にわたって実施される。一部の実施形態において、第１の拡大培養はガス透過性容器を使用して実施される。一部の実施形態において、第２の拡大培養はガス透過性容器を使用して実施される。一部の実施形態において、急速拡大培養における第２のＴＩＬ集団とａＡＰＣ集団との比は１：８０～１：４００である。一部の実施形態において、急速拡大培養における第２のＴＩＬ集団とａＡＰＣ集団との比は約１：３００である。一部の実施形態において、治療される癌は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされる癌、頭頸部癌、腎癌及び腎細胞癌からなる群から選択される。一部の実施形態において、処置される癌は、黒色腫、卵巣癌及び子宮頸癌からなる群から選択される。一部の実施形態において、処置される癌は黒色腫である。一部の実施形態において、処置される癌は卵巣癌である。一部の実施形態において、処置される癌は子宮頸癌である。一部の実施形態において、癌の処置方法は、患者に第３のＴＩＬ集団を投与する前に骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンによって患者を治療するステップを更に含む。一部の実施形態において、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、６０ｍｇ／ｍ^2／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与ステップと、それに続く２５ｍｇ／ｍ^2／日の用量で５日間のフルダラビンの投与ステップを含む。一部の実施形態において、高用量ＩＬ－２レジメンは、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン又はそのバイオシミラー若しくは変異体を含む。
【１２４０】
［００１４７５］一部の実施形態において、本開示は、（ｉ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され

、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団が小生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×１０^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を添加することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；及び（ｉｖ）治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与することを含む、拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法を提供する。一部の実施形態において、第２の細胞培養培地中にＩＬ－２は約３０００ＩＵ／ｍＬの初期濃度で存在し、及びＯＫＴ－３抗体は約３０ｎｇ／ｍＬの初期濃度で存在する。一部の実施形態において、第１の拡大培養はガス透過性容器を使用して実施される。一部の実施形態において、第２の拡大培養はガス透過性容器を使用して実施される。一部の実施形態において、急速拡大培養における第２のＴＩＬ集団とＡＰＣ集団との比は１：８０～１：４００である。一部の実施形態において、急速拡大培養における第２のＴＩＬ集団とＡＰＣ集団との比は約１：３００である。一部の実施形態において、ＡＰＣはＰＭＢＣである。一部の実施形態において、小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる。一部の実施形態において、処置される癌は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される。一部の実施形態において、ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる。一部の実施形態において、処置される癌は、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される。一部の実施形態において、癌の処置方法は、患者に第３のＴＩＬ集団を投与する前に骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンによって患者を治療するステップを更に含む。一部の実施形態において、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、６０ｍｇ／ｍ^{2}／日の用量で２日間のシクロホスファミドの投与ステップと、それに続く２５ｍｇ／ｍ^{2}／日の用量で５日間のフルダラビンの投与ステップを含む。一部の実施形態において、高用量ＩＬ－２レジメンは、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇのアルデスロイキン又はそのバイオシミラー若しくは変異体を含む。

【１２４１】

ＸＶＩＩ．例示的実施形態

１．腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、（ｉ）患者の腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又は小生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×１０^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；及び

（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること

を含む方法。

【１２４２】

２．（ｉｖ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、追加のＯＫＴ－３及び追加のＡＰＣを補充することにより、追加の第２の拡大培養を実施することを更に含み

、追加の第２の拡大培養は、ステップ（ｉｉｉ）で得られたよりも大きい治療用ＴＩＬ集団を得るために少なくとも１４日間にわたって実施され、より大きい治療用ＴＩＬ集団は、第３のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む、請求項１に記載の方法。

【１２４３】

３．ステップ（ｉｉｉ）後、細胞は、細胞培養物から取り出され、且つステップ（ｉｖ）を実施する前に貯蔵培地中に凍結保存される、請求項２に記載の方法。

【１２４４】

４．細胞は、ステップ（ｉｖ）を実施する前に解凍される、請求項３に記載の方法。

【１２４５】

５．ステップ（ｉｖ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２４６】

６．ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２１日～約３３日の期間内に実施される、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２４７】

７．ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２１日～約３０日の期間内に実施される、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２４８】

８．ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２１日～約２８日の期間内に実施される、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２４９】

９．ステップ（ｉ）～（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）は、約２８日以下で実施される、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２５０】

１０．ステップ（ｉｉｉ）又は（ｉｖ）からの細胞は、ＣＤ４、ＣＤ８及びＴＣＲαβを新鮮回収細胞と同様のレベルで発現する、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２５１】

１１．ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である、請求項１に記載の方法。

【１２５２】

１２．ＰＢＭＣは、ステップ（ｉｉ）における３～１９日目のいずれか及び／又はステップ（ｉｉｉ）における１１～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項１１に記載の方法。

【１２５３】

１３．ステップ（ｉｖ）の治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項２～１２のいずれか一項に記載の方法。

【１２５４】

１４．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項１３に記載の方法。

【１２５５】

１５．ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＣＰである、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２５６】

１６．治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される、先の請求項のいずれか一項に記載の方法。

【１２５７】

１７．ステップ（ｉｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。

【１２５８】

１８．ステップ（ｉｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１に記載の方法。

【１２５９】

１９．ステップ（ｉｖ）における追加の第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項２に記載の方法。

【１２６０】

２０．ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項１に記載の方法。

【１２６１】

２１．小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項１に記載の方法。

【１２６２】

２２．ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項１に記載の方法。

【１２６３】

２３．肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、患者は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項２２に記載の方法。

【１２６４】

２４．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる、請求項１に記載の方法。

【１２６５】

２５．ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項１に記載の方法。

【１２６６】

２６．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、コア生検から得られる、請求項１に記載の方法。

【１２６７】

２７．コア生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項１に記載の方法。

【１２６８】

２８．ステップ（ｉｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される、請求項１に記載の方法。

【１２６９】

２９．治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項２８に記載の方法。

【１２７０】

３０．腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、
（ｉ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で患者の腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を得ることであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含む、得ること；及び
（ｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を得ることであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわ

たって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、得ること
を含む方法。
【１２７１】
３１．（ｉｉｉ）第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、追加のＯＫＴ－３及び追加のＡＰＣを補充することにより第３のＴＩＬ集団の追加の第２の拡大培養を実施すること
を更に含み、追加の第２の拡大培養は、ステップ（ｉｉ）で得られたよりも大きい治療用ＴＩＬ集団を得るために少なくとも１４日間にわたって実施され、より大きい治療用ＴＩＬ集団は、第３のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を呈する、請求項３０に記載の方法。
【１２７２】
３２．ステップ（ｉｉ）における細胞培養培地からの細胞は、取り出され、且つステップ（ｉｉｉ）前に貯蔵培地中に凍結保存される、請求項３１に記載の方法。
【１２７３】
３３．細胞は、ステップ（ｉｉｉ）前に解凍される、請求項３２に記載の方法。
【１２７４】
３４．ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＣＰである、請求項３０～３３のいずれか一項に記載の方法。
【１２７５】
３５．治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される、請求項３０～３４のいずれか一項に記載の方法。
【１２７６】
３６．ステップ（ｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項３０に記載の方法。
【１２７７】
３７．ステップ（ｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項３０に記載の方法。
【１２７８】
３８．ステップ（ｉｉｉ）における追加の第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項３０に記載の方法。
【１２７９】
３９．ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項３０に記載の方法。
【１２８０】
４０．小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項３０に記載の方法。
【１２８１】
４１．ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項３０に記載の方法。
【１２８２】
４２．肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、患者は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項４１に記載の方法。
【１２８３】
４３．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる、請求項３０に記載の方法。
【１２８４】
４４．ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項３０に記載の方法。

【１２８５】
４５．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、コア生検から得られる、請求項３０に記載の方法。
【１２８６】
４６．コア生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項３０に記載の方法。
【１２８７】
４７．ステップ（ｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される、請求項３０に記載の方法。
【１２８８】
４８．治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項４７に記載の方法。
【１２８９】
４９．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項３０～４８のいずれか一項に記載の方法。
【１２９０】
５０．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項４９に記載の方法。
【１２９１】
５１．拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法であって、
（ｉ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｉｉ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含む、産生すること；
（ｉｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；及び
（ｉｖ）治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含む方法。
【１２９２】
５２．ステップ（ｉｖ）前に、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、追加のＯＫＴ－３及び追加のＡＰＣを補充することにより、追加の第２の拡大培養を実施するステップを更に含み、追加の第２の拡大培養は、ステップ（ｉｉｉ）で得られたよりも大きい治療用ＴＩＬ集団を得るために少なくとも１４日間にわたって実施され、より大きい治療用ＴＩＬ集団は、第３のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む、請求項５１に記載の方法。
【１２９３】
５３．ステップ（ｉｉ）後、細胞は、細胞培養培地から取り出され、且つ請求項５２に記載の追加の第２の拡大培養前に貯蔵培地中に凍結保存される、請求項５１に記載の方法。
【１２９４】

５４．細胞は、請求項５２に記載の追加の第２の拡大培養前に解凍される、請求項５１に記載の方法。
【１２９５】
５５．ステップ（ｉｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される、請求項５１に記載の方法。
【１２９６】
５６．ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＣＰである、請求項５１～５５に記載の方法。
【１２９７】
５７．ステップ（ｉｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項５１に記載の方法。
【１２９８】
５８．ステップ（ｉｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項５１に記載の方法。
【１２９９】
５９．追加の第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項５２に記載の方法。
【１３００】
６０．ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項５１に記載の方法。
【１３０１】
６１．ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項５１に記載の方法。
【１３０２】
６２．肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項６１に記載の方法。
【１３０３】
６３．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる、請求項５１に記載の方法。
【１３０４】
６４．ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項５１に記載の方法。
【１３０５】
６５．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、コア生検から得られる、請求項５１に記載の方法。
【１３０６】
６６．コア生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項５１に記載の方法。
【１３０７】
６７．ステップ（ｉｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される、請求項５１に記載の方法。
【１３０８】
６８．治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項６７に記載の方法。
【１３０９】
６９．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項５１～６８のいずれか一項に記

載の方法。
【１３１０】
７０．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項６９に記載の方法。
【１３１１】
７１．癌は、黒色腫、子宮頸癌、頭頸部癌、膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵癌、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なる群から選択される、請求項５１～７０のいずれか一項に記載の方法。
【１３１２】
７２．拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法であって、
（ｉ）ＩＬ－２を含む細胞培養培地中で患者の腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を培養することにより、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を得ることであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×10^7個のＴＩＬを含む、得ること；
（ｉｉ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を得ることであって、第３のＴＩＬ集団は、数において第２のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、得ること；及び
（ｉｉｉ）治療有効投与量の治療用ＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含む方法。
【１３１３】
７３．ステップ（ｉｉｉ）前に、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、追加のＯＫＴ－３及び追加のＡＰＣを補充することにより、追加の第２の拡大培養を実施するステップを更に含み、追加の第２の拡大培養は、ステップ（ｉｉ）で得られたよりも大きい治療用ＴＩＬ集団を得るために少なくとも１４日間にわたって実施され、より大きい治療用ＴＩＬ集団は、第３のＴＩＬ集団と比べて、エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含む、請求項７２に記載の方法。
【１３１４】
７４．ステップ（ｉｉ）における細胞培養培地からの細胞は、取り出され、且つ請求項７３に記載の追加の第２の拡大培養前に貯蔵培地中に凍結保存される、請求項７２に記載の方法。
【１３１５】
７５．細胞は、請求項７３に記載の追加の第２の拡大培養前に解凍される、請求項７４に記載の方法。
【１３１６】
７６．細胞は、ステップ（ｉｉｉ）前に解凍される、請求項７４に記載の方法。
【１３１７】
７７．ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＣＰである、請求項７２～７６のいずれか一項に記載の方法。
【１３１８】
７８．ＡＰＣは、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である、請求項７２～７７のいずれか一項に記載の方法。
【１３１９】
７９．治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される、請求項７２～７８のいずれか一項に記載の方法。
【１３２０】

８０．ステップ（ｉ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項７２に記載の方法。

【１３２１】

８１．ステップ（ｉｉｉ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項７２に記載の方法。

【１３２２】

８２．追加の第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項８１に記載の方法。

【１３２３】

８３．ステップ（ｉ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項７２に記載の方法。

【１３２４】

８４．小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項７２に記載の方法。

【１３２５】

８５．ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項７２に記載の方法。

【１３２６】

８６．肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項８５に記載の方法。

【１３２７】

８７．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる、請求項７２に記載の方法。

【１３２８】

８８．ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項７２に記載の方法。

【１３２９】

８９．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、コア生検から得られる、請求項７２に記載の方法。

【１３３０】

９０．コア生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項７２に記載の方法。

【１３３１】

９１．ステップ（ｉｉ）は、治療用ＴＩＬ集団中において、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを得るために１～４回繰り返される、請求項７２に記載の方法。

【１３３２】

９２．治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項９１に記載の方法。

【１３３３】

９３．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第３の細胞集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７の発現、ＣＤ２８の発現、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項７２～９２のいずれか一項に記載の方法。

【１３３４】

９４．エフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項９３に記載の方法。

【１３３５】

９５．腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、

（ａ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）第１の集団を閉鎖系に添加すること；
（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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも5×10^{7}個のＴＩＬを含み、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１１日間～約１４日間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団比べてエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含むＴ細胞治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放することなく行われる、回収すること；及び
（ｆ）ステップ（ｅ）からの回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放することなく行われる、移すこと
を含む方法。
【１３３６】
９６．凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）における回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存するステップを更に含む、請求項９５に記載の方法。
【１３３７】
９７．凍結保存プロセスは、回収されたＴＩＬ集団対ＣＳ１０培地の１：１比を使用して実施される、請求項９６に記載の方法。
【１３３８】
９８．抗原提示細胞は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）である、請求項９６に記載の方法。
【１３３９】
９９．ＰＢＭＣは、照射され、且つ同種異系である、請求項９８に記載の方法。
【１３４０】
１００．ＰＢＭＣは、ステップ（ｃ）における３～１９日目のいずれか及び／又はステップ（ｄ）における１１～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項９８に記載の方法。
【１３４１】
１０１．抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞（ａＡＰＣ）又は自己ＡＰＣである、請求項９５に記載の方法。
【１３４２】
１０２．治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される、請求項９５～１０１のいずれか一項に記載の方法。
【１３４３】
１０３．ステップ（ｃ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項９５に記載の方法。

【１３４４】
１０４．ステップ（ｄ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項９５に記載の方法。
【１３４５】
１０５．ステップ（ａ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項９５に記載の方法。
【１３４６】
１０６．小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項９５に記載の方法。
【１３４７】
１０７．ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項９５に記載の方法。
【１３４８】
１０８．肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項１０７に記載の方法。
【１３４９】
１０９．ステップ（ａ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる、請求項９５に記載の方法。
【１３５０】
１１０．ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項９５に記載の方法。
【１３５１】
１１１．ステップ（ａ）におけるＴＩＬは、コア生検から得られる、請求項９５に記載の方法。
【１３５２】
１１２．コア生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項９５に記載の方法。
【１３５３】
１１３．ステップ（ｅ）における回収は、LOVO細胞プロセスシステムを使用して実施される、請求項９５に記載の方法。
【１３５４】
１１４．細胞培養培地は、Ｇコンテナ及びXuri細胞培養バッグからなる群から選択される容器内に提供される、請求項９５に記載の方法。
【１３５５】
１１５．ステップ（ｆ）における輸注バッグは、hypothermosol輸注バッグである、請求項９５に記載の方法。
【１３５６】
１１６．ステップ（ａ）～（ｆ）は、約２１日～約３３日の期間内に実施される、請求項９５に記載の方法。
【１３５７】
１１７．ステップ（ａ）～（ｆ）は、約２１日～約３０日の期間内に実施される、請求項９５に記載の方法。
【１３５８】
１１８．ステップ（ａ）～（ｆ）は、約２１日～約２８日の期間内に実施される、請求項９５に記載の方法。
【１３５９】
１１９．ステップ（ａ）～（ｆ）は、２２日以下の期間内に実施される、請求項９５に記載の方法。
【１３６０】
１２０．ステップ（ａ）～（ｆ）は、２２日以下の期間内に実施される、請求項９６に

記載の方法。
【１３６１】
１２１．ステップ（ｅ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量のＴＩＬのために十分なＴＩＬを含む、請求項９５～１２０のいずれか一項に記載の方法。
【１３６２】
１２２．治療有効投与量のために十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項１２１に記載の方法。
【１３６３】
１２３．ステップ（ｂ）～（ｅ）は、単一の容器内で実施され、ステップ（ｂ）～（ｅ）を単一の容器内で実施することは、ステップ（ｂ）～（ｅ）を複数の容器内で実施することと比較して、切除された腫瘍毎のＴＩＬ収率の増加をもたらす、請求項９５～１２２のいずれか一項に記載の方法。
【１３６４】
１２４．抗原提示細胞は、系を開放することなく、ステップ（ｄ）における第２の期間中にＴＩＬに添加される、請求項９５～１２３のいずれか一項に記載の方法。
【１３６５】
１２５．治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項９５～１２４のいずれか一項に記載の方法。
【１３６６】
１２６．第３のＴＩＬ集団から得られたエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項９５～１２５のいずれか一項に記載の方法。
【１３６７】
１２７．微生物汚染のリスクは、開放系と比較して低減される、請求項９５～１２６のいずれか一項に記載の方法。
【１３６８】
１２８．ステップ（ｇ）からのＴＩＬは、患者に注入される、請求項９５～１２８のいずれか一項に記載の方法。
【１３６９】
１２９．拡大培養された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、癌を有する対象を治療する方法であって、
（ａ）対象から切除された腫瘍からの細針吸引（ＦＮＡ）又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）第１の集団を閉鎖系に添加すること；
（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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、細胞培養培地は、３日目にＯＫＴ－３を補充され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３日間～約１９日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、第１のＴＩＬ集団がコア生検からのものである場合、約１０日～約１９日までに少なくとも５×10^{7}個のＴＩＬを含み、第１の拡大培養は、第１のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために約３～１４日間にわたって実施され、第２のＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より少なくとも２５倍多く、ステップ（ｂ）からステップ（ｃ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約７～１４日間に

わたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、第２のＴＩＬ集団比べてエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞の増加したサブ集団を含むＴ細胞治療用ＴＩＬ集団であり、第２の拡大培養は、第２のガス透過性表面積を提供する閉鎖型容器内で実施され、ステップ（ｃ）からステップ（ｄ）への移行は、系を開放することなく行われる、産生すること；
（ｅ）ステップ（ｄ）から得られた治療用ＴＩＬ集団を回収することであって、ステップ（ｄ）からステップ（ｅ）への移行は、系を開放することなく行われる、回収すること；及び
（ｆ）ステップ（ｅ）から回収されたＴＩＬ集団を輸注バッグに移すことであって、ステップ（ｅ）から（ｆ）への移行は、系を開放することなく行われる、移すこと；
（ｇ）任意選択により、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（ｆ）における回収されたＴＩＬ集団を含む輸注バッグを凍結保存すること；及び
（ｈ）ステップ（ｇ）における輸注バッグから治療有効投与量の第３のＴＩＬ集団を患者に投与すること
を含む方法。

【１３７０】

１３０．ステップ（ｅ）で回収された治療用ＴＩＬ集団は、治療有効投与量のＴＩＬを投与するのに十分なステップ（ｈ）のＴＩＬを含む、請求項１２９に記載の方法。

【１３７１】

１３１．ＡＰＣは、人工ＡＰＣ（ａＡＰＣ）又は自己ＡＣＰである、請求項１２９又は１３０に記載の方法。

【１３７２】

１３２．治療用ＴＩＬ集団は、患者に注入される、請求項１２９～１３１のいずれか一項に記載の方法。

【１３７３】

１３３．ステップ（ｃ）における第１の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１２９に記載の方法。

【１３７４】

１３４．ステップ（ｄ）における第２の拡大培養は、第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地にＯＫＴ－３、ＩＬ－１５、ＯＸ４０アゴニスト性抗体及び／又は４－１ＢＢアゴニスト性抗体を更に補充することによって実施される、請求項１２９に記載の方法。

【１３７５】

１３５．ステップ（ａ）におけるＦＮＡは、少なくとも４００，０００個のＴＩＬを含む、請求項１２９に記載の方法。

【１３７６】

１３６．小生検は、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項１２９に記載の方法。

【１３７７】

１３７．ＦＮＡは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、結腸直腸及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られる、請求項１２９に記載の方法。

【１３７８】

１３８．肺腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）であり、任意選択により、対象は、以前に外科的処置を受けたことがある、請求項１３７に記載の方法。

【１３７９】

１３９．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、ＦＮＡから得られる、請求項１２９に記載の方法。

【１３８０】

１４０．ＦＮＡは、２５～１８ゲージ針を使用して得られる、請求項１３９に記載の方法。

【１３８１】
１４１．ステップ（ｉ）におけるＴＩＬは、コア生検から得られる、請求項１２９に記載の方法。
【１３８２】
１４２．コア生検は、１６～１１ゲージ針を使用して得られる、請求項１４１に記載の方法。
【１３８３】
１４３．ステップ（ｈ）における治療有効投与量の投与に十分なＴＩＬの数は、約２．３×10^{10}～約１３．７×10^{10}個である、請求項１２９に記載の方法。
【１３８４】
１４４．抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、ＰＢＭＣである、請求項１２９に記載の方法。
【１３８５】
１４５．ＰＢＭＣは、ステップ（ｃ）における３～１９日目のいずれか及び／又はステップ（ｄ）における９～１４日目のいずれかに細胞培養物に添加される、請求項１４４に記載の方法。
【１３８６】
１４６．ステップ（ｈ）で治療有効投与量のＴＩＬ細胞を投与する前に、非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、患者に投与されている、請求項１２９～１４５のいずれか一項に記載の方法。
【１３８７】
１４７．骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、６０ｍｇ／m^2／日の用量で２日間にわたってシクロホスファミドを投与し、続いて２５ｍｇ／m^2／日の用量で５日間にわたってフルダラビンを投与するステップを含む、請求項１４６に記載の方法。
【１３８８】
１４８．ステップ（ｈ）で患者にＴＩＬ細胞を投与した翌日に始まる高用量ＩＬ－２レジメンで患者を治療するステップを更に含む、請求項１２９～１４７のいずれか一項に記載の方法。
【１３８９】
１４９．高用量ＩＬ－２レジメンは、忍容量まで８時間毎に１５分ボーラス静脈内注入として投与される６００，０００又は７２０，０００ＩＵ／ｋｇを含む、請求項１４８に記載の方法。
【１３９０】
１５０．治療用ＴＩＬ集団中のエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、ＣＤ２７＋を発現すること、ＣＤ２８＋を発現すること、より長いテロメア、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現からなる群から選択される１つ以上の特徴を呈する、請求項１２９～１４９のいずれかに記載の方法。
【１３９１】
１５１．治療用ＴＩＬ集団におけるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞は、第２の細胞集団から得られるエフェクターＴ細胞及び／又はセントラルメモリーＴ細胞と比べて、増加したＣＤ５７発現及び減少したＣＤ５６発現を呈する、請求項１２９～１５０のいずれか一項に記載の方法。
【１３９２】
１５２．腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を治療用ＴＩＬ集団に拡大培養する方法であって、
（ａ）患者の腫瘍から得られた細針吸引（ＦＮＡ）、小生検又はコア生検から第１のＴＩＬ集団を得ること；
（ｂ）ＩＬ－２、ＯＫＴ－３及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）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り、第１の拡大培養を実施して、第２のＴＩＬ集団を産生することであって、第１の初回刺激拡大培養は、第２のＴＩＬ集団を得るために、第１のガス透過性表面積を含む容器内で約１～７日間の第１の期間にわたって実施され、第２の

ＴＩＬ集団は、数において第１のＴＩＬ集団より多い、産生すること；
（ｃ）第２のＴＩＬ集団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り、第２の拡大培養を実施して、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、第２の急速拡大培養は、第３のＴＩＬ集団を得るために約１日間～約１１日間の第２の期間にわたって実施され、第３のＴＩＬ集団は、治療用ＴＩＬ集団である、産生すること；
（ｄ）ステップ（ｃ）からの治療用ＴＩＬ集団を回収すること
を含む方法。
【実施例】
【１３９３】
実施例
［001476］本明細書に包含される実施形態は、以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は説明のみを目的として提供され、本明細書に包含される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、むしろ本明細書に提供される教示の結果として明らかになるあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。
【１３９４】
実施例１：プレＲＥＰ及びＲＥＰプロセスのための培地調製
［001477］本例は、限定はされないが、転移性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌及び肺腺癌を含めた様々な腫瘍型に由来する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の培養が関わるプロトコルに用いられる組織培養培地の調製手順について説明する。本願及び実施例に記載される任意のＴＩＬの調製にこの培地を使用することができる。
【１３９５】
ＣＭ１の調製
［001478］低温貯蔵庫から以下の試薬を取り出し、３７℃の水浴中で加温した：（ＲＰＭＩ１６４０、ヒトＡＢ血清、２００ｍＭＬ－グルタミン）。以下の表３２に従い、ろ過される容積に適切な０．２μｍフィルターユニットの上部に成分の各々を加えることによりＣＭ１培地を調製した。４℃で保管。
【１３９６】
【表２２】

表 32: CM1 の調製

成分	最終濃度	最終体積 500ml	最終体積 IL
RPMI1640	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	55 μM	0.5mL	1mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50 μg/mL	0.5mL	1mL

【１３９７】
［001479］使用当日、所要量のＣＭ１を３７℃の水浴中で予め加温し、６０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を添加した。
【１３９８】
［001480］追加的な補充－必要があれば表３３に準じる。

【１３９９】
【表２３】

表 33: 必要に応じて、CM1 の追加補充。

補充	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX™	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

【１４００】
ＣＭ２の調製
［001481］ 冷蔵庫から調製済みのＣＭ１を取り出した、又は上記セクション７．３に従い新鮮ＣＭ１を調製する。AIM-V（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、滅菌培地ボトル内に調製済みＣＭ１を等容積のAIM-V（登録商標）と混合することにより、必要な量のＣＭ２を調製した。使用当日、ＣＭ２培地に３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を加えた。使用当日、十分な量の３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２含有ＣＭ２を作成した。ＣＭ２培地ボトルに、その名前、調製者のイニシャル、それがろ過／調製された日付、２週間の有効期限の表示を付し、組織培養に必要になるまで４℃で貯蔵した。
【１４０１】
ＣＭ３の調製
［001482］ 使用が必要になった当日に、ＣＭ３を調製した。ＣＭ３はAIM-V（登録商標）培地と同じであり、使用当日に３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を添加した。AIM-Vのボトル又はバッグにＩＬ－２ストック溶液を直接加えることにより、実験の必要上十分な量のＣＭ３を調製した。軽く振盪することにより十分に混合した。AIM-Vに加えた後すぐに、ボトルに「３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２」の表示を付す。過剰なＣＭ３がある場合、これを培地名、調製者のイニシャル、培地の調製日及びその有効期限（調製後７日）を表示したボトルに４℃で貯蔵した。ＩＬ－２を添加した培地は４℃で７日間の貯蔵後に廃棄した。
【１４０２】
ＣＭ４の調製
［001483］ ＣＭ４はＣＭ３と同じであり、加えて２ｍＭのGlutaMAX（商標）（最終濃度）を添加した。１ＬのＣＭ３について１０ｍｌの２００ｍＭ GlutaMAX（商標）を加えた。AIM-Vのボトル又はバッグにＩＬ－２ストック溶液及びGlutaMAX（商標）ストック溶液を直接加えることにより、実験の必要上十分な量のＣＭ４を調製した。軽く振盪することにより十分に混合した。AIM-Vに加えた後すぐに、ボトルに「３０００ＩＬ／ｍｌ　ＩＬ－２及びGlutaMAX」の表示を付した。過剰なＣＭ４がある場合、これを培地名「GlutaMAX」及び有効期限（調製後７日）とボトルにラベル付けし、４℃で貯蔵した。ＩＬ－２を添加した培地は４℃で７日間の貯蔵後に廃棄した。
【１４０３】
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
［001484］ この実施例では、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、実施例のＴＩＬプロセスと組み合わせて説明する。

【１４０４】
［001485］本明細書に記載されるプロセスを使用して、実験の片腕で、ＩＬ－２の存在下で、結腸直腸、黒色腫、子宮頸、三種陰性乳房、肺及び腎臓の腫瘍から、もう一方で、培養の開始時にＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで、ＴＩＬを成長させた。プレＲＥＰの完了時に、培養物の拡大培養、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮ－γ）及びＴＣＲ　Ｖβレパートリーを評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の箇所及びGruijl, et al.,に記載されている通り、ＩＬ－２１は、ＣＤ２７＋ＣＤ２８＋腫瘍浸潤リンパ球の成長を促進し、細胞傷害能が高く、制御性Ｔ細胞の副次的成長が少ない。Santegoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/）。
【１４０５】
［001486］結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１で処理した条件のＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して複数の組織でＴＩＬ拡大培養の増強（＞２０％）が観察されたことを示した。ＩＬ－２のみの培養物と比べて、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１で処理した培養物から得られたＴＩＬには、偏ったＴＣＲ　Ｖβレパートリーを含むＣＤ８$^{+}$集団が主に偏っていた。ＩＦＮγ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２のみで処理した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。
【１４０６】
実施例３：ガンマ線照射末梢単核球の個々のロットの適格性
［001487］本実施例は、γ線照射した末梢単核球（ＰＢＭＣ、別名ＭＮＣ）の個々のロットが本明細書に記載される例示的方法における同種異系フィーダー細胞としての使用に適格か判定するための新規簡略手順について説明する。
【１４０７】
［001488］各照射ＭＮＣフィーダーロットは個別のドナーから調製した。精製抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体及びインターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下におけるＲＥＰでＴＩＬを拡大培養するその能力に関して各ロット又はドナーを個別にスクリーニングした。加えて、フィーダー細胞の各ロットを、ＴＩＬを加えずに試験して、受けたガンマ線線量がそれらを複製不能にするのに十分であったことを確認した。
【１４０８】
背景
［001489］ＴＩＬのＲＥＰには、γ線照射した拡大培養が止まったＭＮＣフィーダー細胞が必要であった。ＲＥＰフラスコ内でフィーダーＭＮＣ上の膜受容体が抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＴＩＬに架橋することにより、ＴＩＬが拡大培養されるように刺激される。フィーダーロットは、個別のドナーから採取され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Ficoll-Hypaqueで遠心に供し、洗浄し、照射し、且つＧＭＰ条件下で凍結保存した。
【１４０９】
［001490］移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こし得るため、ＴＩＬ療法を受ける患者が生細胞のフィーダー細胞を注入されないことが重要である。従って、フィーダー細胞は、ガンマ線照射を細胞に与え、その結果二本鎖ＤＮＡ切断が生じて再培養時にＭＮＣ細胞が細胞生存能力を失うことにより、拡大培養が止められる。
【１４１０】
判定基準及び実験セットアップ
［001491］フィーダーロットは２つの基準で判定された。１）共培養においてＴＩＬを１００倍超に拡大培養するその能力、及び２）その複製不能性。
【１４１１】
［001492］直立Ｔ２５組織培養フラスコ内で成長させた２つの初代プレＲＥＰ　ＴＩＬ株を利用するミニＲＥＰフォーマットでフィーダーロットを試験した。各ＴＩＬ株がＲＥＰにおいて活性化に応答して拡大培養するその能力はユニークであるため、フィーダーロ

ットは２つの異なるＴＩＬ株に対して試験した。制御として、歴史的に上記の基準に適合することが示されている照射ＭＮＣフィーダー細胞の１ロットを、実験ロットと並行して実施した。

【１４１２】

［001493］単一の実験で試験した全てのロットが等価な試験を受けることを確実にするため、全ての条件及び全てのフィーダーロットの試験に同じプレＲＥＰ　ＴＩＬ株の十分なストックが利用可能であった。

【１４１３】

［001494］試験したフィーダー細胞の各ロットについて、合計６つのＴ２５フラスコがあった：プレＲＥＰ　ＴＩＬライン＃１（２フラスコ）；プレＲＥＰ　ＴＩＬライン＃２（２フラスコ）；及びフィーダー制御（２フラスコ）。ＴＩＬ株＃１及び＃２が入ったフラスコは、フィーダーロットがＴＩＬを拡大培養させる能力を判定した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不能性を判定した。

【１４１４】

実験プロトコル

－２／３日目、ＴＩＬ株の解凍

ＣＭ２培地を調製した。３７℃の水浴中でＣＭ２を加温した。３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を添加した４０ｍｌのＣＭ２を調製した。使用時まで保温する。使用したＴＩＬ株の名前の表示を付した２つの５０ｍＬコニカルチューブの各々に、ＩＬ－２を含まない２０ｍｌの予め加温したＣＭ２を入れた。ＬＮ２貯蔵庫から２つの指定のプレＲＥＰ　ＴＩＬ株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。残りの氷が少量になるまでバイアルを３７℃の水浴中の密封されたジッパー式貯蔵用バッグの内部に置くことにより、バイアルを解凍した。

【１４１５】

［001495］滅菌移送ピペットを使用してバイアルの内容物を直ちに表示を付した調製済み５０ｍＬコニカルチューブ内の２０ｍｌのＣＭ２中に移した。ＩＬ－２を含まないＣＭ２を使用して４０ｍｌまでＱＳして細胞を洗浄した。４００×ＣＦで５分間遠心した。上清を吸引し、３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を添加した５ｍＬの温ＣＭ２に再懸濁した。

【１４１６】

［001496］少量のアリコート（２０μｌ）をデュプリケートで取り出し、自動セルカウンターを使用して細胞をカウントした。カウントを記録した。カウントする一方で、ＴＩＬ細胞が入った５０ｍＬコニカルチューブは、キャップを緩めてガス交換を可能にして、加湿した３７℃、５％CO_2インキュベーターに置いた。細胞濃度を決定し、３０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を添加したＣＭ２でＴＩＬを1×10^6細胞／ｍｌに希釈した。

【１４１７】

［001497］加湿した３７℃インキュベーター内で必要に応じた数のウェルにおいて２４ウェル組織培養プレートの１ウェルあたり２ｍＬでミニＲＥＰの０日目まで培養した。混同及び潜在的な交差汚染を避けるため、異なるＴＩＬ株は別個の２４ウェル組織培養プレートにおいて培養した。

【１４１８】

０日目、ミニＲＥＰを開始する

［001498］試験するフィーダーロットの数に十分なＣＭ２培地を調製した（例えば、１回に４つのフィーダーロットを試験するために、８００ｍＬのＣＭ２培地を調製した）。上記で調製したＣＭ２の一部をアリコートに分け、細胞の培養のため、それに３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を添加した（例えば、１回に４つのフィーダーロットを試験するために、５００ｍＬの３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２含有ＣＭ２培地を調製する）。

【１４１９】

［001499］各ＴＩＬ株を別々に作業して交差汚染を防ぎながら、ＴＩＬ培養物が入った２４ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、ＢＳＣに移した。

【１４２０】

［001500］滅菌移送ピペット又は１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、使用するＴＩＬの各ウェルから約１ｍＬの培地を取り出し、２４ウェル組織培養プレートの使用されていないウェルに入れた。

【１４２１】

［001501］新鮮な滅菌移送ピペット又は１００～１０００μＬピペッター及びチップを使用して、ウェル内で残りの培地をＴＩＬと混合して細胞を再懸濁し、次にＴＩＬ名が表示された５０ｍＬコニカルチューブに細胞懸濁液を移し、容積を記録した。

【１４２２】

［001502］確保しておいた培地でウェルを洗浄し、その容積を同じ５０ｍＬコニカルチューブに移した。細胞を４００×ＣＦでスピンして細胞ペレットを収集した。培地上清を吸引して取り除き、３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を含有する２～５ｍＬのＣＭ２培地中に細胞ペレットを再懸濁する；使用される容積は、回収されるウェルの数及びペレットのサイズに基づく（容積は＞１．３×10^6細胞／ｍｌの濃度を確保するのに十分であろう）。

【１４２３】

［001503］血清用ピペットを使用して、細胞懸濁液を完全に混合し、容積を記録した。２００μｌを取り出し、自動セルカウンターを使用して細胞をカウントした。カウントする一方で、ＴＩＬ細胞が入った５０ｍＬコニカルチューブは、キャップを緩めてガス交換を可能にして、加湿した、５％CO_2、３７℃のインキュベーターに置いた。カウントを記録した。

【１４２４】

［001504］ＴＩＬ細胞が入った５０ｍＬコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を添加した温ＣＭ２中にそれらの細胞を１．３×10^6細胞／ｍｌの濃度で再懸濁した。キャップを緩めたまま、５０ｍＬコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【１４２５】

［001505］第２のＴＩＬ株について上記のステップを繰り返した。

【１４２６】

［001506］実験のためのＴ２５フラスコにＴＩＬをプレーティングする直前に、ＴＩＬは以下に従い１．３×10^5細胞／ｍｌの最終濃度に１：１０希釈した。

【１４２７】

MACS GMP CD3純粋（ＯＫＴ３）作業溶液を調製する

［001507］４℃の冷蔵庫からＯＫＴ３のストック溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を取り出し、ＢＳＣに置いた。ミニＲＥＰの培地中には３０ｎｇ／ｍｌ　ＯＫＴ３の最終濃度を使用した。

【１４２８】

［001508］実験の各Ｔ２５フラスコ内の２０ｍＬについて６００ｎｇのＯＫＴ３が必要であった；これは各２０ｍｌについて６０μｌの１０μｇ／ｍｌ溶液又は各フィーダーロットについて試験する６つ全てのフラスコについて３６０μｌの相当量であった。

【１４２９】

［001509］試験する各フィーダーロットについて、１０μｇ／ｍｌの作業濃度に対して４００μｌの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍｌのＯＫＴ３を作成した（例えば、１回に４つのフィーダーロットを試験するために、１６００μｌの１：１００希釈の１ｍｇ／ｍｌのＯＫＴ３：１６μｌの１ｍｇ／ｍｌのＯＫＴ３＋１．５８４ｍＬの３０００ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２含有ＣＭ２培地を作成した）。

【１４３０】

Ｔ２５フラスコを調製する

［001510］各フラスコに表示を付し、フィーダー細胞を調製する前にフラスコにＣＭ２培地を充填した。フラスコを３７℃の加湿された５％CO_2インキュベーターに置くことにより、残りの構成成分を加えるまでの間、培地を保温した。フィーダー細胞を調製し終えたら、各フラスコ内のＣＭ２に構成成分を加える。

【１４３１】
【表２４】

表34: 溶液

成分	共培養フラスコ中の体積	対照(フィーダーのみ)フラスコ中の体積
CM2 + 3000 IU/ml IL-2	18ml	19ml
CM2中MNC: 1.3×10^7/ml + 3000IU IL-2 (最終濃度 1.3×107/フラスコ)	1ml	1ml
CM2中OKT3: 10μg/ml + 3000IU IL-2	60μl	60μl
CM2中TIL: 1.3×10^5/ml + 3000IUのIL-2 (最終濃度 1.3×10^5/フラスコ)	1ml	0

【１４３２】
フィーダー細胞を調製する
［001511］本プロトコルについて、試験した１ロットあたり最低７８×１０^{6}個のフィーダー細胞が必要であった。ＳＤＢＢによって凍結された各１ｍｌバイアルは、凍結時に１００×１０^{6}個の生細胞を有した。ＬＮ２貯蔵庫からの解凍時に５０％回収率と仮定すると、各ＲＥＰについて推定１００×１０^{6}個の生細胞を所与として、１ロットあたりフィーダー細胞の１ｍＬバイアルを少なくとも２本解凍することが推奨された。代わりに、１．８ｍｌバイアルで供給される場合、１本のバイアルのみで十分なフィーダー細胞が提供された。
【１４３３】
［001512］フィーダー細胞の解凍前に、試験しようとする各フィーダーロットについて約５０ｍＬのＩＬ－２不含ＣＭ２を予め加温した。ＬＮ２貯蔵庫から指定のフィーダーロットバイアルを取り出し、ジッパー式貯蔵用バッグに入れ、氷上に置いた。３７℃の水浴に浸すことにより、閉じたジッパー式貯蔵用バッグ内でバイアルを解凍した。ジッパー式バッグからバイアルを取り出し、７０％ＥｔＯＨを噴霧するか又はそれで拭き取り、バイアルをＢＳＣに移した。
【１４３４】
［001513］移送ピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を５０ｍＬコニカルチューブ内の３０ｍＬの温ＣＭ２中に直ちに移した。バイアルを少量のＣＭ２で洗浄してバイアル内に残った細胞を全て取り出した。４００×ＣＦで５分間遠心した。上清を吸引し、４ｍＬ温ＣＭ２＋３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２に再懸濁した。２００μｌを取り出し、自動セルカウンターを使用して細胞をカウントした。カウントを記録した。
【１４３５】
［001514］細胞を温ＣＭ２＋３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２中に１．３×１０^{7}細胞／ｍｌで再懸濁した。ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍｌ～１．３×１０^{5}細胞／ｍｌに希釈した。
【１４３６】
共培養をセットアップする
［001515］ＴＩＬ細胞を１．３×１０^{6}細胞／ｍｌ～１．３×１０^{5}細胞／ｍｌに希釈した。１５ｍＬコニカルチューブに４．５ｍｌのＣＭ２培地を加えた。インキュベーターからＴＩＬ細胞を取り出し、１０ｍＬ血清用ピペットを使用して十分に再懸濁した。１．３×１０^{6}細胞／ｍｌ　ＴＩＬ懸濁液から０．５ｍＬの細胞を取り出し、１５ｍＬコニカルチューブ内の４．５ｍＬの培地に加えた。ＴＩＬストックバイアルをインキュベーターに戻した。十分に混合した。第２のＴＩＬ株について繰り返した。単一のフィーダーロットについての予め加温した培地が入ったフラスコをインキュベーターからＢＳＣに移した。１ｍＬピペットチップで上下に数回ピペッティングすることによりフィーダー細胞を混合し、１ｍｌ（１．３×１０^{7}細胞）をそのフィーダーロットの各フラスコに移した。各フラスコに６０μｌのＯＫＴ３作業ストック（１０μｇ／ｍｌ）を加えた。２つの対照フ

ラスコをインキュベーターに戻した。
【１４３７】
［001516］１ｍｌ（１．３×１０^{5}）の各ＴＩＬロットを対応する表示の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、直立でインキュベートした。５日目まで手を加えなかった。
【１４３８】
［001517］試験した全てのフィーダーロットについて繰り返した。
【１４３９】
５日目、培地交換
３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２でＣＭ２を調製した。各フラスコに１０ｍＬ必要である。１０ｍｌピペットで、３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を含む１０ｍＬ温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日目まで直立でインキュベートした。試験した全てのフィーダーロットについて繰り返した。
【１４４０】
７日目、回収
［001518］インキュベーターからフラスコを取り出してＢＳＣに移し、且つフラスコの底にある細胞層を乱さないよう注意を払った。フラスコの底に成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから１０ｍｌの培地及び対照フラスコの各々から１５ｍｌの培地を取り出した。
【１４４１】
［001519］１０ｍＬ血清用ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、十分に混合して細胞集塊を全て壊した。ピペッティングにより細胞懸濁液を完全に混合した後、２００μｌを取り出して細胞をカウントした。適切な標準実施要領を自動セルカウンター装置と併せて用いてＴＩＬをカウントした。７日目のカウントを記録した。
【１４４２】
［001520］試験した全てのフィーダーロットについて繰り返した。
【１４４３】
［001521］以下の表ＴＴに従い、フィーダー対照フラスコについて複製不能性を判定し、且つＴＩＬが入ったフラスコについて０日目からの拡大倍数を判定した。
【１４４４】
７日目、１４日目までのフィーダー対照フラスコの継続
［001522］７日目にフィーダー対照フラスコをカウントし終えた後、対照フラスコの各々に、３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を含有する新鮮ＣＭ２培地１５ｍＬを加えた。対照フラスコをインキュベーターに戻し、１４日目まで直立位置でインキュベートした。
【１４４５】
１４日目、フィーダー対照フラスコの非拡大培養の延長
［001523］インキュベーターからフラスコを取り出してＢＳＣに移し、且つフラスコの底にある細胞層を乱さないよう注意を払った。フラスコの底に成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコから約１７ｍｌの培地を取り出した。５ｍＬ血清用ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、十分に混合して細胞集塊を全て壊した。各フラスコの容積を記録した。
【１４４６】
［001524］ピペッティングにより細胞懸濁液を完全に混合した後、２００μｌを取り出して細胞をカウントした。適切な標準実施要領を自動セルカウンター装置と併せて用いてＴＩＬをカウントした。カウントを記録した。
【１４４７】
［001525］試験した全てのフィーダーロットについて繰り返した。
【１４４８】
結果及び適合基準
結果

［001526］ガンマ線照射の線量はフィーダー細胞を複製不能にするのに十分であった。全てのロットが判定基準に適合するものと予想され、また、０日目と比較してＲＥＰ培養の７日目に残る生存フィーダー細胞総数の減少も実証された。

【１４４９】

［001527］全てのフィーダーロットが、ＲＥＰ培養の７日目までにＴＩＬ増殖の１００倍の拡大という判定基準に適合するものと予想された。

【１４５０】

［001528］フィーダー対照フラスコの１４日目のカウントは、７日目に見られた非拡大培養傾向が続くものと予想された。

【１４５１】

適合基準

［001529］フィーダー細胞の各ロットについて試験した各複製ＴＩＬ株は、以下の適合基準を満たしていた。

【１４５２】

［001530］以下の通り（以下の表３５に概説する）、適合は２倍であった。

【１４５３】

【表２５】

表35: 適合基準

試験	適合基準
MNCの照射/複製機能不全	7日目及び14日目に成長は観察されず
TIL拡大培養	各TILの少なくとも100倍の拡大 (最小1.3 x 10^7生細胞)

【１４５４】

［001531］３０ｎｇ／ｍｌ　ＯＫＴ３抗体及び３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２の存在下で培養したとき放射線量がＭＮＣフィーダー細胞を複製不能にするのに十分であったかどうかを判定した。複製不能かどうかは、ＲＥＰの７日目及び１４日目に自動細胞カウントによって決定したときの総生細胞数（ＴＶＣ）によって判定した。

【１４５５】

［001532］適合基準は「成長なし」であったが、これは、ＲＥＰの０日目に培養を開始した初期生細胞数から７日目及び１４日目に総生細胞数が増加しなかったことを意味した。

【１４５６】

［001533］フィーダー細胞がＴＩＬ拡大培養を支持する能力を判定した。ＲＥＰの０日目の培養開始からＲＥＰの７日目までの生細胞の拡大倍数の点でＴＩＬ成長を測定した。７日目、自動細胞カウントによって判定したとき、ＴＩＬ培養物は最低でも１００倍の拡大（即ちＲＥＰ　０日目に培養を開始した総ＴＩＬ生細胞数の１００倍より多い）を実現した。

【１４５７】

適合基準を満たさないＭＮＣフィーダーロットのコンティンジェンシーテスト

［001534］ＭＮＣフィーダーロットが上記に概説される適合基準のいずれかを満たさなかった場合、その原因として単純な実験者エラーを排除するため以下のステップを行ってロットを再試験する。

【１４５８】

［001535］ロットのサテライトの試験バイアルが２つ以上残っている場合、そのロットは再試験した。ロットのサテライトの試験バイアルが１つ残っているか又は残っていなかった場合、上記に挙げる適合基準に基づきそのロットは不適合とした。

【１４５９】

［001536］適格とされるには、問題のロット及び対照ロットが適合基準を達成しなけれ

ばならなかった。これらの基準に適合すると、そのロットはリリースされた。
【１４６０】
実施例４：ガンマ線照射末梢血単核球の個々のロットの適格性
［001537］本実施例は、γ線照射末梢血単核球（ＰＢＭＣ）の個々のロットが本明細書に記載される例示的方法における同種異系フィーダー細胞としての使用に適格か判定するための新規簡略手順について記載する。本例は、臨床用ＴＩＬロットの生産における使用に関する照射ＰＢＭＣ細胞ロットの判定プロトコルを提供する。個別のドナーから各照射ＰＢＭＣロットを調製した。１００を超える適格性判定プロトコルを通して、いずれの場合にも、ＳＤＢＢ（サンディエゴ血液バンク（San Diego Blood Bank））からの照射ＰＢＭＣロットはＲＥＰの７日目にＴＩＬを＞１００倍に拡大することが示されている。この改良された適格性判定プロトコルは、受けたガンマ線線量がそれらを複製不能にするのに十分であったことを確認するため更に試験されたＳＤＢＢからの照射ドナーＰＢＭＣロットに適用することが意図された。それが１４日間にわたって複製不能を維持することが実証されると、ドナーＰＢＭＣロットは、臨床用ＴＩＬロットの生産への使用に「適格である」と見なした。
【１４６１】
背景
［001538］ＴＩＬの現行の標準ＲＥＰには、γ線照射した拡大培養が止まったＰＢＭＣが必要であった。培養下でＰＢＭＣ上の膜受容体が抗ＣＤ３（クローンＯＫＴ３）抗体に結合し、ＴＩＬに架橋することにより、ＴＩＬが拡大するように刺激される。ＰＢＭＣロットは、個別のドナーから採取され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Ficoll-Hypaqueで遠心に供し、洗浄し、照射し、且つＧＭＰ条件下で凍結保存した。
【１４６２】
［001539］移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を引き起こし得るため、ＴＩＬ療法を受けた患者が生細胞ＰＢＭＣを注入されないことが重要である。従ってドナーＰＢＭＣは、ガンマ線照射を細胞に与え、その結果二本鎖ＤＮＡ切断が生じて再培養時にＰＢＭＣが細胞生存能力を失うことにより、拡大培養が止められる。
【１４６３】
判定基準
［001540］７．２．１　照射ＰＢＭＣロットの判定基準はその複製不能性であった。
【１４６４】
実験セットアップ
［001541］直立Ｔ２５組織培養フラスコを使用して、フィーダーロットをＴＩＬと共培養したかのようにミニＲＥＰフォーマットで試験した。対照ロット：歴史的に７．２．１の基準に適合することが示されている照射ＰＢＭＣの１つのロットを、対照として実験ロットと並行して実行した。試験する照射ドナーＰＢＭＣの各ロットについて、デュプリケートのフラスコを実行した。
【１４６５】
実験プロトコル
０日目
［001542］試験しようとするドナーＰＢＭＣの各ロットについて約９０ｍｌのＣＭ２培地を調製した。ＣＭ２は３７℃の水浴中に保温した。６×１０^{6}ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２のアリコートを解凍した。ＣＭ２培地をＢＳＣに戻し、７０％ＥｔＯＨで拭き取った後、フードに置いた。試験するＰＢＭＣの各ロットについて、約６０ｍＬのＣＭ２を別個の滅菌ボトルに取り出した。解凍した６×１０^{6}ＩＵ／ｍｌストック溶液からのＩＬ－２を３０００ＩＵ／ｍｌの最終濃度でこの培地に加えた。このボトルに「ＣＭ２／ＩＬ２」（又は類似）の表示を付して、それを無添加のＣＭ２と区別した。
【１４６６】
ＯＫＴ３を調製する

[001543] ４℃の冷蔵庫から抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）のストック溶液を取り出し、ＢＳＣに置いた。ミニＲＥＰの培地中には３０ｎｇ／ｍｌ　ＯＫＴ３の最終濃度を使用した。１ｍｇ／ｍｌストック溶液からの抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）の１０μｇ／ｍｌ作業溶液を調製した。必要になるまで冷蔵庫に置いた。

【１４６７】

[001544] 試験した各ＰＢＭＣロットについて、１５０μｌの１：１００希釈の抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）ストックを調製する。例えば、１回に４つのＰＢＭＣロットを試験するために、３０００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２を添加した５９４μｌのＣＭ２に６μｌの１ｍｇ／ｍｌストック溶液を加えることにより、６００μｌの１０μ／ｍｌ抗ＣＤ３（ＯＫＴ３）を調製する。

【１４６８】

フラスコを調製する

[001545] 表示を付したＴ２５フラスコに、１フラスコあたり１９ｍＬのＣＭ２／ＩＬ－２を加え、細胞を調製する間、フラスコを３７℃の加湿５％CO_2インキュベーターに置いた。

【１４６９】

照射ＰＢＭＣを調製する

[001546] 試験しようとするＰＢＭＣロットのバイアルをＬＮ２貯蔵庫から取り出した。それらのバイアルは解凍時まで－８０℃に置くか又はドライアイス上に保った。解凍しようとする各ロットについて３０ｍＬのＣＭ２（ＩＬ－２の添加なし）を５０ｍＬコニカルチューブに入れた。各チューブに解凍しようとするＰＢＭＣの異なるロット番号の表示を付した。使用時まで、チューブのキャップを確実に閉めて３７℃の水浴中に置いた。必要に応じて、５０ｍＬコニカルチューブをＢＳＣに戻し、７０％ＥｔＯＨで拭き取った後、フードに置いた。

【１４７０】

[001547] 低温貯蔵庫からバイアルＰＢＭＣを取り出し、３７℃の水浴中のフローティングチューブラックに置いて解凍した。解凍は、バイアル内に少量の氷が残るまで進行させた。滅菌移送ピペットを使用して、バイアルの内容物を５０ｍＬコニカルチューブ内の３０ｍＬのＣＭ２中に直ちに移した。チューブから約１ｍＬの培地を取り出してバイアルをリンスした；リンス液を５０ｍＬコニカルチューブに戻した。キャップを確実に閉め、静かに回して細胞を洗浄した。

【１４７１】

[001548] 室温において４００×ｇで５分間遠心した。上清を吸引し、１０００μｌピペットチップを使用して１ｍＬの温ＣＭ２／ＩＬ－２中に細胞ペレットを再懸濁した。代わりに、培地を加える前に、キャップを閉めたチューブを空のチューブラックに沿って引きずることにより細胞ペレットを再懸濁した。細胞ペレットの再懸濁後、ＣＭ２／ＩＬ－２培地を使用して容積を４ｍＬにした。容積を記録した。

【１４７２】

[001549] 少量のアリコート（例えば１００μｌ）を取り出し、自動セルカウンターを使用して細胞をカウントした。カウントは、詳細な自動セルカウンターＳＯＰに基づきデュプリケートで実施した。細胞カウントの実施前にＰＢＭＣの希釈を実施する必要がある可能性が最も高かった。推奨される出発希釈は１：１０であったが、これは使用するセルカウンターのタイプに応じて異なっていた。カウントを記録した。

【１４７３】

[001550] ＣＭ２／ＩＬ－２培地を使用してＰＢＭＣの濃度を１．３×10^7細胞／ｍｌに調製した。静かに回すことによるか、又は血清用ピペットを使用して静かに上下に吸引することにより十分に混合した。

【１４７４】

培養フラスコをセットアップした

[001551] ２つの表示を付したＴ２５フラスコを組織培養インキュベーターからＢＳＣ

に戻した。抗ＣＤ３／ＯＫＴ３の１０μｇ／ｍｌバイアルをＢＳＣに戻した。フラスコに１ｍＬの１．３×１０^{7}ＰＢＭＣ細胞懸濁液を加えた。各フラスコに６０μｌの１０μｇ／ｍｌ抗ＣＤ３／ＯＫＴ３を加えた。キャップを閉めたフラスコを組織培養インキュベーターに戻し、手を加えることなく１４日間成長させた。次のロットに必要になるまで抗ＣＤ３／ＯＫＴ３バイアルを冷蔵庫に入れ戻した。判定しようとするＰＢＭＣのロット毎に繰り返した。

【１４７５】

１４日目、ＰＢＭＣの非拡大培養性の測定

[001552] 複製したＴ２５フラスコをＢＳＣに戻した。各フラスコについて、新鮮な１０ｍＬ血清用ピペットを使用してフラスコの各々から約１７ｍＬを取り出し、次に残りの培地を慎重に抜き取って、フラスコ内に残る容積を測定した。容積を記録した。

【１４７６】

[001553] 同じ血清用ピペットを使用して上下にピペッティングすることによりサンプルを十分に混合した。

【１４７７】

[001554] カウントのため各フラスコから２００μｌサンプルを取り出した。自動セルカウンターを使用して細胞をカウントした。判定しようとするＰＢＭＣのロット毎にステップを繰り返した。

【１４７８】

結果及び適合基準

結果

[001555] ガンマ線照射の線量はフィーダー細胞を複製不能にするのに十分であると予想された。全てのロットが判定基準に適合するものと予想され、０日目と比較してＲＥＰ培養の１４日目に残る生存フィーダー細胞総数の減少が実証された。

【１４７９】

適合基準

[001556] 試験した各照射ドナーＰＢＭＣロットについて、以下の適合基準が満たされた：「成長なし」－１４日目の総生細胞数が、ＲＥＰの０日目に培養を開始した初期生細胞数より少なかったことを意味した。

【１４８０】

適合基準を満たさないＰＢＭＣロットのコンティンジェンシーテスト

[001557] 照射ドナーＰＢＭＣロットが上記の適合基準を満たさなかった場合、その不適合の原因として単純な実験者エラーを排除するため以下のステップを行ってロットを再試験した。ロットのサテライトのバイアルが２つ以上残っていた場合、そのロットは再試験した。ロットのサテライトのバイアルが１つ残っているか又は残っていない場合、上記の適合基準に基づきそのロットは不適合とした。

【１４８１】

[001558] 適格とされるには、コンティンジェンシーテストを受けるＰＢＭＣロットが、適合基準を達成する対照ロットと問題のロットの両方の複製との両方を有していた。これらの基準に適合すると、そのロットはリリースされた。

【１４８２】

実施例５：ＩＬ－２ストック溶液の調製（Cellgenix）

[001559] この実施例は、精製され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願及び実施例に記載されたものを全て含む更なる組織培養プロトコルでの使用に適したストックサンプルに溶解するプロセスを説明する。

【１４８３】

手順

[001560] ０．２％酢酸溶液（ＨＡｃ）を調製した。２９ｍＬ滅菌水を５０ｍＬ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加えた。チューブを２～３回反転させることにより十分に混合した。Steriflipフィルターを使用してろ過

することによりＨＡｃ溶液を滅菌した。

【１４８４】

［００１５６１］　ＰＢＳ中で１％ＨＳＡを調製した。１５０ｍＬ滅菌フィルターユニット内の９６ｍＬ　ＰＢＳに４ｍＬの２５％ＨＳＡストック溶液を加えた。溶液をろ過した。４℃で貯蔵。調製したｒｈＩＬ－２の各バイアルについて、書式に記入した。

【１４８５】

［００１５６２］　ｒｈＩＬ－２ストック溶液（６×１０^{6}ＩＵ／ｍＬ最終濃度）を調製した。ｒｈＩＬ－２はロット毎に異なり、製造者の分析証明書（ＣＯＡ）に掲載されている以下のような情報が必要であった：１）１バイアルあたりのｒｈＩＬ－２の質量（ｍｇ）、２）ｒｈＩＬ－２の比活性（ＩＵ／ｍｇ）及び３）推奨０．２％ＨＡｃ再構成容量（ｍＬ）

【１４８６】

［００１５６３］　ｒｈＩＬ－２ロットに必要な１％ＨＳＡの容積は、以下の式を用いて計算した。

【数１】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量(mg)×生物学的活性 } \left(\frac{IU}{mg}\right)}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) = \text{HAc体積(mL) = 1\%HSA体積(mL)}$$

【１４８７】

［００１５６４］　例えば、CellGenixのｒｈＩＬ－２ロット１０２００１２１　ＣＯＡによれば、１ｍｇバイアルの比活性は２５×１０^{6}ＩＵ／ｍｇである。２ｍＬの０．２％ＨＡｃ中にｒｈＩＬ－２を再構成することが推奨されている。

【数２】

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^{6}\ \frac{IU}{mg}}{6x10^{6}\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

【１４８８】

［００１５６５］　ＩＬ－２バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭き取った。３ｍＬシリンジに取り付けた１６Ｇ針を使用して、推奨容積の０．２％ＨＡｃをバイアルに注入した。針を引き抜くときに栓が外れないよう注意を払った。バイアルを３回反転させて、粉末が全て溶解するまで回した。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いておいた。計算した容積の１％ＨＳＡをバイアルに加えた。

【１４８９】

［００１５６６］　ｒｈＩＬ－２溶液の貯蔵。短期貯蔵（＜７２時間）の場合、バイアルを４℃で貯蔵した。長期貯蔵（＞７２時間）について、バイアルを少量のアリコートに分け、使用直前まで－２０℃でクライオバイアルに貯蔵した。凍結／解凍サイクルを避けた。調製日から６ヵ月後に期限切れとした。ｒｈ－ＩＬ－２表示には、販売業者及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、作業者イニシャル、アリコートの濃度及び容積が含まれた。

【１４９０】

実施例６：凍結保存プロセス

［００１５６７］　この実施例では、CryoMed Controlled Rate Freezer、Model 7454（Thermo Scientific）を使用して、実施例Ｇで説明した短縮閉鎖手順で調製したＴＩＬの凍結保存プロセス方法について説明する。

【１４９１】
［001568］使用した機器は、アルミニウム製カセットホルダーラック（ＣＳ７５０冷凍バッグと互換性あり）、７５０ｍＬバッグのための低温保存カセット、低圧（２２ｐｓｉ）液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー（バッグのためのリボンタイプ）及びCryoStore　ＣＳ７５０凍結バッグ（OriGen Scientific）であった。
【１４９２】
［001569］凍結プロセスは、核形成から－２０℃まで０．５℃の速度及び最終温度－８０℃まで１分間に１℃の冷却速度を提供する。プログラムパラメータ、ステップ１－４℃で待機；ステップ２：１．０℃／分（サンプル温度）から－４℃；ステップ３：２０．０℃／分（チャンバ温度）から－４５℃；ステップ４：１０．０℃／分（チャンバ温度）から－１０．０℃；ステップ５：０．５℃／分（チャンバ温度）から－２０℃；及びステップ６：１．０℃／分（サンプル温度）－８０℃までである。
【１４９３】
実施例７：ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１サイトカインカクテルの使用
［001570］この実施例では、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、実施例１～６のＴＩＬプロセスと組み合わせて説明する。
【１４９４】
［001571］実施例１～９のプロセスを使用して、実験の片腕で、ＩＬ－２の存在下で、結腸直腸、黒色腫、子宮頸、三種陰性乳房、肺及び腎臓の腫瘍から、もう一方で、培養の開始時にＩＬ－２の代わりにＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１の組み合わせで、ＴＩＬを成長させた。プレＲＥＰの完了時に、培養物の拡大培養、表現型、機能（ＣＤ１０７ａ＋及びＩＦＮγ）及びＴＣＲ　Ｖβレパートリーを評価した。ＩＬ－１５及びＩＬ－２１は、本明細書の他の箇所及びGruijl, et al.,に記載されている通り、ＩＬ－２１は、ＣＤ２７＋ＣＤ２８＋腫瘍浸潤リンパ球の成長を促進し、細胞傷害能が高く、制御性Ｔ細胞の副次的成長が少ない。Santegoets, S. J., J Transl Med., 2013, 11:37（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/）。
【１４９５】
［001572］結果は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１で処理した条件のＣＤ４$^+$及びＣＤ８$^+$細胞の両方で、ＩＬ－２のみの条件と比較して複数の組織でＴＩＬ拡大培養の増強（＞２０％）が観察されたことを示した。ＩＬ－２のみの培養物と比べて、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１で処理した培養物から得られたＴＩＬには、偏ったＴＣＲ　Ｖβレパートリーを含むＣＤ８$^+$集団が主に偏っていた。ＩＦＮγ及びＣＤ１０７ａは、ＩＬ－２のみで処理した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。
【１４９６】
実施例８：細針吸引（ＦＮＡ）及びコア針生検による腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の拡大培養
Ｉ．背景
［001573］この実施例では、細針吸引又はコア針生検によって得られた腫瘍サンプルから拡大培養する腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）に関連するデータを提供する。
【１４９７】
［001574］研究の目標は、コア針生検又は細針吸引のいずれかからＴＩＬを拡大培養する方法を開発することであった。ある場合には、肺癌（ｎ＝３）、黒色腫（ｎ＝１）、頭頸部癌（ｎ＝１）、子宮頸癌（ｎ＝１）、卵巣癌（ｎ＝３）、膵臓癌（ｎ＝２）、神経膠芽腫（ＧＢＭ）及び結腸直腸癌（ｎ＝１）などの癌患者から３～５個の腫瘍サンプルを採取した。
【１４９８】
ＩＩ．膵臓癌患者のコア生検から拡大培養されたＴＩＬ（Ｐ７０１５）。
［001575］研究のために膵臓コア生検を受け取った。２４ウェルプレートの１つのウェ

ルに１つのコアを配置し、合計５つのウェルを配置した。２つのコアが２つのウェルに配置された場合、これらのウェルでは成長がほとんど又はまったく観察されなかった。ＩＬ－２を補充した培養培地で３つのウェルを処理し、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含むサイトカインカクテルを補充した培養培地で２つのウェルを処理した。ＩＬ－２のみで処理したウェル（図８Ａ）及びサイトカインカクテルで処理したウェル（図８Ｂ）で生細胞が観察された。ＩＬ－２処理により、約１．３×１０^{6}個の生細胞／ウェル（平均で１．２×１０^{6}個の生細胞／ウェル）が得られた。サイトカインカクテル処理により、約２．３×１０^{6}個の生細胞／ウェル（平均２．０×１０^{6}個の生細胞／ウェル）が得られた。

【１４９９】

［001576］図１７Ａ、１７Ｂ及び１７Ｃは、膵臓腫瘍のコア生検に由来するＴＩＬの表現型解析及び機能的状態を示す。ＴＩＬは、膵臓腫瘍から拡大培養され、ＩＬ－２を含む培地又は細胞培養添加物を補充した培地で拡大培養された。ＴＩＬは、膵臓腫瘍からＩＬ－２を補充した培養培地及び細胞培養添加物を含む培養培地で拡大培養された（図１７Ｄ）。図１７Ａは、ＣＤ３＋、ＣＤ４＋、ＣＤ８＋、ＣＤ１９＋、ＣＤ３＋／ＣＤ５６＋又はＣＤ３－／ＣＤ５６＋であった細胞のパーセンテージを示す。図１７Ｂは、ホルボール１２－ミリスチン酸１３－アセテート（ＰＭＡ）による刺激後のＣＤ４＋サブ集団におけるＣＤ１０７ａ細胞のパーセンテージを、非刺激状態と比較して示す。図１７Ｃは、膵臓コア生検から拡大培養されたＴＩＬの機能分析を示す。グラフは、ホルボール１２－ミリスチン酸１３－アセテート（ＰＭＡ）による刺激後のＣＤ８＋サブ集団におけるＣＤ１０７ａ細胞のパーセンテージを、非刺激状態と比較して示す。

【１５００】

［001577］膵臓コア生検から拡大培養した細胞の大部分は、Ｔ細胞（ＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞）である。ＰＭＡによる刺激は、ＣＤ１０７ａ＋の発現によって示されるように、ＣＤ８＋が脱顆粒する能力を実証し、それにより、これらの細胞は機能的であることを示唆する。ＣＤ８＋を発現するＣＤ１０７ａ＋の割合は、ＩＬ－２単独と比較して、培養添加物ウェルで処理したウェルの方が高かった（図１７Ｃ）。

【１５０１】

ＩＩＩ．子宮頸癌の患者の細針吸引から拡大培養されたＴＩＬ（Ｃ２００５）。

［001578］研究のために子宮頸部腫瘍を受け取った。２２ゲージ針及びシリンジを使用して、腫瘍から５本の細針吸引を単離した。各ＦＮＡサンプルを２４ウェルプレートの少なくとも３つのウェルに入れた。各サンプルの２つのウェルをＩＬ－２で処理し、各サンプルの１つのウェルをサイトカインカクテル（ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１）で処理した。

【１５０２】

［001579］図１０Ａは、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞がＩＬ－２で処理されたＦＮＡに存在したことを示す。平均して３．４５×１０^{5}個の生細胞／ウェルがＩＬ－２処理ウェルに存在した。図１０Ｂは、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞がサイトカインカクテルで処理されたＦＮＡに存在したことを示す。平均して８．６９×１０^{5}個の生細胞／ウェルがこれらのウェルに存在した。ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１で処理された吸引液は、ＩＬ－２で処理された吸引液と比較して、より多くの細胞／ウェルを実証した。ＣＤ８＋細胞のパーセンテージは、ＩＬ－２処理ウェル（８．５８％）と比較して、カクテル処理ウェル（２０．１％）で大きかった。

【１５０３】

ＩＶ．肺癌患者の細針吸引から拡大培養されたＴＩＬ（Ｌ４０３２）。

［001580］研究のために３つの肺腫瘍を受け取った。２２ゲージ針及びシリンジを使用して、腫瘍から細針吸引を単離した。１つのＦＮＡサンプルには、２８％の生細胞を含む１．６×１０^{6}個の細胞が含まれていた。２つのウェル（各条件）を、（１）ＩＬ－２単独又は（２）サイトカインカクテルを補充した培養培地で処理した。更に、対照として、肺腫瘍断片を２４ウェルプレート（各２ウェル）で培養した。１３日目に細胞を回収し、

ＦＡＣＳ分析により評価した。

【１５０４】

[001581] 図１１Ａは、Ｔ細胞がＩＬ－２で処理されたＦＮＡサンプルから拡大培養したことを示す。平均して約４．６４×10^5個の生細胞／ウェルがあった。図１１Ｂは、Ｔ細胞がＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含むカクテルで処理されたＦＮＡサンプルから拡大培養したことを示す。平均して約７．７５×10^5個の生細胞／ウェルがあった。図１１Ｃは、Ｔ細胞がＩＬ－２で処理された肺腫瘍断片から拡大培養したことを示す。平均して約４．２８×10^5個の生細胞／ウェルがあった。

【１５０５】

[001582] 次に、ＦＮＡサンプルから培養されたＴＩＬは、急速拡大培養プロトコル（例えば、第２の拡大培養プロトコル又はステップＤ）を使用して拡大培養された。１４日目に細胞を回収し、ＦＡＣＳ分析により評価した。図１２Ａは、（ｉ）ＩＬ－２、（ｉｉ）ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＬ－２１並びに（ｉｉｉ）ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１からのＩＬ－２で処理されたＦＮＡサンプルからの拡大培養されたＴＩＬの総細胞数を示す。図１２Ａは、第２の拡大培養後、ＴＩＬにＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞（それぞれ８４．１％及び１０．３％）が含まれたことを示す。

【１５０６】

Ｖ．肺癌患者の細針吸引から拡大培養されたＴＩＬ（Ｌ４０３３）。

[001583] ２２ゲージ針及びシリンジを使用して、肺腫瘍から細針吸引を単離した。ＦＮＡサンプルは、７６％の生細胞を含む５．５×10^6個の細胞が含まれていた。１つのG-Rex 10フラスコ（各条件）を、（１）ＩＬ－２単独又は（２）サイトカインカクテルを含む培養培地で処理した。更に、対照として、肺腫瘍断片をG-Rex10フラスコで培養した。１２日目に細胞を回収し、FACS分析により評価した。図１３Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞（４．２５％）及びＣＤ８＋Ｔ細胞（５５．１％）が、ＩＬ－２で処理されたＦＮＡサンプルから得られたことを示している。図１３Ｂは、ＣＤ４＋Ｔ細胞（７．７６％）及びＣＤ８＋Ｔ細胞（５４．５％）がＩＬ－２で処理された腫瘍断片から得られたことを示している。

【１５０７】

[001584] 次に、ＦＮＡサンプルから培養されたＴＩＬは、急速拡大培養プロトコル（例えば、第２の拡大培養プロトコル又はステップＤ）を使用して拡大培養された。吸引液を最初の６日間、コニカルチューブでインキュベートした。１４日目に細胞を回収し、ＦＡＣＳ分析により評価した。図１４は、ＦＮＡサンプルから拡大培養されたＴＩＬ及びＩＬ－２で処理された腫瘍断片の総細胞数を示している。グラフは、ＦＮＡサンプルからのＴＩＬが腫瘍断片からのＴＩＬと同様に拡大培養したことを示している。

【１５０８】

[001585] 類似の実験で、ＦＮＡサンプルは、肺癌患者（Ｌ４０３４）の３つの肺腫瘍サンプルから単離された。ＦＮＡサンプルから約１．０×10^6細胞を、ＩＬ－２のみを補充した培養培地でG-Rex10フラスコ内で１５日間培養した。対照として、４つの腫瘍断片を、ＩＬ－２のみを補充したG-Rex10フラスコ培養培地で培養した。ＦＮＡ培養物から検出可能な細胞はほとんどないか、全く回収されなかった。

【１５０９】

ＶＩ．卵巣癌患者（ＯＶ８０１１、ＯＶ８０１２及びＯＶ８０１３）の細針吸引から拡大培養されたＴＩＬ。

[001586] 研究のために３つの卵巣腫瘍（ＯＶ８０１１、ＯＶ８０１２及びＯＶ８０１３）を受け取った。２２ゲージ針及びシリンジを使用して、腫瘍から細針吸引を単離した。

【１５１０】

[001587] ＯＶ８０１１からのＦＮＡサンプルは、２８％の生細胞を含む３．１９×10^5個の細胞が含まれていた。このＦＮＡサンプルは、４つのウェルに分割された；２つのウェルを、ＩＬ－２を含む培養培地で培養し、２つのウェルは、ＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む培養培地で培養した。ＯＶ８０１２からのＦＮＡサンプルは、１１％の生細胞を含む８．３×10^5個の細胞が含まれていた。このＦＮＡサンプルは２つの

ウェルに分割された。一方のウェルを、ＩＬ－２を含む培養培地で培養し、もう一方のウェルはＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む培養培地で培養した。ＯＶ８０１３からのＦＮＡサンプルは、７％の生細胞を含む１．５×10^5個の細胞が含まれていた。このＦＮＡサンプルは２つのウェルに分割された。一方のウェルを、ＩＬ－２を含む培養培地で培養し、もう一方のウェルはＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む培養培地で培養した。ＦＮＡサンプルからの拡大培養は観察されなかった。

【１５１１】

[001588] 対照として、各腫瘍からの４つの腫瘍断片をG-Rex10フラスコで培養した。一部のフラスコにＩＬ－２のみを含む培養培地を入れ、他のフラスコにＩＬ－２、ＩＬ－１５及びＩＬ－２１を含む培養培地を入れた。図１５は、（１）ＩＬ－２単独又は（２）サイトカインカクテルを含む培養培地で培養された卵巣腫瘍断片に由来する細胞の総細胞数を示す。結果は、第１の拡大培養では、卵巣腫瘍は不十分な拡大培養であったことを示す。

【１５１２】

ＶＩＩ．黒色腫患者の細針吸引からの拡大培養されたＴＩＬ（Ｍ１１０１）。

[001589] 研究のために黒色腫腫瘍（Ｍ１１０１）を受け取った。ＦＮＡサンプルは腫瘍から得られた。サンプルは、６５％の生細胞を含む１．９６×10^6個の細胞が含まれていた。サンプルをG-Rex10フラスコに入れ、ＩＬ－２を補充した培養培地で処理した。対照として、４つの黒色腫腫瘍断片を、G-Rex10フラスコに入れ、ＩＬ－２を補充した培養培地で処理した。細胞は１２日目に回収された。図１６Ａは、ＣＤ４＋Ｔ細胞（２１．４％）及びＣＤ８＋Ｔ細胞（５２．８％）が、ＩＬ－２で処理されたＦＮＡサンプルから拡大培養されたことを示している。図１６Ｂは、ＣＤ４＋Ｔ細胞（１８．０％）及びＣＤ８＋Ｔ細胞（７１．５％）がＩＬ－２で処理された腫瘍断片から拡大培養されたことを示している。

【１５１３】

[001590] 図１８Ａ及び１８Ｂは、コア生検及び細針吸引から得られた結果の要約を提供する。

【１５１４】

ＶＩＩＩ．黒色腫患者の細針吸引からの拡大培養されたＴＩＬ（Ｍ１１０１）。

[001591] プレＲＥＰの１１日目に、吸引液及び断片（ｎ＝２）を含むフラスコで細胞計数を行った。断片を含むプレＲＥＰ培養物を１１日目に回収した（Ｇｅｎ２）。１１日目の細胞数が少ないため、吸引液を含むプレＲＥＰ培養を続けた。吸引液は１８日目に再計数され、その後、２１日目に再計数された（図１９Ａ）。２１日目に、培養物はほぼ６０×10^6個の細胞に達し、細胞はこの時点で回収され、フローサイトメトリーを介して評価された。断片及び吸引液からのプレＲＥＰ　ＴＩＬの表現型（図１９Ｂ）及び機能（ＣＤ１０７ａ発現、図１９Ｃ）は、同等であることが示された。

【１５１５】

[001592] 図１９Ａ、１９Ｂ及び１９Ｃは、別の黒色腫患者（Ｍ１１０７）のＦＮＡサンプルからのＴＩＬ拡大培養を示す。図１９Ａは、拡大培養中の異なる時間での総細胞数を示す。図１９Ｂは、拡大培養されたＴＩＬの表現型を示す。図１９Ｃは、断片及び吸引液からの拡大培養されたＴＩＬの機能分析を示す。グラフは、ＰＭＡによる刺激後のＣＤ４＋及びＣＤ８＋のサブ集団におけるＣＤ１０７ａ細胞のパーセンテージを、非刺激状態と比較して示す。

【１５１６】

実施例９：細針吸引（ＦＮＡ）及びコア針生検による腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の拡大培養

Ｉ．膵臓のコア：データを図２０～２９に示す。

[001593] １５の腫瘍（膵臓、肺、子宮頸部、中皮腫、結腸直腸）が報告された。今日までに、膵臓、子宮頸、肺、口腔及び食道、肉腫の癌を含むさまざまな組織からの３７の腫瘍サンプルを受け取った。

【１５１７】
［001594］到着すると、腫瘍は断片化され、プレ急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）のために、ＩＬ－２が入ったフラスコ／プレートに入れられた。更に、プレＲＥＰ　ＴＩＬは、照射されたＰＢＭＣ、抗ＣＤ３抗体（３０ｎｇ／ｍＬ）及びＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）の存在下で、ＲＥＰプロトコルで増殖された。肺及び肉腫のプレＲＥＰ　ＴＩＬは、４つの腫瘍断片から２４ウェルプレート形式で最大２２日間拡大培養された。他の癌を、G-REX　ＴＩＬの４つの腫瘍断片から最大２２日間拡大培養した。
【１５１８】
ＩＩ．ＴＩＬは、膵臓癌のコア生検から拡大培養できる：図３０～３７に示すデータ。
一般的な結論：
［001595］成長の動態は、Ｐ７０２８及びＰ７０３１の両方で１１～１２日目に細胞がほとんどないことを示したが、２１～２８日目間には顕著な拡大培養が見られた。
【１５１９】
［001596］膵臓コア生検から拡大培養した細胞の大部分は、Ｔ細胞であり、表現型はＣＤ４である。膵臓腫瘍から単離されたＴＩＬは通常ＣＤ４＋である。
【１５２０】
［001597］ＰＭＡによる刺激は、ＣＤ１０７ａ＋の発現によって示されるように、ＣＤ４＋が脱顆粒する能力を実証し、それにより、Ｐ７０１５による先の研究で示されたように、これらの細胞が機能的であることを示唆している。ＣＤ１０７ａの発現は、断片由来のＴＩＬで類似していた。
【１５２１】
［001598］コア由来のＴＩＬは、断片由来のＴＩＬと同様に、プレートバウンド（plate-bound）抗ＣＤ３による再刺激アッセイで有意なレベルのＩＦＮγを分泌した。
【１５２２】
［001599］広範な表現型解析により、腫瘍断片に由来するＴＩＬで評価されたマーカーの大部分が類似の発現を示し、コアからのＴＩＬの成長の結果が断片に類似していることが示唆された。
【１５２３】
［001600］疲弊／活性化パネルは、ＣＤ４＋細胞におけるＰＤ－１、Ｔｉｍ３及びＫＬＲＧ１並びにＣＤ８＋細胞におけるＬＡＧ３、Ｔｉｍ３及びＫＬＲＧ１で有意差を実証した。これらの知見を検証するには、追加の膵臓コア研究が必要である。
【１５２４】
一般的な提案：
［001601］これらの結果は、増殖を強化するために追加の「微調整戦略」を利用しない限り、膵臓コア（及び他の組織）からＴＩＬを正常に増殖させるためのプロセスは、（Ｇｅｎ２についてプレＲＥＰ要件を超えて）培養物に追加の時間がおそらく必要になるであろうことを示唆している（以下を参照されたい）。
【１５２５】
［001602］膵臓コアの予備的な増殖データに基づいて、十分な細胞を得るために２１～２８日目にプレＲＥＰプロセスを行うことを推奨する。
【１５２６】
［001603］このプロセスでは、プレＲＥＰをG-Rex 10又はG-Rex 10MのＣＭ１培地及びＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１で開始するべきである。
【１５２７】
［001604］ＲＥＰはプレＲＥＰの細胞数に応じて、G-Rex 100M又はG-Rex 500Mのいずれかで開始するべきである。
【１５２８】
［001605］G-Rex 500M：細胞数が５×１０^{7}の場合。
【１５２９】
［001606］G-Rex 100M：細胞数が１ー５×１０^{7}の場合。

【１５３０】
［００１６０７］今後の実験では、各容器で十分な細胞増殖に必要な細胞の最小数を決定するために使用される。
【１５３１】
［００１６０８］今後の実験では、ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１単独又はＯＫＴ３とフィーダーを備えたＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１で拡大培養された膵臓コアの増殖、表現型及び機能を比較する。
【１５３２】
実施例１０：コア生検を使用した拡大培養するＴＩＬ
［００１６０９］根拠：
［００１６１０］腫瘍の摘出／切除は、全ての患者にとって適切又は実行可能ではない。この患者のコホートでは、コア生検がＡＣＴ（養子細胞療法）のためのＴＩＬの供給源となり得る。そのようなコア生検は、複数の病変をサンプリングし、潜在的に広範囲のＴＩＬレパートリーを取得することを可能にする。
【１５３３】
［００１６１１］戦略：
［００１６１２］本実施例は、コア生検から、複数の組織からのＴＩＬを拡大培養し、コア生検からのＴＩＬ産生に実行可能な定義されたプロセスを開発する方法を提供する。例えば、２つの例示的なプロセスの図を提供する図３８を参照されたい。
【１５３４】
［００１６１３］データ
［００１６１４］生検から得られたＴＩＬが、表現型的及び機能的に断片から得られたＴＩＬに同等であることも示したＧｅｎ２を使用して、ＴＩＬフォーム生検を拡大培養する能力が膵臓コアについて実証された。
【１５３５】
［００１６１５］７セットの膵臓コア（７～１０コア）をＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１で処理し、プレＲＥＰ’を実施して拡大培養を評価した。３つは正常に拡大培養したが、その成長は非常に変動した。プレＲＥＰ培養では、十分な数の細胞を取得するのに少なくとも２１～２８日必要であった（例えば、図７のステップＡ～Ｅの場合には２１～２８日）。広範な表現型解析により、膵臓腫瘍断片に由来のＴＩＬで評価されたマーカーの大部分が類似の発現を示していた。ＣＤ１０７ａ及びＩＦＮγの発現は、断片由来のＴＩＬで類似していた。
【１５３６】
現在のプロトコル：
［００１６１６］培養３日目にＯＫＴ３＆フィーダーを追加すると、ＴＩＬの収量が増加した。より少ないコア／フラスコを培養し、成長を評価する（例えば、培養された１～２コア）。
【１５３７】
［００１６１７］１～２コア生検（膵臓３つ、黒色腫４つ、乳房１つ及び卵巣１つ）は、３日目にＯＫＴ３＋フィーダーの追加を含む改良型研究規模プロセスの対象となった（図３９～４０を参照されたい）。
・ＴＩＬは、第２のＲＥＰ（例えば、第２の拡大培養）の対象となった。
・膵臓のコアは、＋／－ＩＬ１５＆２１（トリプルカクテル；ＲＥＰ１＆ＲＥＰ２；例えば、第１の拡大培養及び第２の拡大培養）で拡大培養された。
・卵巣のコアは＋／－ＯＸ４０（ＢＭＳ）で処理された（ｎ＝１、予備データ）。
・全てのＴＩＬは第２のＲＥＰの対象となった。
【１５３８】
膵臓
［００１６１８］膵臓のコアに由来するＴＩＬは、ＯＫＴ３＋フィーダーの存在下で正常に拡大培養された。５０ｅ６個以上の細胞が、第１の拡大培養の１１～１７日目までに取得さ

れた。

【１５３９】

［001619］適切な細胞数を取得するには、通常２つのコアが必要であった。

【１５４０】

［001620］トリプルカクテル（ＴＣ：ＩＬ－２、ＩＬ－１５／ＩＬ－２１）を２番目のＲＥＰ（以前にＩＬ－２又はＴＣで培養したもの）に追加しても、ＩＬ－２単独と比較して、ＴＩＬの拡大培養は顕著に変化しなかった。

【１５４１】

［001621］３日目にコア生検にＯＫＴ３＋フィーダーを追加しても、Ｇｅｎ２のような条件を使用して増殖したコアと比較して、ＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８、疲弊、活性化）を顕著に変化させなかった。２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８、疲弊、活性化）は、Ｇｅｎ２条件を使用して増殖したＴＩＬのそれと有意差はなかった。

【１５４２】

［001622］ＣＤ１０７ａの発現は、ＯＫＴ３とフィーダーを追加しても顕著に変化しなかった。ＣＤ１０７ａ誘導によって評価されるように、２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬは、非特異的刺激に応答する能力を維持した。

【１５４３】

［001623］ＣＤ１０７ａ誘導によって評価されるように、２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬは、非特異的刺激に応答する能力を維持した。

【１５４４】

［001624］ＩＦＮγ分泌を評価した。ＴＩＬは、ＯＫＴ３で刺激するとＩＦＮγを生成する。

【１５４５】

［001625］膵臓のＴＩＬは、膵臓癌のコア生検から拡大培養できる。

【１５４６】

ＰＴＯＸＸ及びＰＴＯＸＸプレＲＥＰの実験の概要及び結果

［001626］コア生検はトリプルカクテル（ＩＬ－２／ＩＬ－１５／ＩＬ－２１）と共にG-Rex 10に配置された。

［001627］ＰＴＯＸＸＴＩＬは１２日目に評価され、１９日目まで培養された。

［001628］細胞数：１２日目＝１．６１×10^6個の生細胞；２１日目３．４９×10^7個の生細胞

［001629］ＰＴＯＸＸＴＩＬは１２日目に評価され、２７日目まで培養された。

［001630］細胞数：１２日目＝１．５２×10^5個の生細胞；２７日目：１．１４×10^7生細胞

【１５４７】

黒色腫

［001631］黒色腫コアに由来するＴＩＬは、ＯＫＴ３＋フィーダー（ｎ＝４）の存在下で正常に拡大培養された。５０×10^6個以上の細胞が、第１の拡大培養の１２日目までに取得された。

【１５４８】

［001632］適切な細胞数を取得するには、通常１～２個のコアが必要であった。３日目にコア生検にＯＫＴ３＋フィーダーを追加しても、Ｇｅｎ２のような条件を使用する断片と比較して、ＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８、疲弊、活性化）は顕著に変化しない。

【１５４９】

［001633］ＣＤ１０７ａ動員及びＩＦＮγ分泌によって評価されるように、ＴＩＬは２つのＲＥＰを介して拡大培養され、非特異的刺激に応答した。

【１５５０】

肺

［001634］肺の１コアのＴＩＬは、０日目にＩＬ－２＋ＯＫＴ３＋フィーダーの存在下で正常に拡大培養された。１１日目には、５０×１０^{6}個以上の細胞が取得された。

【１５５１】

［001635］２－ＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８、疲弊、活性化）は、培養開始３日目にＯＫＴ３＋フィーダーで処理されたコアからの拡大培養されたＴＩＬとはわずかに相違があった。３日目の処理されたコアでは、ＣＤ８＋／ＣＤ４＋の比率が増加した。

【１５５２】

［001636］ＣＤ２８、ＣＤ６９、ＣＤ３９、ＣＤ４９ａ、Ｔｉｍ３及びＣＤ１０１の発現にわずかな相違があり、０日目及び３日目の培養条件間で観察された。

【１５５３】

［001637］ＴＩＬは、抗ＣＤ３で刺激によりＩＦＮγを産生した。０日目のＯＫＴ３＋フィーダーで処理された肺コアは、３日目のＯＫＴ３＋フィーダーで処理された肺コアと比較して、ＩＦＮγレベルが高かった。

【１５５４】

［001638］ＣＤ１０７ａ誘導によって評価されるように、２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬは、非特異的刺激に応答する能力を維持した。

【１５５５】

［001639］３日目のＯＫＴ３＋フィーダーで処理された肺コアからのＣＤ８＋ＴＩＬは、０日目のＯＫＴ３＋フィーダーで処理された肺コアＴＩＬと比較して、オリゴクローナルであり、ＯＫＴ３＋フィーダーの追加のタイミングに応じて異なるＴＣＲレパートリーを示した。

【１５５６】

結論

［001640］培養３日目にコアにＯＫＴ３＋フィーダーを追加すると、ＴＩＬ収量が有意に向上した。評価された全ての組織（膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣）の第１の拡大培養から１１～１５日以内に、５０×１０^{6}個以上の細胞（ＲＥＰ２開始のしきい値）が取得された。必要とする細胞数を取得するためには２つのコア（アッセイされた組織）で十分であった。

【１５５７】

［001641］乳房の少なくとも２つのコアのＴＩＬは、ＩＬ－２＋ＯＫＴ３＋フィーダーの存在下で正常に拡大培養されたが、ＩＬ－２単独では拡大培養されなかった。１１日目には、５０×１０^{6}個以上の細胞が取得された。必要とする細胞数を取得するためには、１から２つのコアで十分であった。

【１５５８】

［001642］データは、コアから拡大培養されたＴＩＬの表現型及び機能（初期のＯＫＴ３＋フィーダー付き）が、Ｇｅｎ２条件下で拡大培養されたコア／断片（ＩＬ－２単独）に類似していることを示唆する。卵巣コアにＯＸ４０を追加すると、ＩＬ－２単独と比較して、ＴＩＬの拡大培養が改善された。

【１５５９】

［001643］１～２の膵臓コアは、ＩＬ－２単独で拡大培養できなかった。

【１５６０】

［001644］サイドトゥサイド（side to side）の実験は、３日目に断片＋／－ＯＫＴ３＋フィーダーで実行される。ＴＩＬはＯＫＴ３による刺激でＩＦＮγを産生し、更なる実験が進行中である。ＫＬＲＧ１、ＣＤ２５及びＰＤ１の相違は、＋／－ＯＸ４０（治療用ＴＩＬ集団）で処理された卵巣コアで観察された。

【１５６１】

［001645］表現型、機能（効力）及びＴＣＲレパートリーは評価され、評価され続けている（現在進行中）。３日目にコア生検にＯＫＴ３＋フィーダーを追加しても、Ｇｅｎ２のような条件を使用する断片と比較して、ＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８

、疲弊、活性化）は顕著に変化しなかった。ＣＤ１０７ａ動員及びＩＦＮγ分泌によって評価されるように、ＴＩＬは２つのＲＥＰを介して拡大培養され、非特異的刺激に応答した。２－ＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８、枯渇、活性化）は、胸部コアで１－ＲＥＰプロセスを使用した拡大培養ＴＩＬ（即ち最初の拡大培養中にＯＫＴ３＋フィーダーなし）の表現型と有意差はなかった。

【１５６２】

［００１６４６］ ＫＬＲＧ１及びＰＤ１発現にわずかな相違が観察された。

【１５６３】

［００１６４７］ ＣＤ１０７ａ誘導によって評価されるように、２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬは、非特異的刺激に応答する能力を維持した。

【１５６４】

［００１６４８］ 更なる評価には、３日目のコアの＋／－除去が含まれ、拡大培養されたＴＩＬに対する抗ＯＸ４０の効果の更なる評価も行われる。

実施例１１：ＯＫＴ３＋フィーダーを使用した乳房及び卵巣コア生検から拡大培養するＴＩＬ：実施例９～１０の概要

【１５６５】

［００１６４９］ 乳房からの少なくとも２コアのＴＩＬは、ＩＬ－２＋ＯＫＴ３＋フィーダーの存在下で正常に拡大培養されたが、ＩＬ－２単独では拡大培養されなかった。１１日目には、５０×10^6個以上の細胞が取得された。

【１５６６】

［００１６５０］ 卵巣コアにＯＸ４０を追加すると、ＩＬ－２単独と比較して、ＴＩＬの拡大培養が改善された。

【１５６７】

［００１６５１］ ２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬの表現型（メモリ、ＣＤ２７／ＣＤ２８、疲弊、活性化）は、胸部コアで１－ＲＥＰプロセス（即ち最初の拡大培養中ＯＫＴ３＋フィーダーなし）を使用して拡大培養されたＴＩＬのそれと有意差はなかった。

【１５６８】

［００１６５２］ ＫＬＲＧ１及びＰＤ１発現にわずかな相違が観察された。

【１５６９】

［００１６５３］ ＫＬＲＧ１、ＣＤ２５及びＰＤ１の相違は、＋／－ＯＸ４０（最終産物）で処理された卵巣コアで観察された。

【１５７０】

［００１６５４］ ＴＩＬは、ＯＫＴ３で刺激するとＩＦＮγを生成する。

【１５７１】

［００１６５５］ ＣＤ１０７ａ誘導によって評価されるように、２つのＲＥＰを介して拡大培養されたＴＩＬは、非特異的刺激に応答する能力を維持した。

【１５７２】

［００１６５６］ ３日目にコアにＯＫＴ３＋フィーダーを追加すると、ＴＩＬ収量が顕著に向上した。評価された全ての組織（膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣）の１１～１５日以内に、５０×10^6個以上の細胞（Ｇｅｎ２条件下でＲＥＰ開始のしきい値）が取得された。必要とする細胞数の取得のためには、２つのコア（アッセイされた組織）で十分であった。予備データは、コアから拡大培養されたＴＩＬの表現型及び機能（初期のＯＫＴ３＋フィーダー付き）が、対照条件下で拡大培養されたコア／断片に類似していることを示唆する。

【１５７３】

実施例１２：細針吸引から拡大培養するＴＩＬ

戦略：

［００１６５７］ 細針吸引から、複数の組織学からＴＩＬを拡大培養し、ＴＩＬ産生に実行可能な定義されたプロセスを開発する。予備研究は、ＴＩＬが最適な条件下で実行された「一部の」吸引液から拡大培養できるだろうと実証した（即ち腫瘍生検から直接採取された）。

【１５７４】
［001658］２２個の吸引液が、Ｇｅｎ２条件（即ち３日目にＯＫＴ３とフィーダーなし）を使用して、アイオバンス（Iovance）でさまざまな組織の腫瘍生検から単離された。６つの腫瘍（子宮頸部１つ、肺２つ及び黒色腫３つ）で増殖が観察された。プレＲＥＰ中に単離された細胞数は、５０×１０^{6}個の細胞のしきい値を大幅に下回りった。
【１５７５】
［001659］更に、黒色腫から３つ（ｎ－３）及び乳房から７つ（ｎ－７）を含む、１０個の細針吸引を受け取った。吸引液は、ＯＫＰ３及びフィーダーで処理された。
【１５７６】
［001660］初期の細胞数が少ないため、ほとんどの実験は９６ウェルプレートで開始された。１１日目では、全ての吸引液で５０×１０^{6}個未満の細胞が取得された。必要な数の細胞を取得するには、いくつかの継代培養が必要になるだろう。
【１５７７】
実施例１３：腫瘍コア生検から拡大培養するＴＩＬ
序論
［001661］自己腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を用いた養子Ｔ細胞療法（ＡＣＴ）は、転移性黒色腫及び子宮頸癌の患者に臨床効果を示している。ＴＩＬは現在、外科的に切除された断片化した腫瘍から拡大培養している。残念ながら、切除不可能な腫瘍を有する患者は、現在、ＴＩＬ療法に適していない。診断及び病期診断目的、相関研究並びにイオマーカー分析のために医師が使用する小さい腫瘍サンプルのタイプからＴＩＬ拡大培養が実現可能であれば、ＴＩＬ療法はより多くの癌患者に利用可能になるであろう。
【１５７８】
［001662］コア針生検は、そのような小さい腫瘍サンプルの一例である。これは、外科的切除より安価、安全、手軽及び低侵襲の手順である。コア生検は、小さい切開と針を使用して腫瘍組織の小さいシリンダー（cylinder）を除去する。通常、針を切開部に５回まで挿入して、適切な量の組織を摘出することができる。コア生検は、無傷の腫瘍微小環境の小さいサンプリングであるため、腫瘍細胞、間質及びＴＩＬを含む免疫細胞が含まれる。今日までに、黒色腫において、コア針生検から得られた組織を使用してＴＩＬを拡大培養した１つの臨床研究がある(Ullenhag, G.J., et al., Cancer Immunol Immunother, 61(5):725-732 (2014))。絶対的な細胞数及び拡大倍数は、外科的切除から得られたＴＩＬに対してコア生検から得られたＴＩＬとの間で類似していた。興味深いことに、この研究の客観的応答のほとんど（４／５）は、コア生検に由来する細胞で処理された。これ以上の研究はこれらの知見を裏付けていない。
【１５７９】
［001663］実施形態の一部では、上記及び本実施例で記載されているように、コア生検から得られたＴＩＬを拡大培養するために２ＲＥＰプロセスは利用される。
【１５８０】
目的
［001664］本実施例は、ＡＣＴ（養子細胞移入）のための小さい腫瘍サンプルから臨床的に適切な数にＴＩＬを拡大培養するためのプロトコルを提供する。このプロトコルは、膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣腫瘍からの腫瘍コア生検を使用して開発された。拡大培養されたＴＩＬは、成長、生存率、表現型、機能（ＩＦＮγ分泌、ＣＤ１０７ａ動員）及びＴＣＲＶβレパートリー（ＲＮＡ配列決定）について評価された。
【１５８１】
材料
［001665］腫瘍コア組織。膵臓、黒色腫、乳房及び卵巣からの腫瘍コアは、UPMC、Biotheme及びMTグループから受け取る。
【１５８２】
手順
コア処理及び培養開始

[001666] 新たに切除された腫瘍コア生検は、研究提携（ＵＰＭＣ）及び組織調達供給業者（Ｂｉｏｔｈｅｍｅ及びＭＴＧグループ）から受け取る。腫瘍コア生検は、HypoThermosol（Biolife Solutions、ワシントン州、Ｃａｔ＃１０１１０４）（抗生物質付き）又はRPMI 1640（Fisher Scientific、ペンシルベニア州、Ｃａｔ＃１１８７５－０８５）＋男性のヒトＡＢ血清（Access Biologicals、カリフォルニア州、Ａ１３０１２）で翌日配達される。

【１５８３】

[001667] ５０ｍＬコニカルチューブの上部に０．２２μＭフィルターを使用して、腫瘍コア生検を含む輸送用コンテナの内容物を、フィルターを通して注意深くゆっくりと注ぐ。コアはフィルターに保持される。コア上に１０～２０ｍＬのＨＢＳＳを静かに加えコアを洗浄する。

【１５８４】

[001668] コアを損なわないようにし、フィルター膜から各コアを静かに取り外す。滅菌プラスチック鉗子を使用するか又は穏やかにピペッティング（１ｍＬピペットで約２００μＬのＨＢＳＳを使用）をして、４０ｍＬのＣＭ２及び６０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むG-Rex10にコアを移す。

【１５８５】

ＲＥＰ１の開始（例えば、第１の初回刺激拡大培養）

[001669] 培養後３日目に、ＯＫＴ３（３０ｎｇ／ｍＬ）（Miltenyi Biotec、ドイツ、Ｃａｔ＃１７０－０７６－１１６）及びフィーダー（１：１００）を添加の際に培地を乱すことなく、G-Rex10に添加する。

【１５８６】

[001670] 培養物の成長を毎日顕微鏡で評価する。ＲＥＰ１は、ＯＫＴ３＋フィーダーを添加後、８日間にわたって実施され、１１日目に終了する。細胞は、培養期間中触れずに放置する。

【１５８７】

[001671] 計数するために、約３０ｍＬの培地を取り除き、上下にピペッティングして残りの１０ｍＬの培地に細胞を再懸濁する。細胞を５０ｍＬのコニカルチューブに入れ、Sorvell Legend XFR遠心分離機及びスウィングバケット（ThermoScientific、カリフォルニア州、Ｃａｔ＃７５００３１８０）で、ＲＴで、１５００ｒｐｍで５分間遠心分離する）。

【１５８８】

[001672] Nexcelom Cellometer K2（Nexcelom、マサチューセッツ州）を使用して、細胞数と生存率を特定する。

【１５８９】

[001673] 遠心分離後にペレットがない場合又はペレットが２００μＬ未満の場合、計数のために２ｍＬの培地にペレットを再懸濁する。ペレットが２００μＬ以上の場合、計数のために５ｍＬのＣＭ２培地に再懸濁する。

【１５９０】

[001674] 実験は培養開始後１１日目に回収される（ＯＫＴ３＋フィーダー添加後８日）。ＲＥＰ１産物は、細胞数、生存率、表現型（ＴＩＬ１、ＴＩＬ２及びＴＩＬ３（ＴＩＬの表面抗原染色のＴＩＬ２及びＴＩＬ３パネル）、ＴＩＬ３）及び機能（ＣＤ１０７ａ（ＣＤ１０７ａ動員によるＴＩＬ機能の評価））、ＩＦＮγ（ＷＲＫ　ＬＡＢ－０５９））について評価される。残りの細胞は、凍結され、液体窒素中に保存される。

【１５９１】

ＲＥＰ２の開始（例えば、第２の拡大培養）

[001675] ミニＲＥＰ２を開始するには、１×10^5細胞を４０ｍＬのＣＭ２培地及び３０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を含むG-Rex 10に入れる。抗ＣＤ３（クローン：ＯＫＴ３、３０ｎｇ／ｍＬ）及びフィーダー（比率１：１００、ＴＩＬ：フィーダー）を培養開始時に添加する。ＲＥＰ１中にＯＫＴ３＋フィーダーが追加されなかった場合でも、全て

のフラスコはＲＥＰ２のＯＫＴ３＋フィーダーで処理される。

【１５９２】

[001676] 培地交換は、ＲＥＰ２の５～７日目（プロセスの１６～１８日目）に実行される。G-Rex10フラスコ内の培地の容量を約１０ｍＬに減らし、ＣＭ２又はＡｉｍＶ＋３０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を４０ｍＬになるように補充する。

【１５９３】

[001677] ＲＥＰ２の１１日目に、上記のように容量を減らし、細胞を１５００　ｒｐｍ、ＲＴで５分間遠心分離する。

【１５９４】

[001678] 最終産物は、細胞数、生存率、表現型（ＴＩＬ１、ＴＩＬ２（ＴＩＬの表面抗原染色のＴＩＬ２パネル、ｖ１及びｖ２）、ＴＩＬ３及び機能（ＣＤ１０７ａ（ＣＤ１０７ａ動員によるＴＩＬ機能の評価、ＩＦＮγ）について評価される。追加の細胞（1×10^{6}～5×10^{6}）は、ペレット化され、ＲＮＡ配列決定及び分析のために凍結される。残りの細胞は、凍結され、液体窒素中に保存される。

【１５９５】

結果及び適合基準

[001679] ＯＫＴ３＋フィーダーで処理されたフラスコでは、ＲＥＰ１収量は、１１日までに50×10^{6}個以上になると予想される。ＲＥＰ２中の拡大倍数は、ＲＥＰ１中のＯＫＴ３とフィーダーの追加による影響を受けず、Ｇｅｎ２　ＲＥＰ拡大倍数数と一致すると予想される。腫瘍コア生検に由来し、ＯＫＴ３＋フィーダーに早期に曝露されたＴＩＬの表現型は、外科的切除（又は小生検）に由来するＴＩＬの表現型と類似であり、Ｇｅｎ２プロセスに従って拡大培養される。

【１５９６】

実施例１４：ＧＥＮ３の例示的なプロセス

[001680] この実施例では、Ｇｅｎ２とＧｅｎ３のプロセスの比較を取り扱う。この実施例は、確固としたＴＩＬ拡大培養のプラットフォームの開発を説明する。Ｇｅｎ２プロセスの改良により、作業者の介入回数を減らし、製造時間全体を短縮し、試薬の使用を最適化し、商業規模でのハイスループット製造に適した柔軟な半閉鎖型半自動細胞産生プロセスの受け入れ可能を促進することで、リスクを低減し、製造プロセスを合理化する。

【１５９７】

[001681] プロセスＧｅｎ２及びＧｅｎ３ＴＩＬは、腫瘍の外科的切除を通じて個々の患者から得られた自己ＴＩＬで構成され、エクスビボで拡大培養される。Ｇｅｎ３プロセスの第１の初回刺激拡大培養ステップは、インターロイキン２（ＩＬ－２）及び照射された末梢血単核球（ＰＢＭＣ）の足場上のＴ細胞共同受容体ＣＤ３を標的とするモノクローナル抗体ＯＫＴ３の存在下での細胞培養である。

【１５９８】

[001682] Ｇｅｎ２ＴＩＬ産物の産生は、２つのフェーズで構成されている。１）プレ急速拡大培養（Ｐｒｅ－ＲＥＰ）及び２）急速拡大培養プロトコル（ＲＥＰ）。プレＲＥＰ中に切除された腫瘍は、各寸法で２～３ｍｍの５０個以下の断片に切断され、血清含有培養培地（１０％ＨｕＳＡＢを含むRPMI 1640培地を補充）及び６，０００ＩＵ／ｍＬのインターロイキン－２（ＩＬ－２）で、１１日間培養された。１１日目にＴＩＬは回収され、大規模な第２のＲＥＰ拡大培養に導入された。ＲＥＰは、５日間、３０００ＩＵ／ｍＬのｒｈＩＬ－２を補充したＣＭ２の５Ｌ容量に１５０ｕｇのモノクローナル抗ＣＤ３抗体（ＯＫＴ３）で充填した5×10^{9}個の照射した同種異系ＰＢＭＣｓフィーダー細胞の共培養におけるプレＲＥＰからの200×10^{6}個以下の生細胞の活性化で構成されている。１６日目に、培養物の容量が９０％減少し、細胞画分が複数のG-REX-500フラスコに1×10^{9}個を超える生存リンパ球／フラスコで、ＣＭ４でＱＳに５Ｌに分割される。ＴＩＬは、６日間にわたって更にインキュベートする。ＲＥＰは２２日目に回収され、洗浄、製剤化され、凍結保存されてから、注入のために－１５０℃で臨床現場に輸送される。

【１５９９】

［001683］Ｇｅｎ３ＴＩＬ産物の産生は、３つのフェーズで構成される。１）第１の初回刺激拡大培養のプロトコル、２）急速第２の拡大培養プロトコル（急速拡大培養フェーズ又はＲＥＰとも称される）及び３）継代培養分割。第１の初回刺激拡大培養ＴＩＬ増殖を行うために、切除された腫瘍を各寸法で２～３ｍｍの１２０個以下の断片に切断された。第１の初回刺激拡大培養の０日目、ＯＫＴ－３で充填した約２．５×10^8個の照射した同種異系ＰＢＭＣフィーダー細胞のフィーダー層を、３つの１００ＭＣＳ容器のそれぞれに約１００ｃｍ^{2}の表面積に築いた。腫瘍の断片は、５００　ｍＬ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）並びに１５ｕｇ　ＯＫＴ－３をそれぞれ７日間、３つの１００ＭＣＳ容器に分配して培養した。７日目に、ＯＫＴ－３が充填された約５×10^8の同種異系照射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容器のそれぞれの腫瘍断片化培養フェーズに組み込み、５００ｍＬ　ＣＭ２培養培地及び６，０００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２並びに３０ｕｇ　ＯＫＴ－３で培養することにより、ＲＥＰを開始した。ＲＥＰの開始は、１００ＭＣＳ容器へのＯＫＴ３が充填されたフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器で第１の初回刺激拡大培養の培養物全体を活性化することにより強化された。Ｇｅｎ３の場合、ＴＩＬのスケールアップ又は分割には、細胞培養全体を、閉鎖系流体移送を介して、より大きい容器に拡大し、移送する（１００Ｍフラスコから５００Ｍフラスコに）プロセスステップを含み、追加で４ＬのＣＭ４培地を添加した。ＲＥＰ細胞は、１６日目に回収され、洗浄、製剤化され、凍結保存されてから、注入のために－１５０℃で臨床現場に輸送される。

【１６００】

［001684］全体的に、Ｇｅｎ３プロセスは、より短く、測定可能で、簡単に修正できる拡大培養プラットフォームであり、確固とした製造及びプロセスの互換性に適合するように対応する。

【１６０１】

【表２６】

表 36: 例示的 Gen2 及び例示的 Gen3 製造プロセスの比較。

ステップ	プロセス(Gen 2)	プロセス(Gen 3)
プレ REP- 0 日目	最大 50 断片/1-G-Rex 100MCS- 11 日間 1L の CM1 培地中 + IL-2 (6000 IU/mL)	最大 120 断片の腫瘍全体を最大 3 フラスコに 均等に分割 1 フラスコ:1~60 断片 2 フラスコ:61~89 断片 3 フラスコ 90~120 断片 500mL の CM1 培地中で 7 日間 + IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP へ-11 日目～ <200×10^6 TIL (1)5L の CM2 培地中、G-Rex 500MCS IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^9 フィーダー細胞 150ug OKT-3	REP へ-7 日目-全細胞 TIL-同一 G-Rex 100MCS 500 CM2 培地を添加 IL-2 (6000 IU/mL) 5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 30ug OKT-3/フラスコ
TIL 増殖 又は スケールアップ	体積減少及び細胞画分を最大 5 つの G-REX 500MCS へ分割 4.5L の CM4 培地 + IL-2 (3000 IU/mL) $\geq 1 \times 10^9$ TVC / フラスコ 分割 16 日目	各 G-REX 100MCS(1L)を 1 つの G-REX 500MCS へ移す 4L の CM4 培地 + IL-2 (3000 IU/mL)を 添加 9~11 日目にスケールアップ
回収	回収 22 日目 LOVO-自動細胞洗浄機	回収 16 日目 LOVO-自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存産物 LN_2 中、300IU/mL IL2- CS10, 複数アリコート	凍結保存産物 LN_2 中、300IU/mL IL-2-CS10 複数アリコート
プロセス時間	**22 日間**	**16 日間**

【１６０２】

［００１６８５］　０日目に両方のプロセスについて、腫瘍は３回洗浄され、断片は無作為化され、２つのプール；プロセスごとに１プールに分けた。Ｇｅｎ２プロセスでは、断片を６，０００ＩＵ／ｍＬ　ｒｈＩＬ－２を含む１ＬのＣＭ１培地を入れた１つのGREX 100MCSフラスコに移した。Ｇｅｎ３プロセスでは、断片を６，０００ＩＵ／ｍＬ　ｒｈＩＬ－２、１５μｇ　ＯＫＴ－３及び２．５×１０^{8}フィーダー細胞を含む５００ｍＬのＣＭ１を入れた１つのGRE×100MCSフラスコに移した。Ｒｅｐ開始日のＴＩＬの播種は、各プロセスに応じて、異なる日に行った。G-REX 100MCSフラスコの容量が９０％削減されたＧｅｎ２プロセスでは、収集された細胞懸濁液を新しいG-REX 500MCSに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）、更に５×１０^{9}フィーダー細胞及びＯＫＴ－３（３０ｎｇ／ｍＬ）を含むＣＭ２培地で１１日目にＲＥＰ開始を開始した。細胞を増殖し、１６日目に

、プロトコルごとにＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含むＣＭ４培地の入った複数のGREX 500 MCSフラスコに分割した。次に培養物を回収し、プロトコルごとに２２日目に凍結保存した。Ｇｅｎ３プロセスでは、ＲＥＰ開始は、７日目に行われ、ＲＥＰ開始のために同じG-REX 100MCSが使用された。簡潔には、ＩＬ－２（６０００ＩＵ／ｍＬ）を含む５００ｍＬのＣＭ２培地及び３０μｇのＯＫＴ－３を含む５×１０^{8}フィーダー細胞を各フラスコに添加した。９～１１日目に培養物をスケールアップした。Ｇ－Ｒｅ×１００Ｍ（１Ｌ）の全量をG-REX 500MCSに移し、ＩＬ－２（３０００ＩＵ／ｍＬ）を含む４ＬのＣＭ４を添加した。フラスコを５日間インキュベートした。１６日目に培養物を回収し、凍結保存した。

【１６０３】

［001686］３つの異なる腫瘍、２つの肺腫瘍（Ｌ４０５４及びＬ４０５５）及び１つの黒色腫腫瘍（Ｍ１０８５Ｔ）を比較対象とした。

【１６０４】

［001687］ＣＭ１（培養培地１）、ＣＭ２（培養培地２）及びＣＭ４（培養培地４）培地は、事前に調製し、Ｌ４０５４及びＬ４０５５は４℃で保持した。培地濾過の有無で細胞増殖を比較するために濾過なしでＣＭ１及びＣＭ２培地を調製した。

【１６０５】

［001688］ＲＥＰの開始及びスケールアップ時に、Ｌ４０５５腫瘍について、培地を事前に３７℃で最大２４時間温めた。

【１６０６】

結果要約

［001689］達成された生細胞の合計について、Ｇｅｎ３はＧｅｎ２の３０％以内に収まった。Ｇｅｎ３の最終産物は、再刺激後に高いＩＮＦ－γの産生を示した。Ｇｅｎ３の最終産物は、存在するユニークなＣＤＲ３配列の合計によって測定されるように、クローン多様性の増加を示した。Ｇｅｎ３最終産物は、より長い平均のテロメア長を示した。

【１６０７】

達成した結果

細胞数及び％生存率：

［001690］Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスでのプレＲＥＰ及びＲＥＰ拡大培養は、上記の詳細に従った。

【１６０８】

［001691］表３７．プレＲＥＰ細胞数。各腫瘍について、２つのプールには同数の断片が含まれていた。腫瘍のサイズが小さいため、１フラスコあたりの断片の最大数は達成されなかった。総プレＲＥＰ細胞（ＴＶＣ）を回収し、Ｇｅｎ２プロセスでは１１日目、Ｇｅｎ３プロセスでは７日目に計数した。２つのｐｒｅ－ＲＥＰアームを比較するために、細胞数を培養で提供された断片の数で割って、１断片あたりの生細胞の平均を計算した。下の表に示すように、Ｇｅｎ２プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスと比較して、１断片あたりの細胞が一貫してより増殖した。プレＲＥＰのＴＶＣを７で除算してから１１を掛けて計算される外挿計算で、ＴＶＣの数を１１日目のＧｅｎ３プロセスについて予想した。

【１６０９】

【表２７】

表 37: プレ REP 細胞数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
プレ REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
プレ REP での断片あたりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
プレ REP 11 日目の Gen 3 挿入値	該当なし	6.79E+07	該当なし	2.17E+07	該当なし	5.49E+06

*** L4055, 未濾過培地。**

【１６１０】

［００１６９２］表３８．ＴＩＬ最終産物の総生細胞数及び拡大倍数：Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの場合、ＴＶＣはプロセス条件ごとに計数され、プロセスの各日ごとに生細胞の割合が生成された。回収時に、２２日目（Ｇｅｎ２）及び１６日目（Ｇｅｎ３）の細胞を収集し、ＴＶＣ数を確立した。次に、ＴＶＣを０日目に提供された断片の数で割り、１断片あたりの生細胞の平均を計算した。拡大倍数は、回収されたＴＶＣをＲＥＰ開始ＴＶＣで割ることによって計算された。表に示されているように、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３を比較すると、Ｌ４０５４の拡大倍数は類似しており、Ｌ４０５５の場合、Ｇｅｎ２プロセスの方が、拡大倍数が高かった。具体的には、この場合、ＲＥＰ開始日より事前に２４時間、培地が加温された。Ｍ１０８５ＴのＧｅｎ３では、より高い拡大倍数も観察された。プレＲＥＰのＴＶＣを１６で除算してから２２を掛けて計算される外挿計算で、ＴＶＣの数を２２日目のＧｅｎ３プロセスについて予想した。

【１６１１】

【表２８】

表 38: TIL 最終産物の総生細胞数及び拡大倍数

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC /断片(回収時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
回収	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
拡大倍数回収/REP 開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
REP 回収 22 日目の Gen 3 挿入値	該当なし	2.53E+10	該当なし	1.20E+10	該当なし	1.06E+10

* L4055, 未濾過培地。

【１６１２】

［００１６９３］表３９：ＴＩＬ最終産物の％生存率：回収時に、最終ＴＩＬ　ＲＥＰ産物を生存率（％）について放出基準を比較した。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの全ての条件は、７０％の生存率基準を上回り、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

【１６１３】

【表２９】

表 39: REP の%生存率

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
回収	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【１６１４】

［００１６９４］表４０：Ｇｅｎ３プロセスの１つの追加フラスコあたりの細胞数の推定。１フラスコあたりの断片数が最大必要数を下回ったため、各腫瘍について、回収日の推定細胞数を計数した。推定は、臨床腫瘍が０日目に２つ又は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ていた。

【１６１５】

【表３０】

表 40: Gen 3 プロセスにおけるフルスケール 2 及び 3 フラスコへの外挿による細胞数計算の推定

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen 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
推定回収	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【１６１６】
免疫表現型検査：
ＴＩＬ最終産物の表現型マーカーの比較：
［001695］３つの腫瘍Ｌ４０５４、Ｌ４０５５及びＭ１０８５Ｔは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスの両方でＴＩＬ拡大培養を受けた。回収時、ＲＥＰ　ＴＩＬの最終産物をフローサイトメトリー分析に供し、純度、分化及びメモリーマーカーを試験した。全ての条件で、ＴＣＲ　ａ／ｂ＋細胞のパーセンテージは、９０％以上であった。
【１６１７】
［001696］Ｇｅｎ３プロセスから回収されたＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから回収されたＴＩＬと比較して、ＣＤ８及びＣＤ２８でより高い発現を示した。Ｇｅｎ２プロセスでは、ＣＤ４＋の高いパーセンテージを示した。図３（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。
【１６１８】
ＴＩＬ最終産物についてメモリーマーカーの比較：
［001697］Ｇｅｎ３プロセスから回収されたＴＩＬは、Ｇｅｎ２プロセスから回収されたＴＩＬと比較して、セントラルメモリーコンパートメントでより高い発現を示した。図４（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。
【１６１９】
ＴＩＬ最終産物について活性化及び疲弊マーカーの比較：
［001698］活性化及び疲弊マーカーを、腫瘍Ｌ４０５４及びＬ４０５５の２つからのＴＩＬで分析し、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３　ＴＩＬ拡大培養プロセスによる最終ＴＩＬ産物を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセス間で同等であった。図５（Ａ、Ｂ）；図６（Ａ、Ｂ）を参照されたい。
【１６２０】
再刺激によるインターフェロンガンマ分泌：
［001699］Ｇｅｎ２について２２日目、Ｇｅｎ３について１６日目の回収日、ＴＩＬは、Ｌ４０５４及びＬ４０５５のコーティングされた抗ＣＤ３プレートで一晩再刺激された。Ｍ１０８５Ｔの再刺激は、抗ＣＤ３、ＣＤ２８及びＣＤ１３７ビーズを使用して実行された。全ての条件で２４時間再刺激した後、上清を収集し、上清を凍結した。ＥＬＩＳＡによるＩＦＮγ分析は、同じＥＬＩＳＡプレートを使用して、同時に両方のプロセスからの上清で評価した。分析した３つの腫瘍では、Ｇｅｎ３プロセスからのより高いＩＦＮγの産生が観察された。図７（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。
【１６２１】
培養培地におけるＩＬ－２レベルの測定：
［001700］Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセス間でのＩＬ－２の消費を比較するために、腫瘍のＬ４０５４及びＬ４０５５のＲＥＰの開始、スケールアップ及び回収日に細胞上清を回収した。細胞培養上清中のＩＬ－２の量は、R&DのQuantitate ELISA Kitで測定した。一般的な傾向は、Ｇｅｎ２プロセスと比較した場合、ＩＬ－２濃度がＧｅｎ３プロセスで高いままであることを示している。これは、プロセス全体にわたる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の高い濃度（６０００ＩＵ／ｍＬ）のためと考えられる。図８（Ａ、Ｂ）を参照されたい。

【１６２２】
代謝基質及び代謝物分析
［００１７０１］　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は、全体的な培地消費の代理として測定された。乳酸及びアンモニアなどの相互代謝物を測定した。グルコースは、ミトコンドリアがＡＴＰの形でエネルギーを生成するために利用する培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が生成される（乳酸は乳酸のエステルである）。乳酸は細胞の指数増殖期に大きく生成される。高レベルの乳酸は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。図９（Ａ、Ｂ）を参照されたい。
【１６２３】
［００１７０２］　Ｌ４０５４及びＬ４０５５の使用済み培地は、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３の両方のプロセスでＲＥＰの開始、スケールアップ及び回収日に収集された。Ｇｅｎ２について１１日目、１６日目及び２２日目、Ｇｅｎ３について、７日目、１１日目及び１６日目に使用済み培地を収集した。上清は、CEDEXバイオアナライザーでグルコース、乳酸、グルタミン、GlutaMAX及びアンモニアの濃度を分析した。
【１６２４】
［００１７０３］　Ｌ－グルタミンは、細胞培養培地の製剤化に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンはアミンを含み、このアミド構造グループは、窒素を輸送して、細胞に送達することができる。Ｌ－グルタミンが酸化すると、この細胞によって有毒なアンモニア副産物が生成される。Ｌ－グルタミンの分解に対抗するために、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのための培地は、水溶液中でより安定で自然に分解しないGlutaMAXを補充された。２つの腫瘍系統では、Ｇｅｎ３アームは、プロセス中にＬ－グルタミン及びGlutaMAXが減少し、ＲＥＰ全体を通してアンモニアが増加したことを示した。Ｇｅｎ２アームでは、一定濃度のＬ－グルタミン及びGlutaMAX並びに微増のアンモニア産生が観察された。Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプロセスは、アンモニアの回収日に同等であり、Ｌ－グルタミン分解にわずかな相違を示した。図１０（Ａ、Ｂ、Ｃ）を参照されたい。
【１６２５】
フローフィッシュ（FLOW-FISH）によるテロメア測定：
［００１７０４］　フローフィッシュ（Flow-FISH）テクノロジーを使用して、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセス下でＬ４０５４及びＬ４０５５のテロメア反復の平均長を測定した。DAKOのフローサイトメトリー分析のためのテロメアＰＮＡキット／ＦＩＴＣを使用して、相対テロメア長（ＲＴＬ）の測定を計算した。Ｇｅｎ３はＧｅｎ２と同等のテロメア長を示した。
【１６２６】
ＣＤ３分析
［００１７０５］　各プロセスで生成された細胞産物のクローン多様性を決定するために、Ｌ４０５４及びＬ４０５５から回収されたＴＩＬ最終産物をサンプリングし、Ｔ細胞受容体のＣＤＲ３部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。
【１６２７】
［００１７０６］　表４１：Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のパーセンテージの比較は、ＴＩＬで回収した細胞産物のＬ４０５４のユニークＣＤＲ３配列を共有した。１９９配列はＧｅｎ３及びＧｅｎ２の最終産物間で共有され、Ｇｅｎ３の最終産物と共有されるＧｅｎ２からのユニークＣＤＲ３配列の上位８０％の９７．０７％に対応する。
【１６２８】

【表３１】

表 41: L4054 における Gen 2 と Gen 3 プロセス間で共有される uCDR3 配列の比較。

# uCDR3 (%オーバーラップ)	全ての uCDR3		uCDR3 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

【１６２９】
［001707］ 表４２：Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のパーセンテージの比較は、ＴＩＬ回収細胞産物においてＬ４０５５でユニークＣＤＲ３配列を共有した。１８３３配列は、Ｇｅｎ３及びＧｅｎ２の最終産物で共有され、Ｇｅｎ３最終産物と共有されるＧｅｎ２からのユニークＣＤＲ３配列の上位８０％の９９．４５％に対応する。
【１６３０】
【表３２】

表 42: L4055 における Gen 2 と Gen 3 プロセス間で共有される uCDR3 配列の比較。

# uCDR3 (%オーバーラップ)	全ての uCDR3		uCDR3 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

【１６３１】
［001708］ ＣＭ１及びＣＭ２培地は、事前に濾過なしで調製し、腫瘍Ｌ４０５５がＧｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスで使用されるまで、４℃で保持された。
【１６３２】
［001709］ Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスのＲＥＰ開始日の腫瘍Ｌ４０５５について、事前に培地を３７℃で２４時間加温した。
【１６３３】
［001710］ ＬＤＨは、プロセスで収集された上清では測定されなかった。
【１６３４】
［001711］ Ｍ１０８５Ｔ　ＴＩＬ細胞数は、Ｋ２セロメーターセルカウンター（K2 cellometer cell counter）で実行された。
【１６３５】
［001712］ 腫瘍Ｍ１０８５Ｔでは、代謝分析のための上清、活性化及び疲弊マーカー分析のためのＴＩＬ産物、テロメア長及びＣＤ３－ＴＣＲ　ｖｂ分析などのサンプルは入手できなかった。
【１６３６】
結論
［001713］ この実施例では、機能的品質の特質と、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセス間の拡張された表現型の特徴付け及び培地消費の観点から、３つの独立したドナー腫瘍組織を比較している。
【１６３７】
［001714］ Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプレREP及びREPの拡大培養比較を、生成された生

細胞の総数及び有核細胞集団全体の生存率の観点から評価した。回収日のＴＶＣ細胞の用量は、Ｇｅｎ２（２２日）及びＧｅｎ３（１６日）で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞の用量は、回収時に収集された全生細胞の約４０％で、Ｇｅｎ２より少なかった。

【１６３８】

[001715] プレＲＥＰの回収が７日目でなく１１日目に行われ、ＲＥＰの回収が１６日目ではなく２２日目に行われると仮定して、Ｇｅｎ３プロセスについて外挿した細胞数を計算した。いずれの場合にも、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、ＴＶＣの数値が近いことを示しており、早期の活性化は、ＴＩＬ増殖について全体的にパフォーマンスが向上する可能性があることを示唆している。表４及び５の下段。

【１６３９】

[001716] 処理された腫瘍のサイズが大きいと仮定して、Ｇｅｎ３プロセスの追加のフラスコ（２又は３）についての外挿値の場合、記載されたように、プロセスごとに必要な断片の最大数に到達する。２２日目のＧｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスについて１６日目の回収で類似の用量がＴＶＣで到達可能であることが観察された。この観察は重要であり、培養の早期の活性化により少ない処理時間でＴＩＬのパフォーマンスが向上する可能性を示唆している。

【１６４０】

[001717] Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３のプレREP及びREPの拡大培養比較を、生成された生細胞の総数及び有核細胞集団全体の生存率の観点から評価した。回収日のＴＶＣ細胞の用量は、Ｇｅｎ２（２２日）及びＧｅｎ３（１６日）で同等ではなかった。Ｇｅｎ３細胞の用量は、回収時に収集された全生細胞の約４０％で、Ｇｅｎ２より少なかった。

【１６４１】

[001718] 表現型の特徴付けに関して、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、Ｇｅｎ３プロセスでは３つの腫瘍でより高いＣＤ８＋及びＣＤ２８＋発現が観察された。このデータは、Ｇｅｎ３プロセスがＧｅｎ２と比較して最終ＴＩＬ産物の属性を改善したことを示している。

【１６４２】

[001719] Ｇｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、わずかに高いセントラルメモリーコンパートメントを示した。

【１６４３】

[001720] Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３プロセスは、Ｇｅｎ３プロセスの期間が短いにも関わらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。

【１６４４】

[001721] 分析した３つの腫瘍では、Ｇｅｎ２と比較して、Ｇｅｎ３最終産物でのＩＦＮガンマ（ＩＦＮγ）産生が３倍高かった。このデータは、おそらくＧｅｎ３において、ＣＤ８及びＣＤ２８発現の発現が高いために、Ｇｅｎ２と比較して、Ｇｅｎ３プロセスが非常に機能的でより強力なＴＩＬ産物を生成したことを示す。表現型の特徴付けは、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、３つの腫瘍でＣＤ８＋、ＣＤ２８＋発現に対するＧｅｎ３のポジティブな傾向を示唆した。

【１６４５】

[001722] Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３間のＴＩＬ最終産物のテロメア長は同等であった。

【１６４６】

[001723] グルコース及び乳酸レベルは、Ｇｅｎ２及びＧｅｎ３の最終産物間で同等であり、これは、Ｇｅｎ３プロセスの培地上の栄養素レベルが、毎日のプロセスで減量除去が実施されず、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、プロセス全体で培地の用量が少なかったために、影響を受けなかったことを示唆している。

【１６４７】

[001724] Ｇｅｎ３プロセス全体は、Ｇｅｎ２プロセスと比較して、処理時間のほぼ２分の１の削減を示した。これにより、Ｇｅｎ３プロセスによる拡大培養されたＴＩＬ産物の商品原価（ＣＯＧ）の大幅な削減をもたらすであろう。

【１６４８】
［001725］ ＩＬ－２消費量は、Ｇｅｎ２プロセスでのＩＬ－２消費量の一般的な傾向を示唆しており、Ｇｅｎ３プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、ＩＬ－２が高かった。
【１６４９】
［001726］ Ｇｅｎ３プロセスは、ＣＤＲ３　ＴＣＲａｂ配列分析により測定された高いクローン多様性を示した。
【１６５０】
［001727］ プレＲＥＰの０日目にフィーダー及びＯＫＴ－３の添加は、ＴＩＬが早期に活性化され、Ｇｅｎ３プロセスを使用したＴＩＬのパフォーマンスが全体的に向上した。
【１６５１】
［001728］ 図４３は、現在のＧｅｎ２プロセスと比較したＧｅｎ３プロセスのさまざまな実施形態及び結果を示す。
【１６５２】

【表３３】

表 43: 例示的な Gen 3 プロセス。

ステップ	プロセス Gen 2	プロセス Gen 3
プレ REP-0 日目	≤50 断片 1X G-Rex 100MCS 1L 培地 IL-2 (6000IU/mL) 11 日間	≤240 断片 ≤60 断片/フラスコ ≤4 フラスコ ≤2L 培地(500mL/フラスコ) IL-2 (6000IU/mL) 2.5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 15μg OKT3/フラスコ
REP 開始	新鮮 TIL を REP へ 11 日目 $\leq 200 \times 10^6$ 生細胞 5×10^9 フィーダー細胞 G-Rex 500MCS 5L の CM2 培地 ＋IL-2 (3000 IU/mL) 150μg OKT3	新鮮 TIL を REP へ 7 日目 培養物全体を活性化 5×10^8 フィーダー細胞 30 μg OKT3/フラスコ G-Rex 100MCS 500mL 培地+ IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養又はスケールアップ	≤5 G-REX 500MCS $\leq 1 \times 10$ 生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	≤4 G-REX 500MCS 培養物全体をスケールアップ 4L/フラスコ 10~11 日目
回収	回収 22 日目 LOVO-自動細胞洗浄機 2 洗浄サイクル	回収 16 日目 LOVO-自動細胞洗浄機 5 洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存産物 LN_2 中、300IU/mL IL2- CS10 複数アリコート	凍結保存産物 LN_2 中、300IU/mL IL-2-CS10 複数アリコート
プロセス時間	**22 日間**	**16 日間**

【１６５３】

［００１７２９］上述の実施例は、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態を作製及び使用する方法の全面開示及び説明を当業者に与えるために提供され、発明者が、彼らの発明とみなす範囲を限定することを意図するものではない。当業者に明らかである本発明を実施するための上述の態様の修正は、以下の特許請求の範囲内であることが意図される。本明細書で言及される全ての特許及び刊行物は、本発明に属する当業者の技能のレベルを示す。この開示で引用された全ての参考文献は、あたかも各参考文献が、その全体が個々に参照により組み込まれたかのように、同じ程度に参照により組み込まれる。ＴＩＬは、膵臓腫瘍から単離されたコア生検から正常に拡大培養された。ＴＩＬは、特定の腫瘍タイプのＦＮＡからも拡大培養された。この研究では、卵巣腫瘍（ｎ＝３）及び結腸直腸腫瘍（ｎ＝１）からのＴＩＬ増殖は観察されなかった。ＴＩＬ増殖は、肺腫瘍、黒色腫及び子宮頸腫瘍から得られたＦＮＡから観察された。第１の拡大培養及び第２の拡大培養からのＴＩＬ集団の表現型解析及び機能アッセイは、現在のところ進行中である。研究のデータ

は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の有意な集団がプレＲＥＰの吸引液に存在することを示している。

【１６５４】

［００１７３０］ 全ての見出し及びセクションの指定は、明確化と参照の目的でのみ使用されており、決して限定と見なされるものではない。例えば、当業者は、本明細書に記載される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の様々な態様を適切に組み合わせることが有用であることを理解するであろう。

【１６５５】

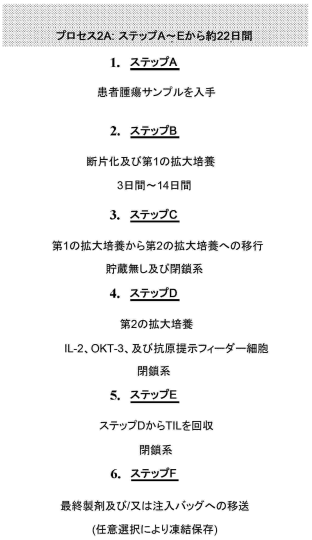
［００１７３１］ 本明細書に引用されている全ての参考文献は、個々の出版物若しくは特許又は特許出願が全ての目的についてその全体が参照により組み込まれることが具体的且つ個別に示されている場合と同程度に、その全体があらゆる目的について参照により本明細書に組み込まれる。

【１６５６】

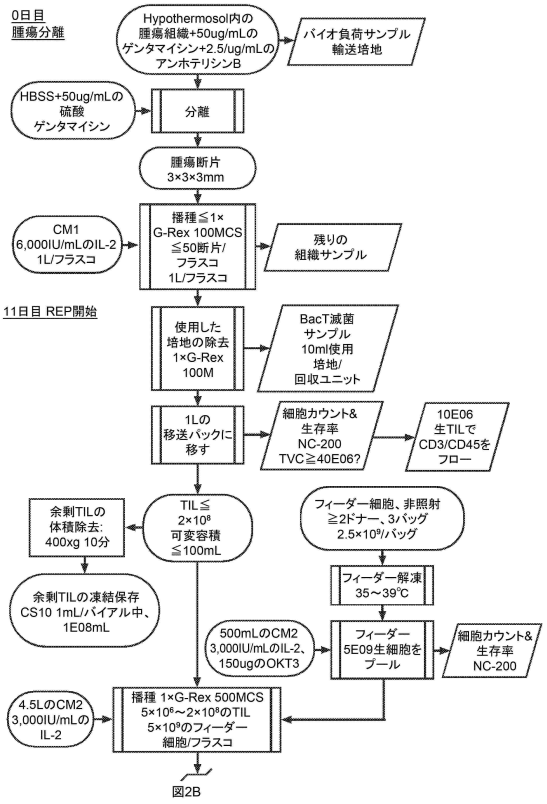
［００１７３２］ 当業者に明らかであるように、本出願の多くの修正形態及び変形形態は、その趣旨及び範囲から逸脱することなくなされ得る。本明細書に記載される特定の実施形態及び実施例は、ごく一実施例としてのみ提供され、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる均等物の全範囲と共に添付の特許請求の範囲の条項よってのみ限定されるべきである。

【図面】

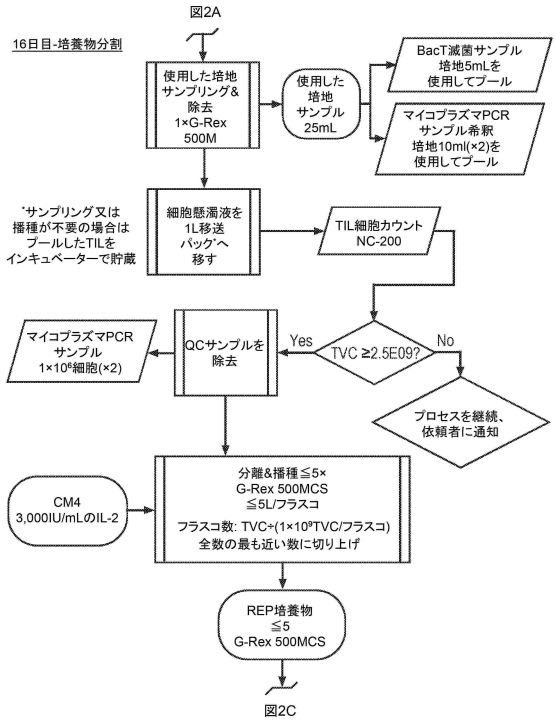
【図１】



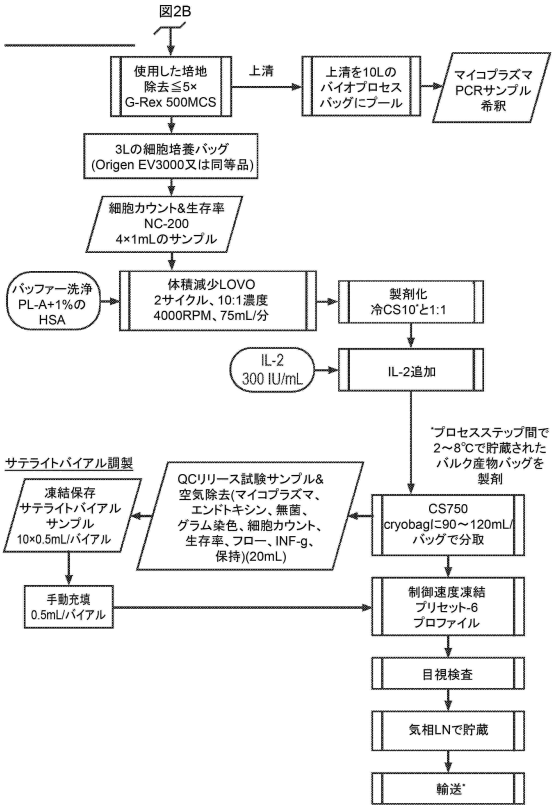
【図２Ａ】



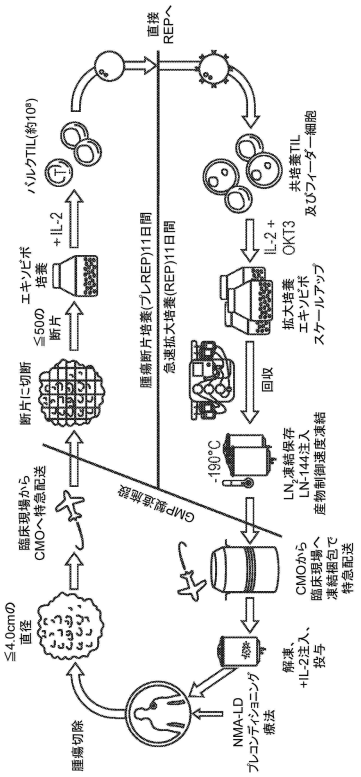
【図２Ｂ】



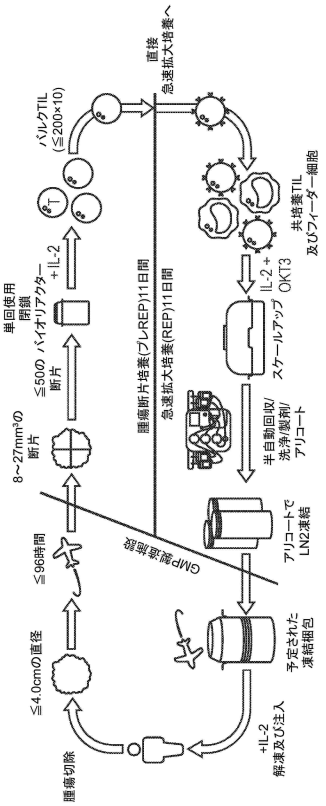
【図２Ｃ】



【図３】



【図４】



【図５】

プロセス1C: ステップA～Eの約44～55日間	プロセス2A: ステップA～Eの約22日間
1. ステップA 患者腫瘍サンプルを入手	**1. ステップA** 患者腫瘍サンプルを入手
2. ステップB 断片化及び第1の拡大培養 11日間～21日間	**2. ステップB** 断片化及び第1の拡大培養 3日間～14日間
3. ステップC 第1の拡大培養から第2の拡大培養への移行 選択まで任意選択で貯蔵	**3. ステップC** 第1の拡大培養から第2の拡大培養への移行 貯蔵なし及び閉鎖系
4. ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、抗原提示フィーダー細胞 任意選択で1回以上反復	**4. ステップD** 第2の拡大培養 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TILを回収	**5. ステップE** ステップDからTILを回収 閉鎖系
6. ステップF 最終製剤及び/又は注入バッグへの移送	**6. ステップF** 最終製剤及び/又は注入バッグへの移送 (任意選択で凍結保存)

【図６】

プロセスステップ	プロセス1C実施形態	プロセス2A実施形態	利点
プレREP	• GREX-10フラスコ10個につき4断片 • 11～21日間	• GREX-100Mフラスコ1つにつき40断片 • 11日間	• フラスコあたりの腫瘍断片の増加 • 培養時間の短縮 • ステップ数の削減 • 閉鎖系に適する
プレREPからREPへの移行	• プレREP TILは選択のためフェノタイピングまで凍結し、次いでREPへ進むため解凍される(約30日目) • REPは>40×10⁶個のTILを要する	• プレREP TILは直接REPへ11日目に移行 • REPは25～200×10⁶個のTILを要する	• プレREP～REPプロセスの短縮 • ステップ数の削減 • フェノタイピング選択の省略 • 閉鎖系に適する
REP	• REP0日目にGREX-100Mフラスコ6つ • REP0日目にフラスコ1つにつき5×10⁶個のTIL及び5×10⁶個のPBMCフィーダー • REP7日目に18～36個のフラスコに分割 • 14日間	• 11日目にGREX-500Mフラスコ1つ • 11日目に25～200×10⁶個のTIL及び5×10⁶個のPBMCフィーダー • 16日目に≦6のGREX-500Mフラスコに分割 • 11日間	• ステップ数の削減 • REP期間の短縮 • 閉鎖系でフラスコ間のTILの移動 • 閉鎖系で培地交換
回収	• TILを遠心分離により回収	• LOVO自動細胞洗浄システムによりTILを回収	• ステップ数の削減 • 自動細胞洗浄 • 閉鎖系 • 洗浄中の産物の損失の削減
最終製剤	• Hypothermosol中の新鮮産物 • 単回注入バッグ • 制限された輸送安定性	• PlasmaLyte-A+1%のHSA及びLN_2中に貯蔵したCS10中で産物を凍結保存 • 複数のアリコート • より長い輸送安定性	• 配送の柔軟性 • 患者のスケジューリングの柔軟性 • より適時的なリリース試験
全体の推定プロセス時間	• 43～55日間	• 22日間	• 患者に対するより迅速なターンアラウンド

【図７Ａ】

小生検プロセス：バージョン1 ステップA～Eから約21～33日間
1. ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手
2. ステップB 第1の拡大培養 1日間～19日間(3日目にOKT-3及び 抗原提示フィーダー細胞を使用)
3. ステップC 第1の拡大培養から第2の拡大培養への移行 貯蔵無し及び閉鎖系
4. ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞 11～14日間 閉鎖系
5. ステップE ステップDからTILを回収する 閉鎖系
6. ステップF 最終製剤及び/又は輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)

【図７Ｂ】

小生検プロセス：バージョン2 ステップA～Eから約17～24日間
1. ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手
2. ステップB 第1の拡大培養 3日間～12日間(1～3日目のいずれかにOKT-3及び 抗原提示フィーダー細胞を使用)
3. ステップC 第1の拡大培養から第2の拡大培養への移行 貯蔵無し及び閉鎖系
4. ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞 3～12日間 閉鎖系
5. ステップE ステップDからTILを回収する 閉鎖系
6. ステップF 最終製剤及び/又は輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)

【図７Ｃ】

小生検プロセス：バージョン1 ステップA～Eから約21～33日間	小生検プロセス：バージョン2 (GEN3ベースのプロセス) ステップA～Eから約17～24日間	プロセス2A: ステップA～Eから約22日間
1. ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手	1. ステップA 1. 患者の腫瘍サンプルを入手	1. ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手
2. ステップB 第1の拡大培養 1日間～19日間(3日目にOKT-3及び 抗原提示フィーダー細胞を使用)	2. ステップB 第1の拡大培養 3日間～12日間 (1～3日目のいずれかに OKT-3及び 抗原提示フィーダー細胞を使用)	2. ステップB 断片化及び第1の拡大培養 3日間～14日間
3. ステップC 第1の拡大培養から 第2の拡大培養への移行 貯蔵無し、任意選択により 閉鎖系	3. ステップC 第1の拡大培養から 第2の拡大培養への移行 貯蔵無し、任意選択により 閉鎖系	3. ステップC 第1の拡大培養から 第2の拡大培養への移行 貯蔵無し及び閉鎖系
4. ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、及び 抗原提示フィーダー細胞 11～14日間 任意選択により閉鎖系	4. ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、及び 抗原提示フィーダー細胞 3～12日間 任意選択により閉鎖系	4. ステップD 第2の拡大培養 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TILを回収する 任意選択により閉鎖系	5. ステップE ステップDからTILを回収する 閉鎖系	5. ステップE ステップDからTILを回収する 閉鎖系
6. ステップF 最終製剤及び/又は 輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)	6. ステップF 最終製剤及び/又は 輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)	6. ステップF 最終製剤及び/又は 輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)

【図８Ａａｎｄ８Ｂ】

Figures 8A and 8B

Figure 8A

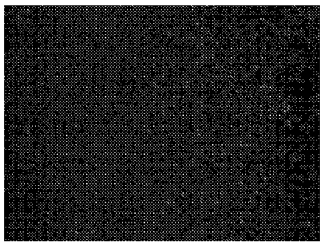
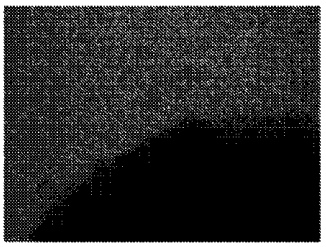


Figure 8B



【図９Ａａｎｄ９Ｂ】

Figures 9A and 9B

Figure 9A

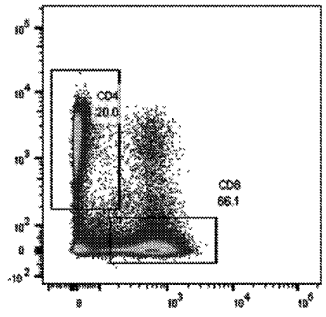
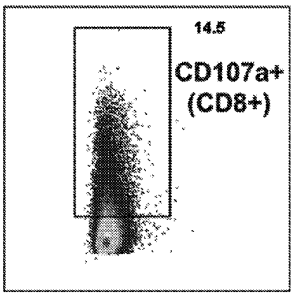


Figure 9B



【図９Ｃａｎｄ９Ｄ】

Figures 9C and 9D

Figure 9C

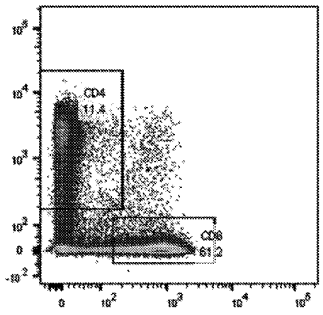
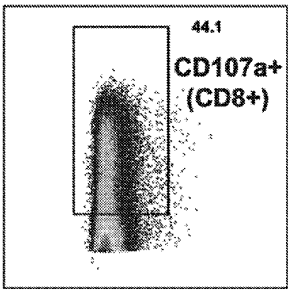


Figure 9D



【図１０Ａａｎｄ１０Ｂ】

Figures 10A and 10B

Figure 10A

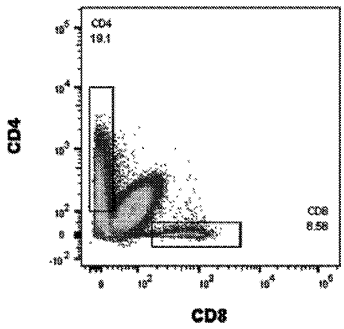
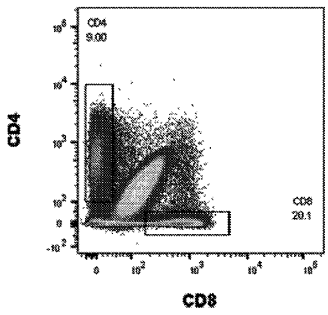


Figure 10B



【図１１Ａａｎｄ１１Ｂ】

Figures 11A and 11B

Figure 11A

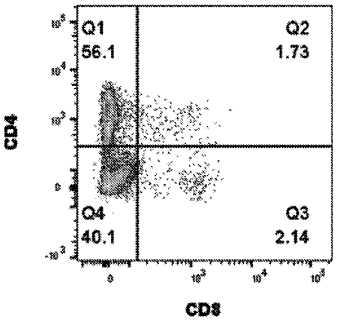
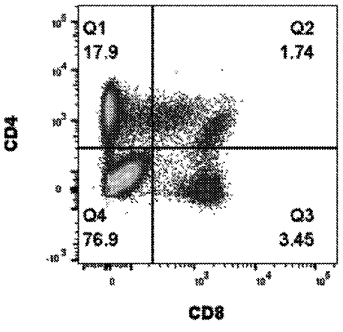


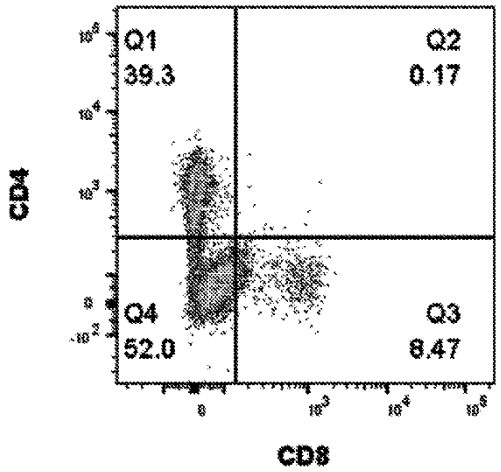
Figure 11B



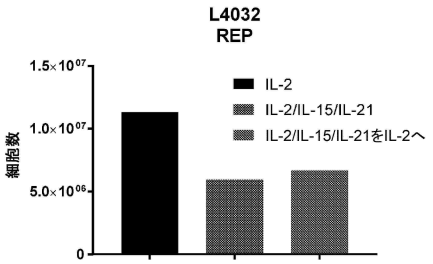
【図１１Ｃ】

Figure 11C

Figure 11C

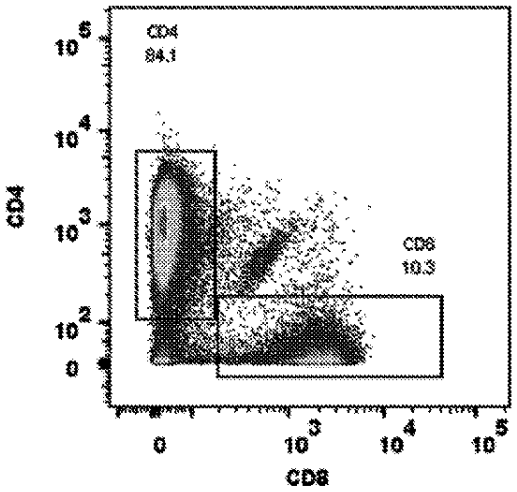


【図１２Ａ】



【図１２Ｂ】

Figure 12B



【図１３Ａａｎｄ１３Ｂ】

Figures 13A and 13B

Figure 13A

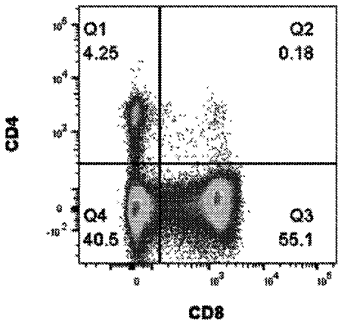
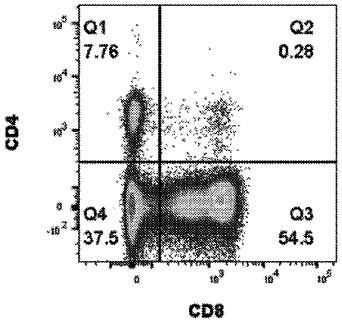
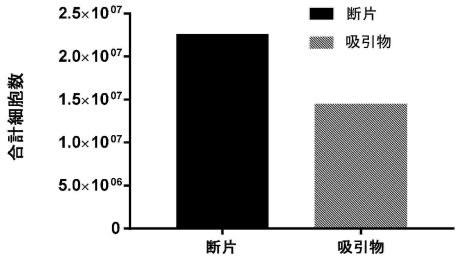


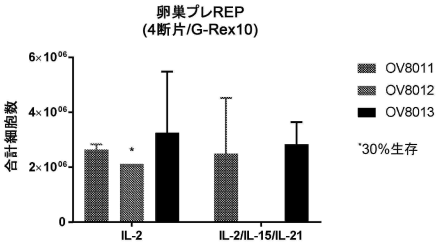
Figure 13B



【図１４】



【図１５】



【図１６Ａａｎｄ１６Ｂ】

Figures 16A and 16B

Figure 16A

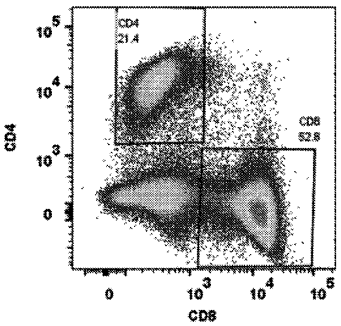
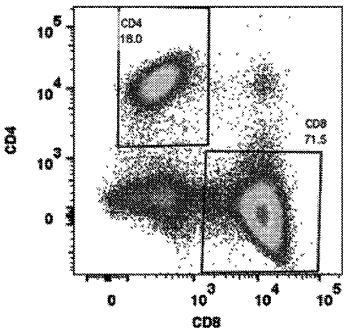
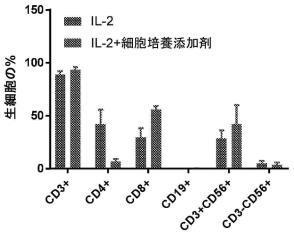


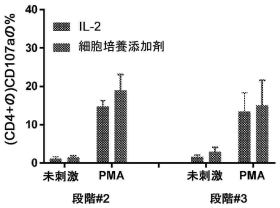
Figure 16B



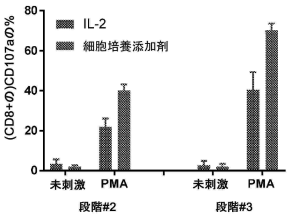
【図１７Ａ】



【図１７Ｂ】



【図１７Ｃ】



【図１７Ｄ】

腫瘍ID	サイトカイン	段階#1に達するまでの日数	段階#2の適合基準	段階#2でアッセイされた細胞	段階#3の適合基準	段階#3でアッセイされた細胞
Pan-17-004	IL-2 #1	27		116x10⁶		不完全培地
	IL-2 #2	27		130x10⁶		不完全培地
	細胞培養添加剤#1	14		不完全培地		N/A
	細胞培養添加剤#2	12	20x10⁶	102x10⁶	100x10⁶	48x10⁶
Pan-17-007	IL-2	18		REPに進行する基準を満たさなかった		N/A
	細胞培養添加剤	25		116x10⁶		244x10⁶
Pan-17-009	IL-2	G-Rex10の基準を満たさなかった		N/A		N/A
	細胞培養添加剤	21		106x10⁶		144x10⁶

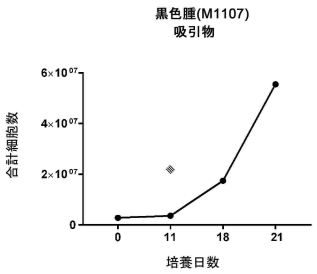
【図１８Ａ】

組織学	FNA/生検	初期細胞数(FNA)	条件	培養日数	最終細胞数	アッセイ
膵臓(P7015)	コア 24ウェルプレート	N/A	**1コア** 1) IL-2(3ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(2ウェル) **2コア** 1) IL-2(1ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(1ウェル)	28日間	**1コア** IL-2 1.2e6 生細胞/ウェル平均 IL-2/IL-15/IL-21 2e6 生細胞/ウェル平均 **2コア** 増殖なし	**表現型** FACS **機能的** CD107a
膵臓(P7017)	コア 24ウェルプレート	N/A	**1コア**	N/A	TIL増殖なし	
膵臓(P7019)	コア G-Rex 10	N/A	**6コア**	進行中		
肺(L4032)	FNA 24ウェルプレート	1.6e6 細胞(28%生存)	1) IL-2(2ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(2ウェル) +断片	13日間	IL-2 4.64e5細胞/ウェル平均、76%生存 IL-2/IL-15/IL-21 7.75e5細胞/ウェル平均、94%生存	**表現型** FACS **機能的** CD107a (N/A) **REP** (最近回収された)
肺(L4033)	**FNA G-Rex 10**	5.5e6 細胞(76%生存)	1) IL-2 2) IL-2/IL-15/IL-21 +断片	12日間	IL-2 6.e6、73%生存 IL-2/IL-15/IL-21 検出可能な細胞なし(このサンプルでアッセイは実行されなかった)	**表現型** FACS **機能的** CD107a **REP** (最近回収された)
肺(L4034)	FNA G-Rex 10	N/A			TIL増殖なし	アッセイなし

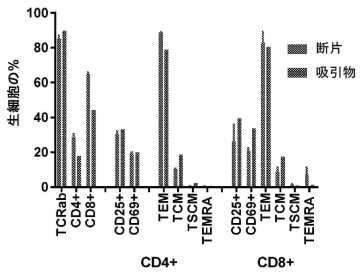
【図１８Ｂ】

組織学	FNA/生検	初期細胞数(FNA)	条件	培養日数	最終細胞数	アッセイ
結腸直腸(CC10024)	FNA 24ウェルプレート	8.0e5 生細胞、42% 生存	1) IL-2(2ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(2ウェル) 対照としての断片	27日間	TIL増殖なし	アッセイなし
卵巣(OV8012)	FNA 24ウェルプレート	3.19e5 生細胞、28% 生存	1) IL-2(2ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(2ウェル)		TIL増殖なし	アッセイなし
卵巣(OV8013)	FNA 24ウェルプレート	8.3e5 生細胞、11% 生存	1) IL-2(2ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(2ウェル)		TIL増殖なし	アッセイなし
卵巣(OV8014)	FNA 24ウェルプレート	1.0e5 生細胞、7% 生存	1) IL-2(1ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(1ウェル)		TIL増殖なし	アッセイなし
子宮頸部(C2005)	FNA 24ウェルプレート	6.84e5 (13% 生存)	1) IL-2(2ウェル) 2) IL-2/IL-15/IL-21(2ウェル) +断片	21日間	IL-2 3.45e5 生細胞/ウェル平均、39%生存 IL-2/IL-15/IL-21 8.69e5 生細胞/ウェル平均、40%生存	表現型 FACS 機能的 CD107a
黒色腫(M1101)	FNA G-Rex 10	1.96e6 (65% 生存)	IL-2 (1 G-Rex 10) +断片	12日間	IL-2 3.0e6、78% 生存	表現型 FACS 機能的 CD107a REP (最近回収された)
黒色腫(M1107)	FNA G-Rex 10	2.25e6 (69% 生存)	IL-2 (2 G-Rex 10) IL-2/IL-15/IL-21 (2 G-Rex) +断片			プレREP 進行中

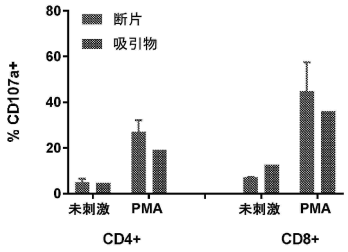
【図１９Ａ】



【図１９Ｂ】



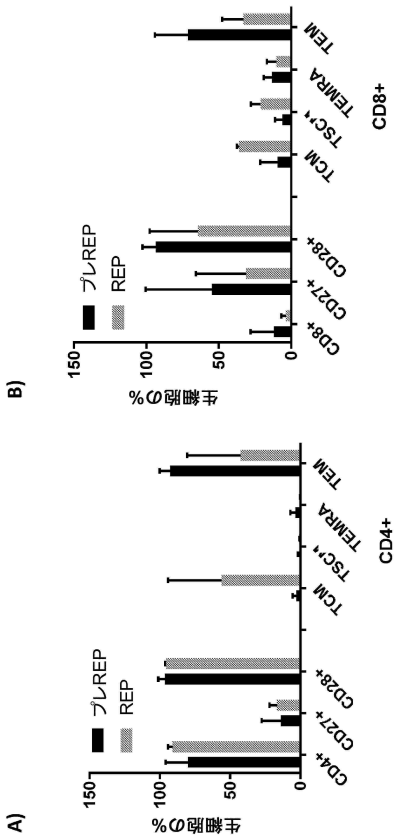
【図１９Ｃ】



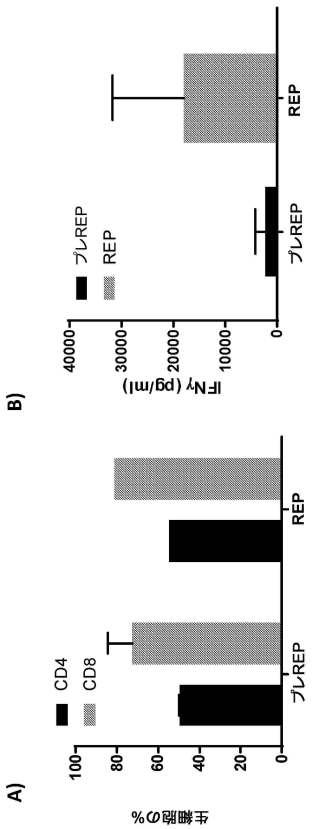
【図２０】

腫瘍名	細胞増殖	分析
UPMC-3 既報告	24ウェルプレート: 1) IL-2対2) サイトカイン添加剤	細胞増殖、生存率、表現型、 CD107a
UPMC-9 既報告	不十分な拡大培養	N/A
UPMC-17 既報告	培養物の汚染	N/A
UPMC-26	不十分な拡大培養	N/A
UPMC-30	プレREP11日目: 1.6e6、40%生存 プレREP18日目: 3.49e7、89%生存	細胞増殖、生存率、表現型、 CD107a、IFNγ、REP開始及び分析
UPMC-61	プレREP11日目: 1.52e5、66%生存 プレREP18日目: 1.14e7、1.14e7、40%生存	細胞増殖、生存率、表現型、 CD107a、IFNγ、REP開始及び分析
UPMC-59	不十分な拡大培養:	N/A
UPMC-61	プレREP: 進行中	

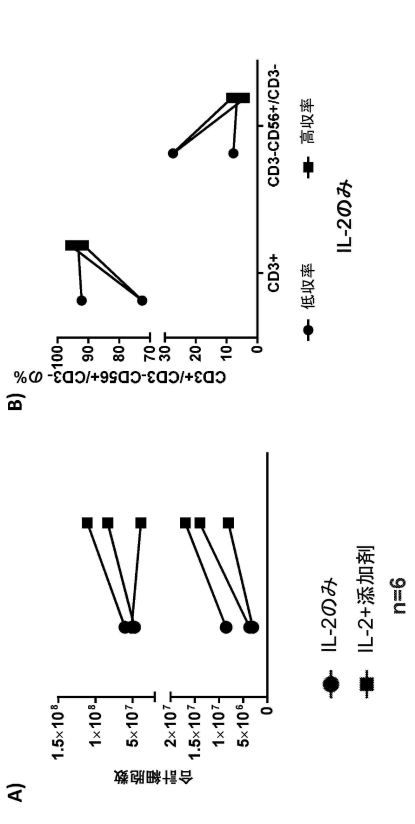
【図２１】



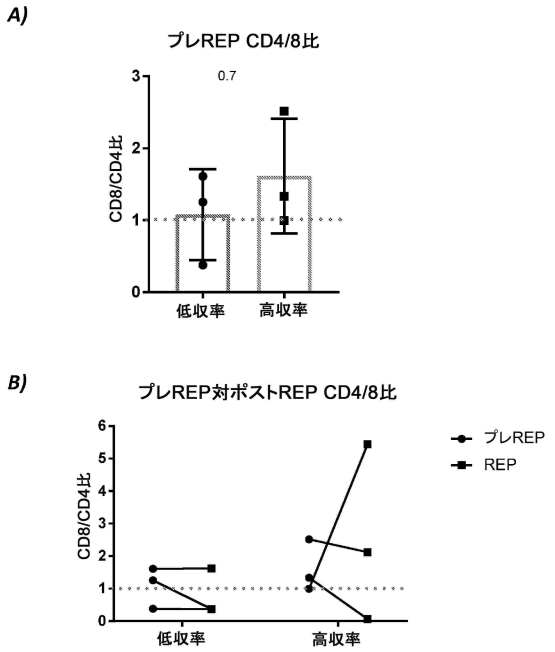
【図２２】



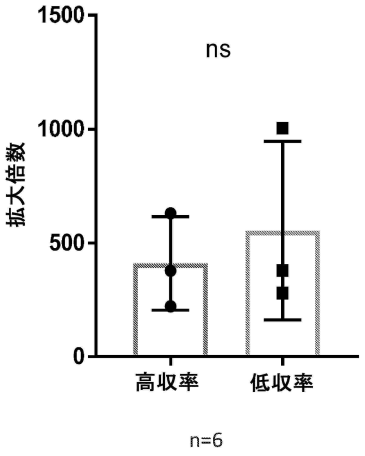
【図２３】



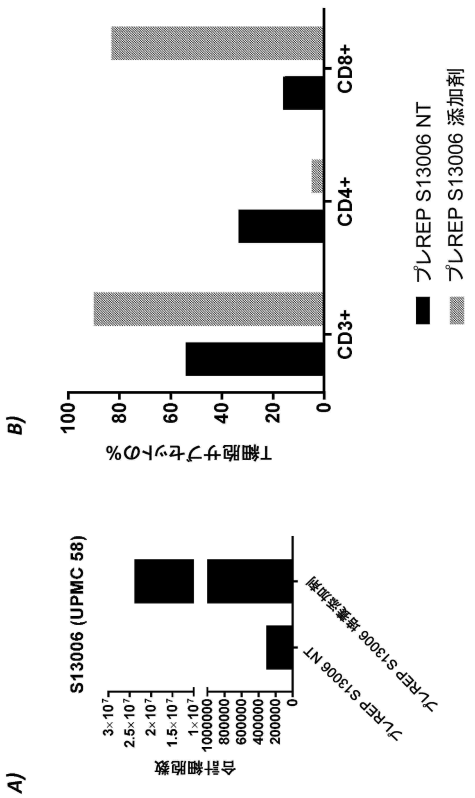
【図２４】



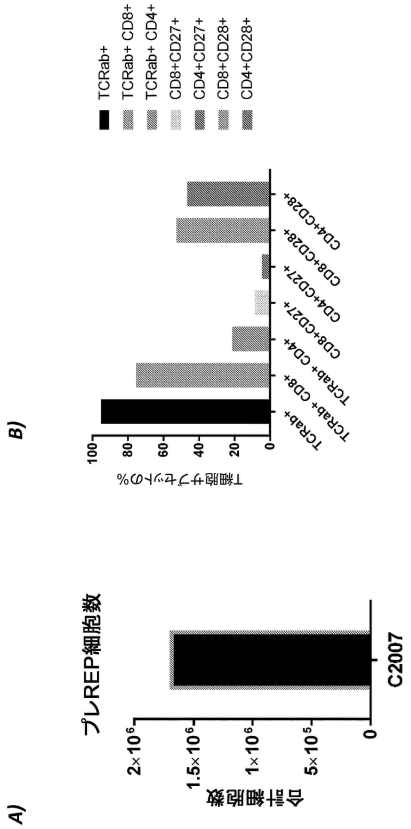
【図２５】



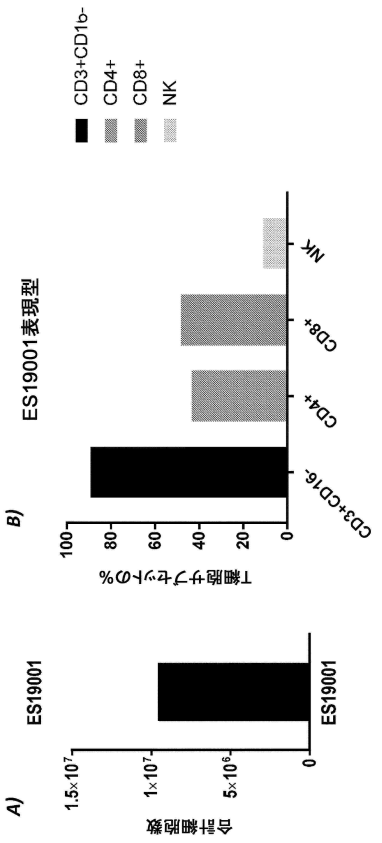
【図２６】



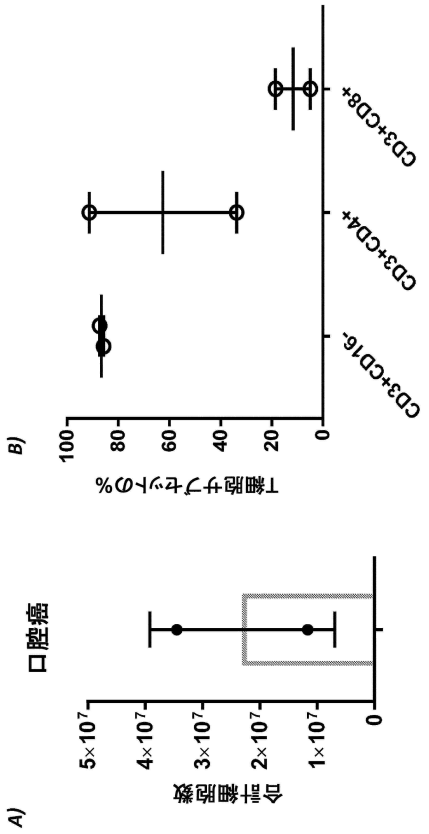
【図２７】



【図２８】



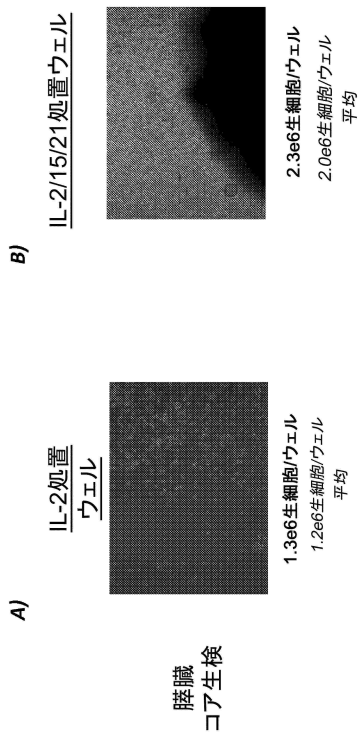
【図２９】



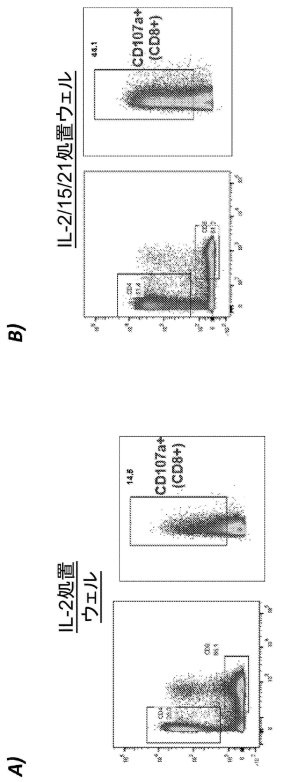
【図３０】

種類名	細胞増殖	分析
UPMC-3 (P7011) 既報告	24ウェルプレート: 1) IL-2対2) サイトカイン添加剤	細胞増殖、生存率、 表現型、CD107a
UPMC-9 (P7017) 既報告	不十分な拡大培養	N/A
UPMC-17 (P7019) 既報告	培養物の汚染。廃棄。	N/A
UPMC-26 (P7022)	不十分な拡大培養	N/A
UPMC-30 (P7028)	プレREP12日目: 1.6e6、40%生存 プレREP21日目: 3.49e7、89%生存	細胞増殖、生存率、 表現型、CD107a、IFNγ、 REP開始及び分析
UPMC-61 (P7031)	プレREP12日目: 1.52e5、66%生存 プレREP28日目: 1.14e7、1.14e7、40%生存	細胞増殖、生存率、表現型、 CD107a、IFNγ、 REP開始及び分析
UPMC-59 (P7033)	不十分な拡大培養	N/A
UPMC-61 (P7034)	プレREP: 進行中	

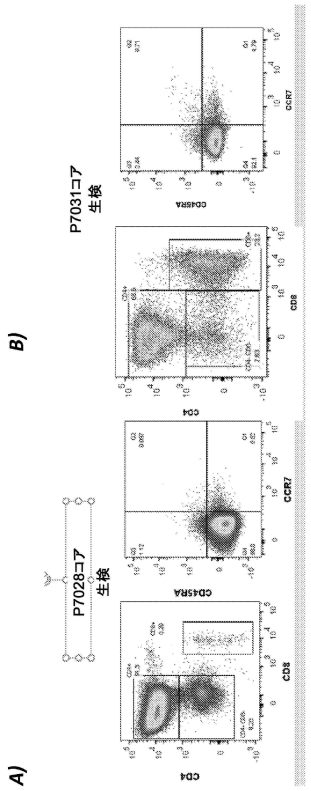
【図３１】



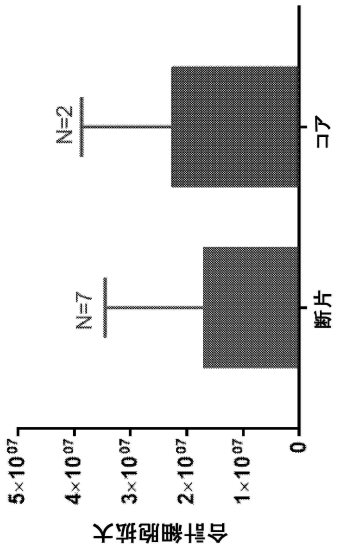
【図３２】



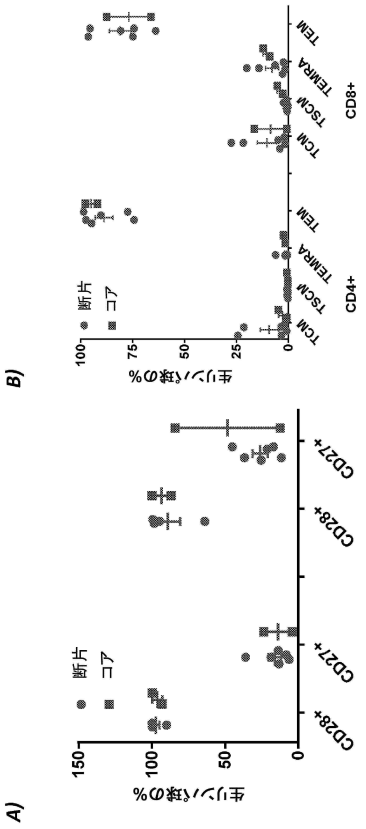
【図３３】



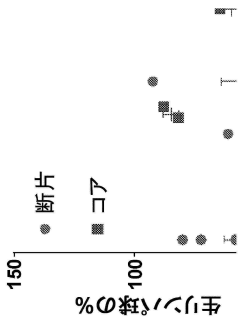
【図３４】



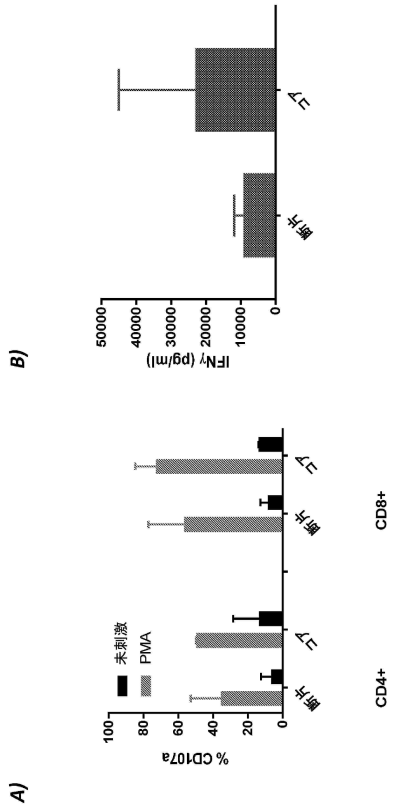
【図３５】



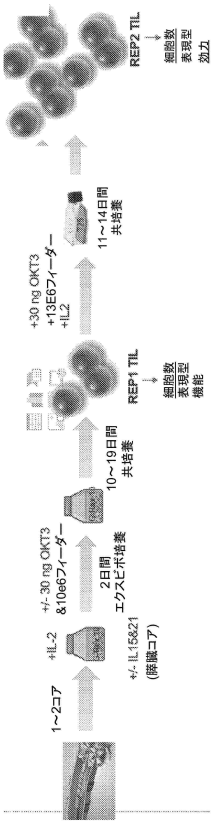
【図３６】



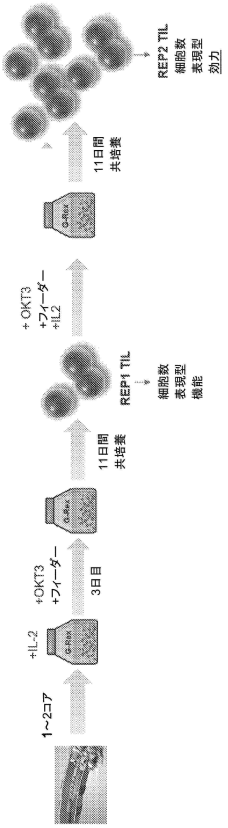
【図３７】



【図３８Ａ】



【図３８Ｂ】



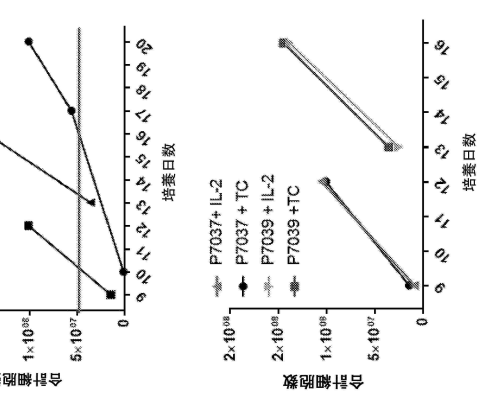
【図３９】

	培養条件	コア/条件(#)	REP1	REP2
黒色腫 (M1114)	REP1: IL2 REP2: IL-2	2	11日目に>50E6細胞	215倍 拡大 約1000pg/ml IFNγ
黒色腫 (M1115)	REP1: IL2 REP2: IL-2	2	12日目に>50E6細胞	662倍 拡大 約3000pg/ml IFNγ
黒色腫 (M1118)	REP1: IL-2 REP2: IL-2	1	11日目に>50E6細胞	215倍 拡大 約10,000pg/ml IFNγ
** 黒色腫 (M1121)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1	9日目に50E6細胞	155倍 拡大 約2000pg/ml IFNγ

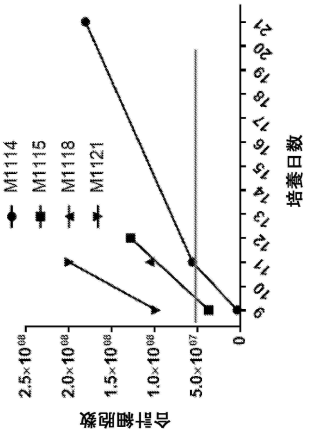
【図４０】

	培養条件	コア/条件(#)	REP1	REP2
膵臓 (P7034)	REP1: + TC +OKT3&フィーダーVS OKT3&フィーダーなし REP2: +/-トリプル カクテル	2(2条件)	OKT3& フィーダーの 存在下のみで、 17日目に >50E6細胞	207&162倍 拡大+/- トリプルカクテル 約3000pg/ml IFNγ+/-トリプル カクテル
膵臓 (P7037)	REP1: IL2対TC REP2: +/-トリプル カクテル	4(2条件)	OKT3& フィーダー +/-TCの存在下 のみで、 11日目に >50E6細胞	207&231倍 拡大+/- トリプルカクテル 約1000pg/ml IFNγ+/-トリプル カクテル
膵臓 (P7039)	REP1: TC+OKT3&フィーダー、TC OKT3&フィーダーなし IL-2+OKT3&フィーダー、IL- 2 OKT3&フィーダーなし REP2: +/- TC	2(4条件)	OKT3& フィーダーの 存在下のみで、 12日目 (+/-TC)に >50E6細胞	662&582倍 拡大+/- トリプルカクテル 約10K&3K pg/ml IFNγ+/- トリプルカクテル

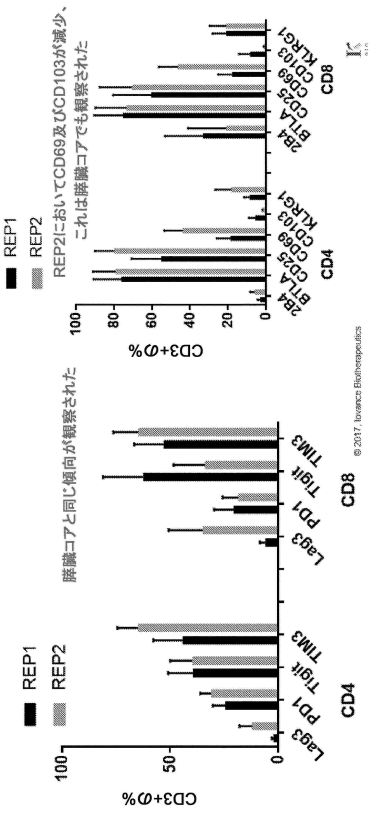
【図４１】



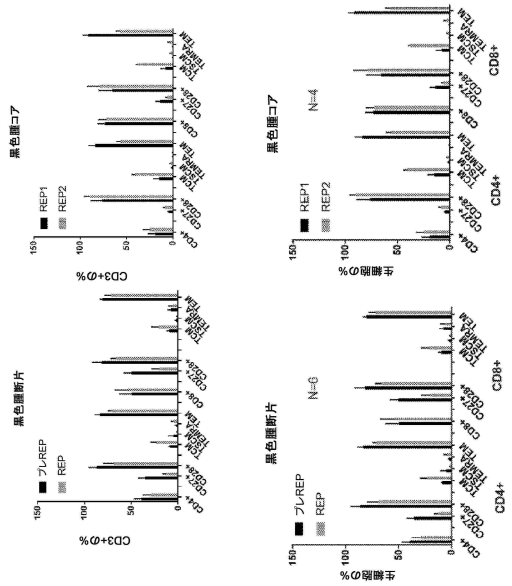
【図４２】



【図４３】



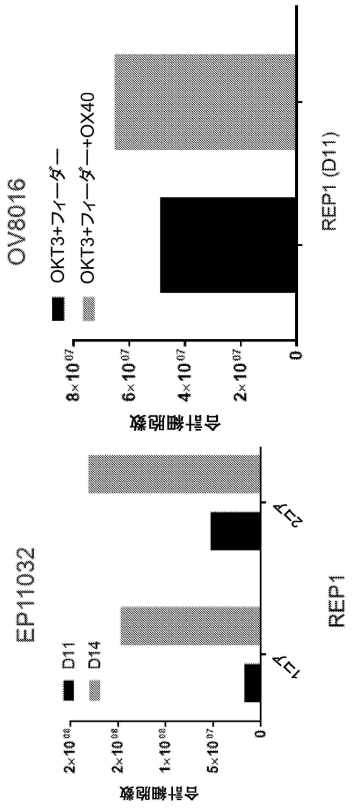
【図４４】



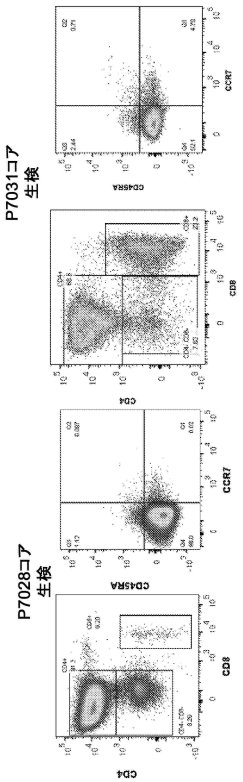
【図４５】

	培養条件	コア条件(#)	REP1	REP2
乳房 (EP11032)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1 vs 2	11日目に>50E6細胞	173及び158倍 (1/2コア)拡大 約pg/ml IFNg
卵巣 (OV8016)	REP1: IL2 +/- OX40 REP2: IL-2 +/- OX40 (進行中)	2	11日目に>50E6細胞 (OX40条件)	進行中

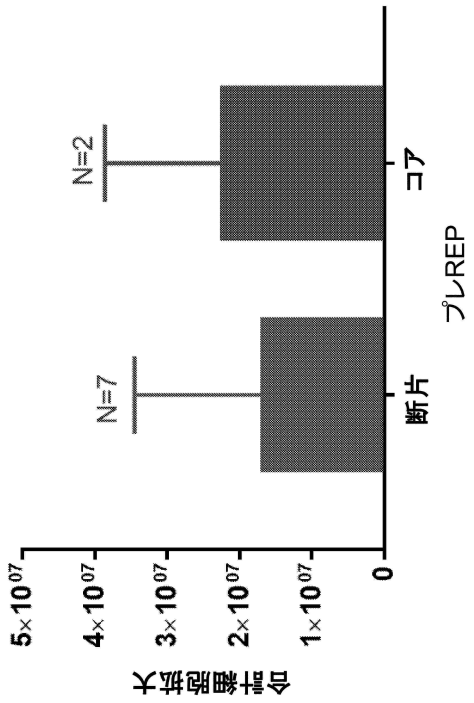
【図４６】



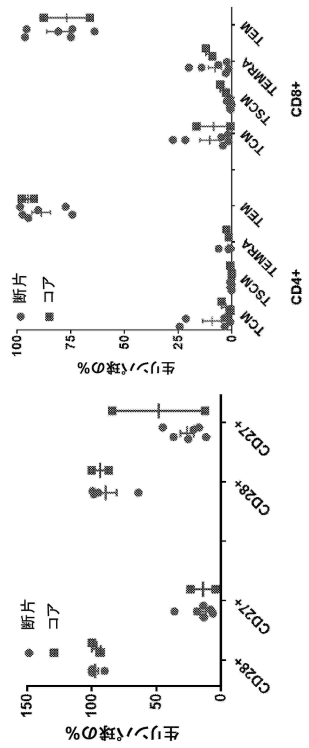
【図４７】



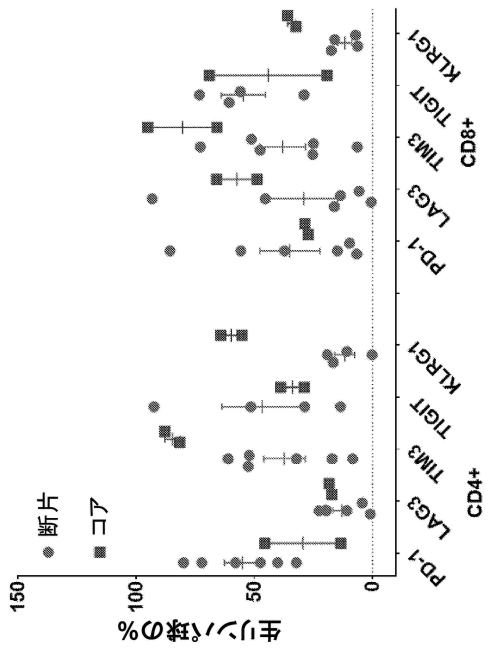
【図４８】



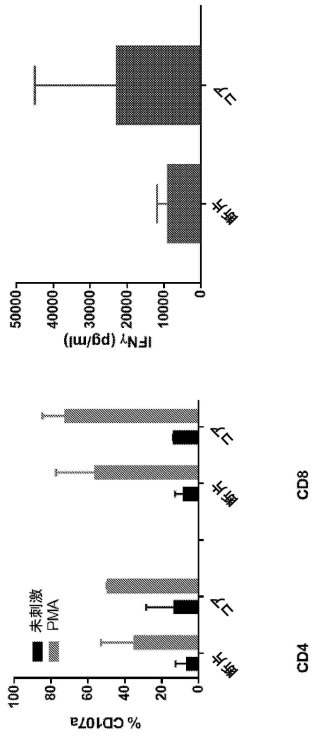
【図４９】



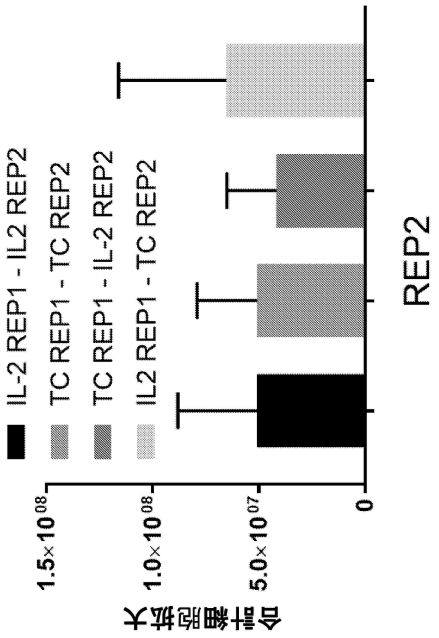
【図５０】



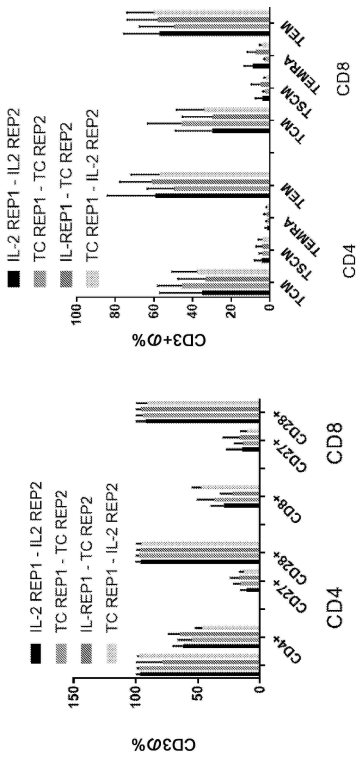
【図５１】



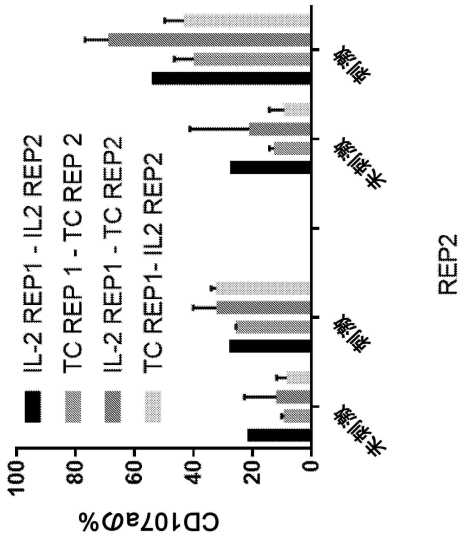
【図５２】



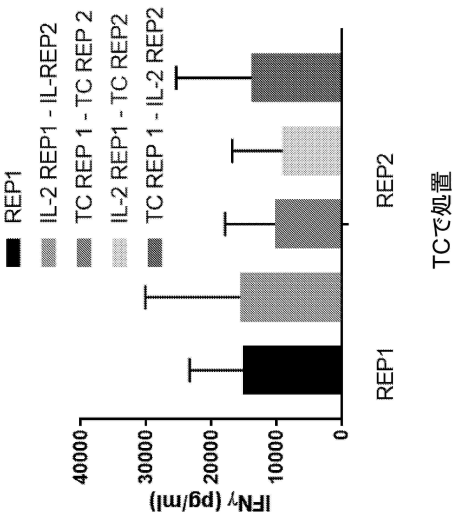
【図５３】



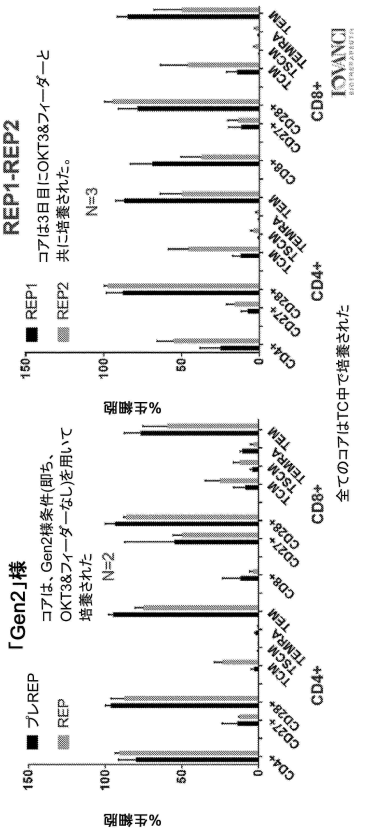
【図５４】



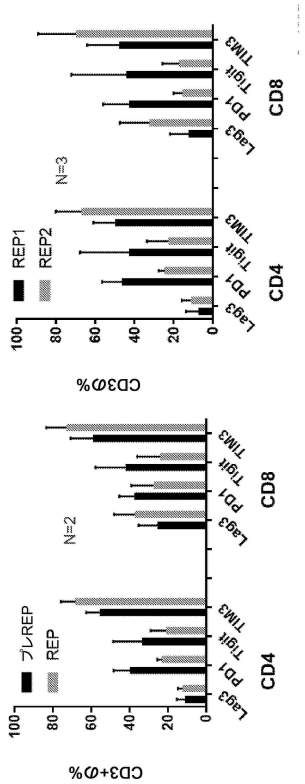
【図５５】



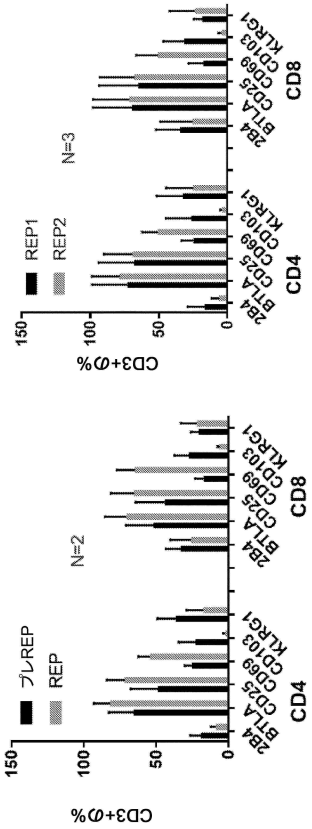
【図５６】



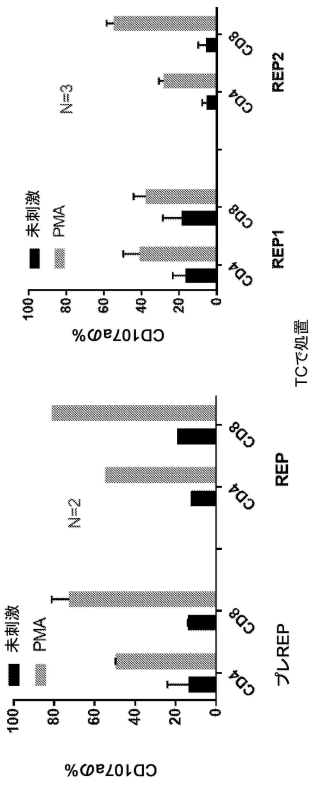
【図５７】



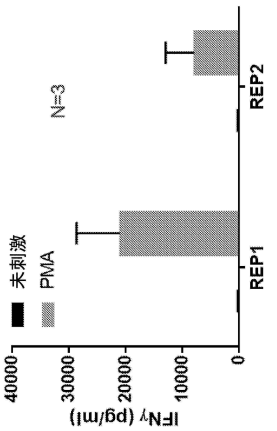
【図５８】



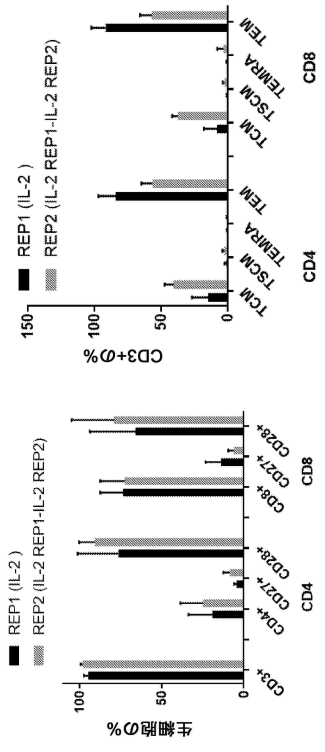
【図５９】



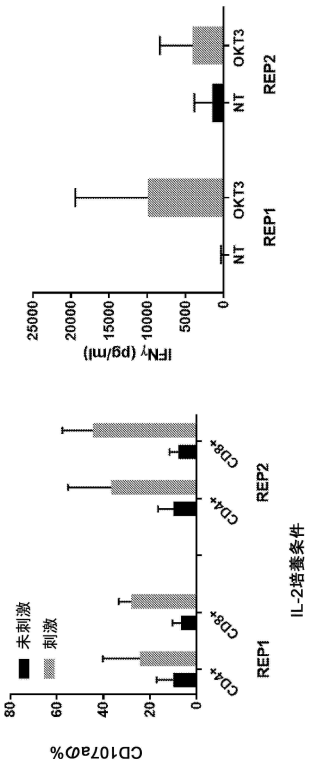
【図６０】



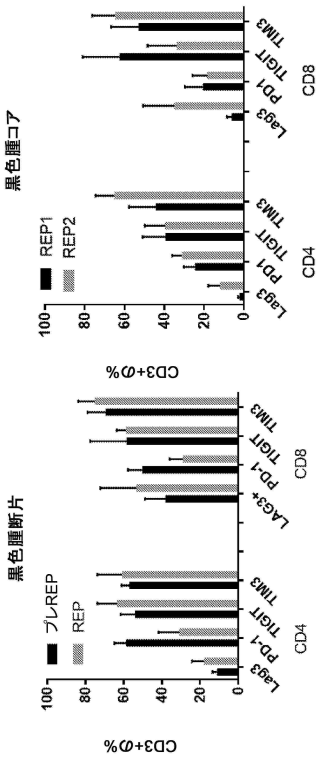
【図６１】



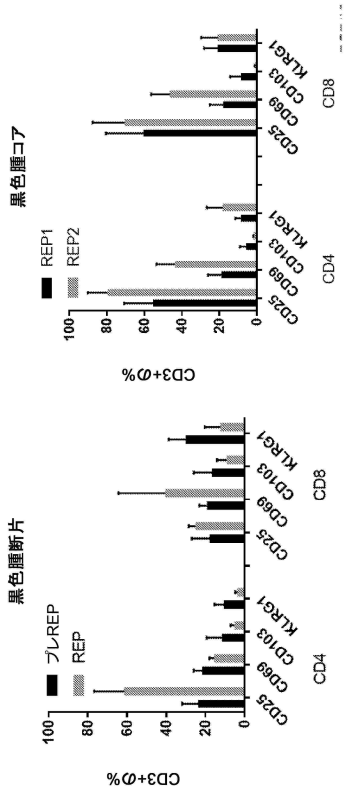
【図６２】



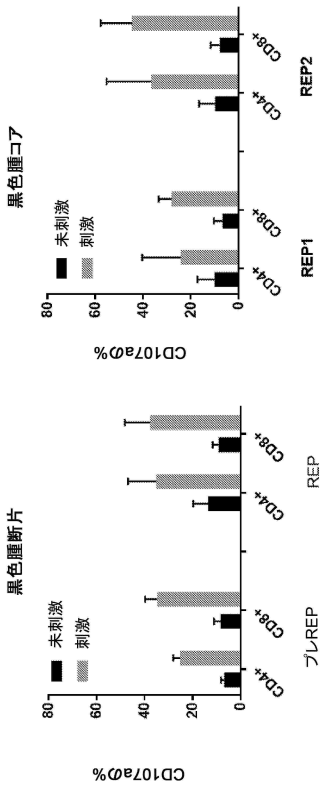
【図６３】



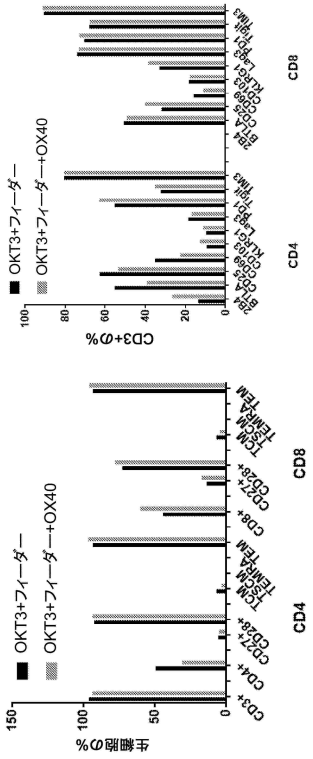
【図６４】



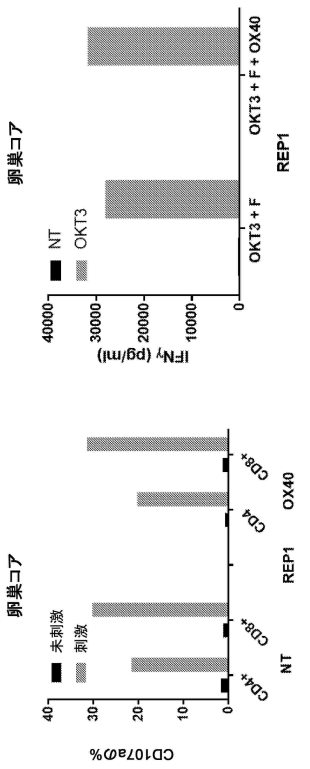
【図６５】



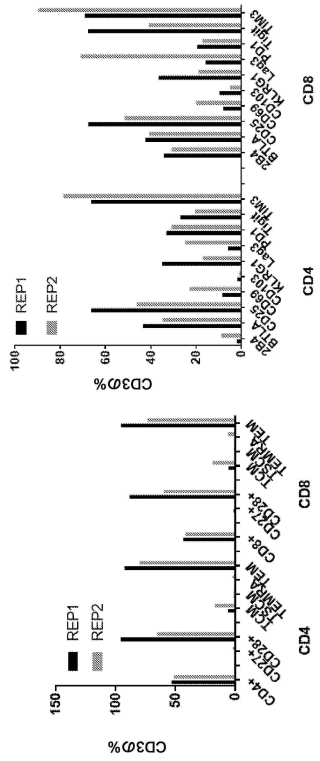
【図６６】



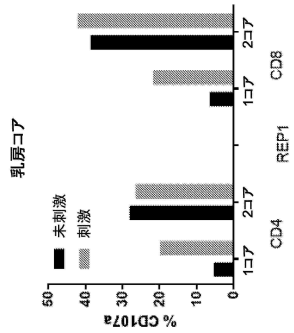
【図６７】



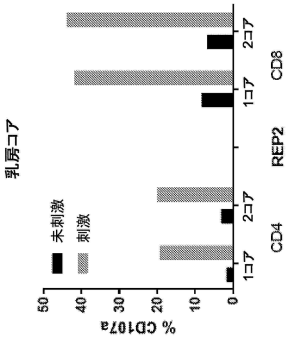
【図６８】



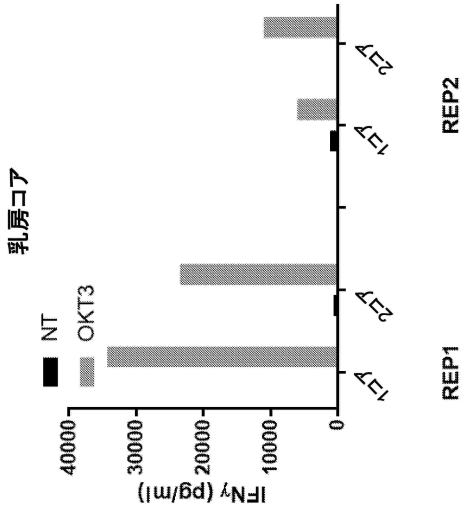
【図６９Ａ】



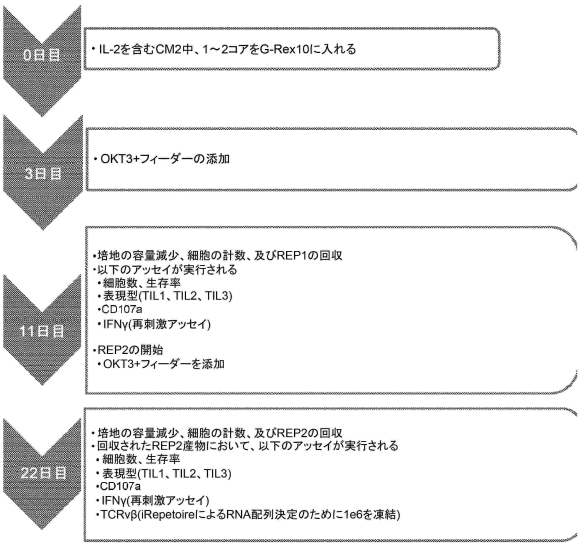
【図６９Ｂ】



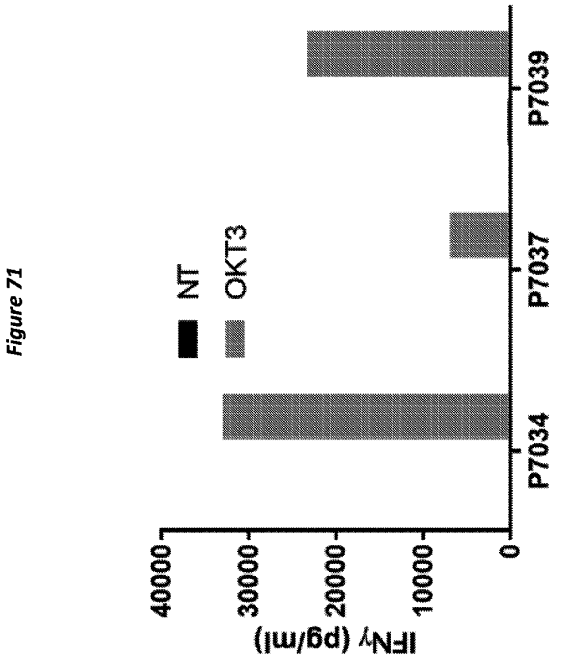
【図６９Ｃ】



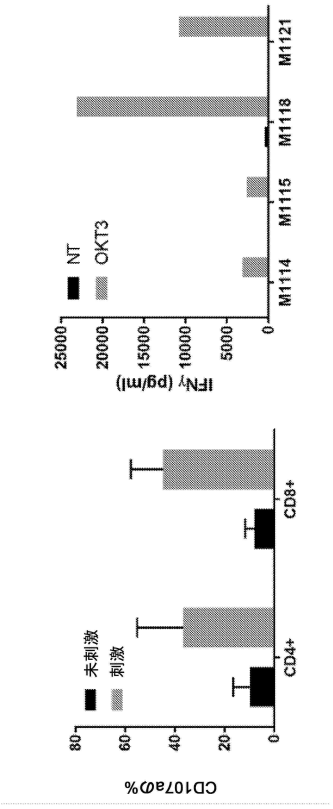
【図７０】



【図７１】



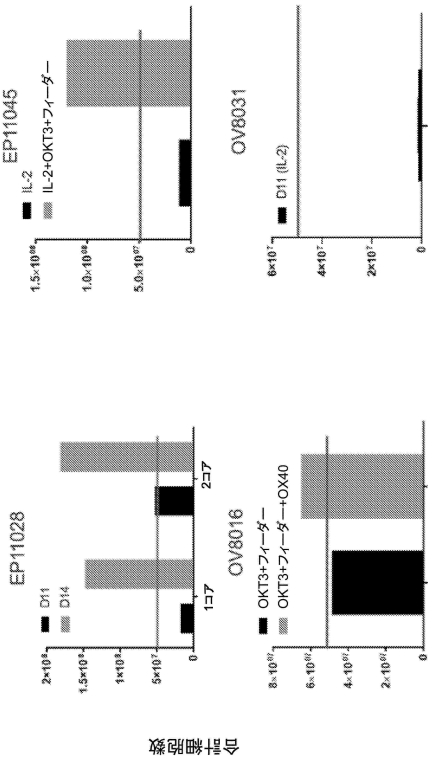
【図７２】



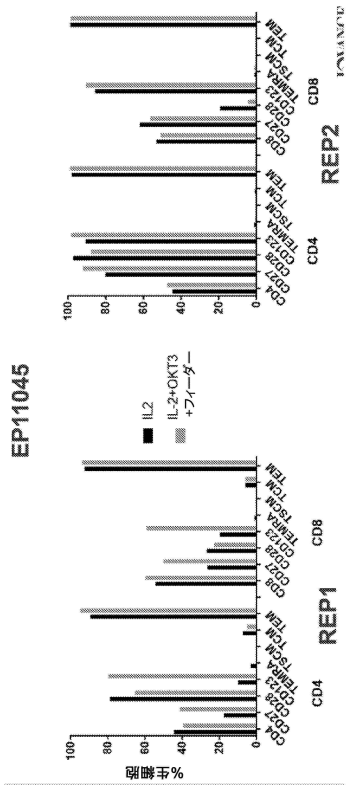
【図７３Ａ】

	培養条件	コア検体(#)	REP1	REP2
乳房 (EP11028)	REP1: IL2 REP2: IL2	1 vs 2	11日目=>50E6細胞(2コア)	173及び156倍(1/2コア) 拡大 約34,0000及び23,000pg/ml IFNγ
乳房 (EP11045)	REP1: IL-2(+/-OKT3+フィーダー) REP2: IL-2(OKT3+フィーダー)	2	11日目=>50e6細胞 (OKT3+フィーダー)	1178及び1920倍 (+/-OKT3+フィーダー REP1) 約99,000及び45,000pg/ml IFNγ
卵巣 (OV8016)	REP1: IL2 +/- OX40 REP2: IL-2 +/- OX40	2	11日目=>50E6細胞 (OX40なし/OX40)	1860及び1540倍 (OX40なし/OX40)拡大 約10,000及び20,000pg/ml IFNγ
卵巣 (OV8031)	REP1: IL2 REP2: IL-2	1(小コア)	11日目=1.3e6細胞	400倍拡大 約ELISA進行中

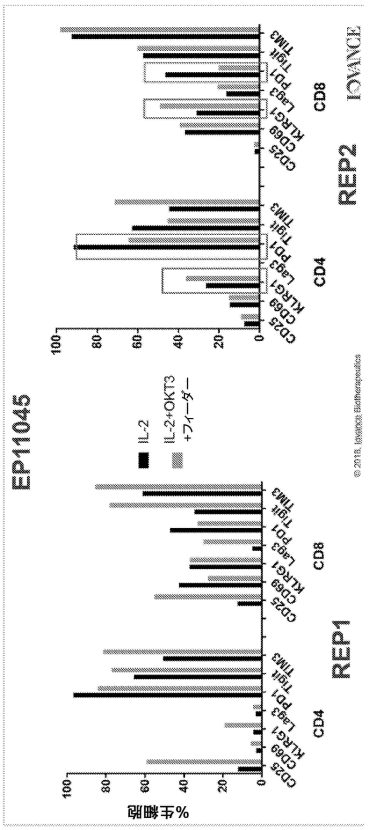
【図７３Ｂ】



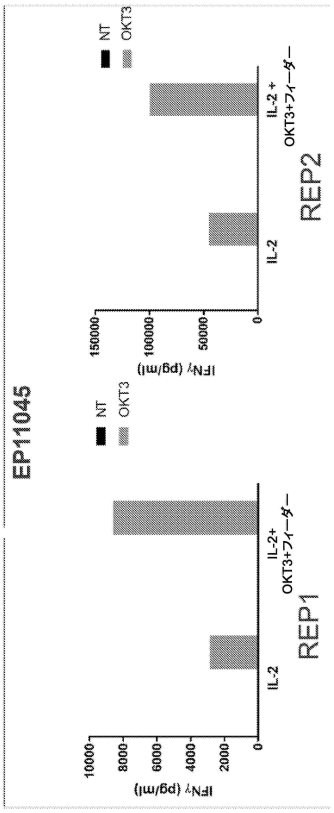
【図７４】



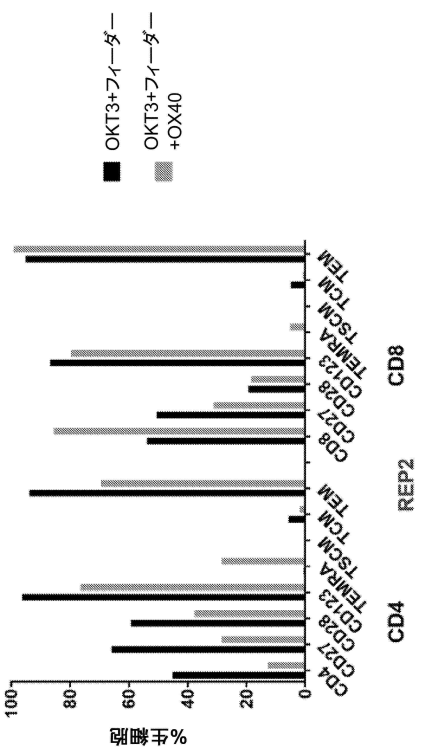
【図７５】



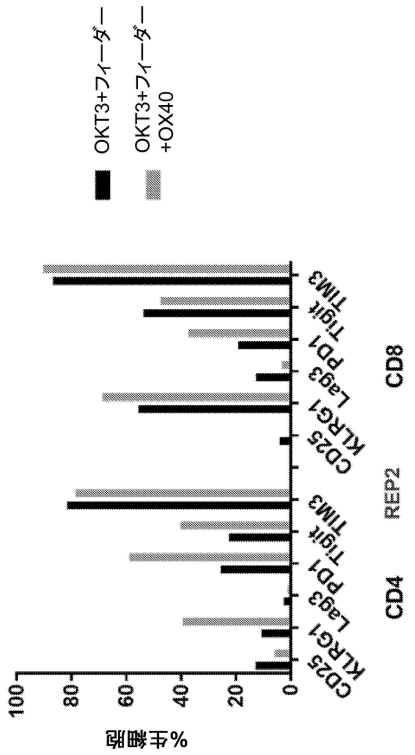
【図７６】



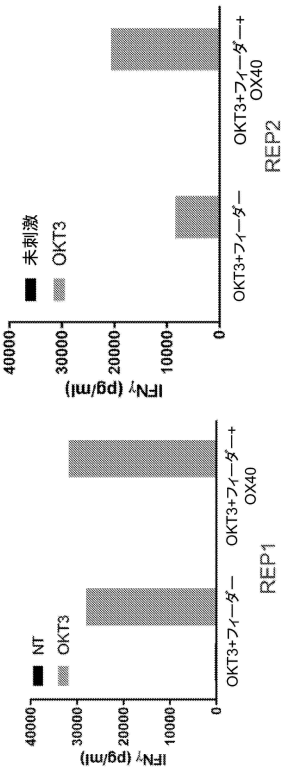
【図７７】



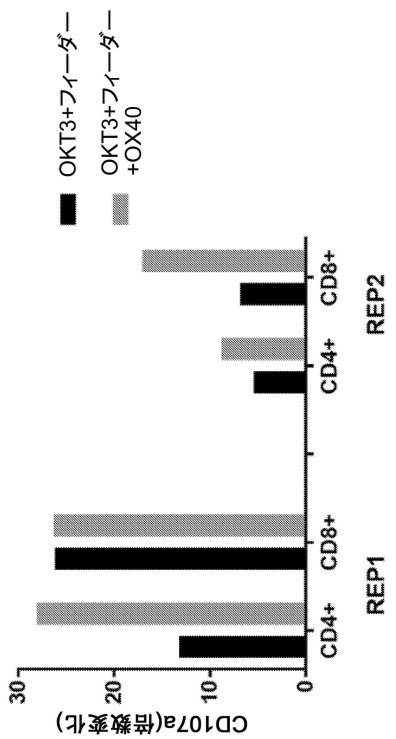
【図７８】



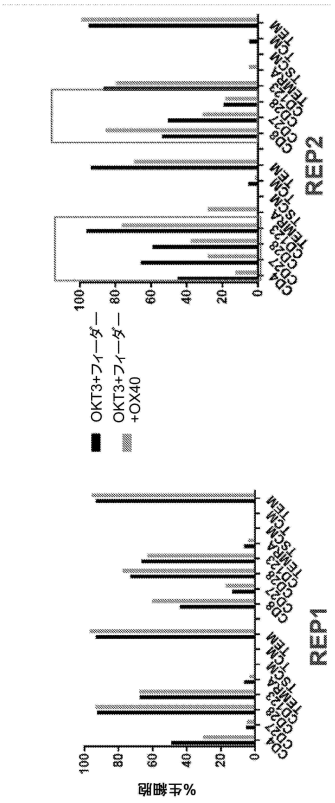
【図７９】



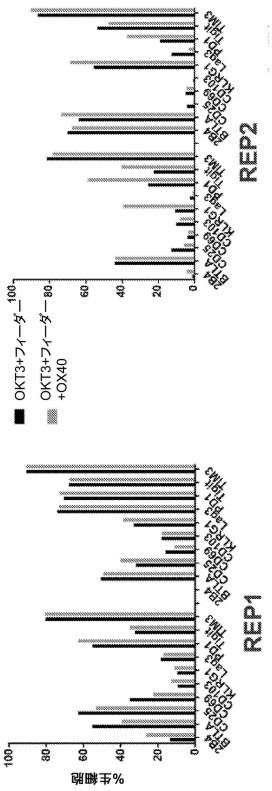
【図８０】



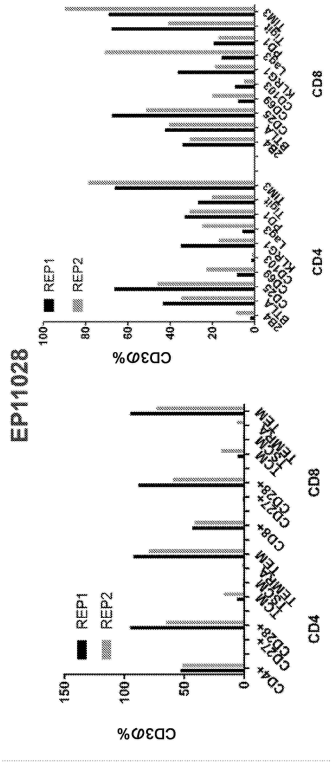
【図８１】



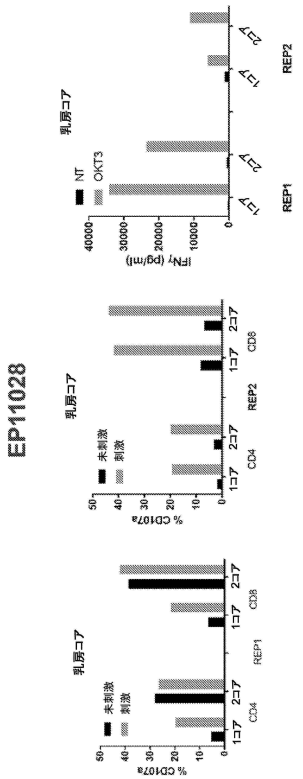
【図８２】



【図８３】



【図８４】



【図８５Ａ】

プロセス2A: ステップA～Eから約22日間	プロセスGEN3: ステップA～Eから約14～16日間
ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手 (任意選択により、ステップBの前に凍結できる)	ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手 (任意選択により、ステップBの前に凍結できる)
ステップB 第1の拡大培養 (IL-2を含む培地で約3日間～14日間増殖させた 容器あたり少なくとも40断片への物理的断片化)	ステップB 第1の初回刺激拡大培養 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を 含む培地で約1日間～7日間増殖させた容器あたり 最大60断片への物理的断片化)
ステップC 第1の拡大培養から第2の拡大培養への移行 (ステップB TILは、任意選択によりステップBの11日目に、 直接ステップDへ移行する)	ステップC 第1の初回刺激拡大培養から 第2の急速拡大培養への移行 (ステップB TILは、7日目に直接ステップDへ移行する)
ステップD 第2の拡大培養 (閉鎖容器中、IL-2、OKT-3、及び 抗原提示フィーダー細胞を含む増殖培地中でTIL増殖)	ステップD 第2の急速拡大培養 (IL-2、OKT-3、及び2X抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地中でTIL増殖;10～11日目スケールアップ 及び追加のIL-2添加)
ステップE ステップDからTILを回収する (閉鎖系を介したTIL回収)	ステップE ステップDからTILを回収する
ステップF 最終製剤及び/又は輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)	ステップF 最終製剤及び/又は輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)

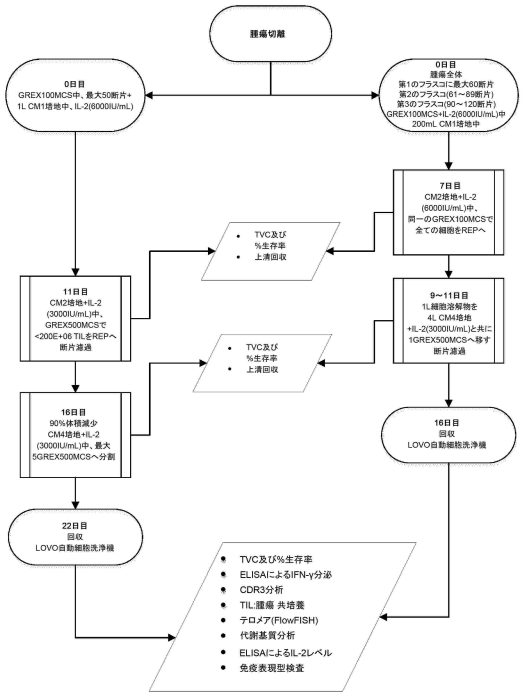
【図８５Ｂ】

小生検GEN3プロセス:ステップA～Eから約17～24日間
ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手 (任意選択により、ステップBの前に凍結できる)
ステップB 第1の初回刺激拡大培養 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地で約3日間～12日間増殖させた 容器あたり最大60断片への物理的断片化)
ステップC 第1の初回刺激拡大培養から第2の急速拡大培養への移行 (ステップB TILは、7～12日目に直接ステップDへ移行する)
ステップD 第2の急速拡大培養 (IL-2、OKT-3、及び2X抗原提示フィーダー細胞を含む増殖培地中でTIL増殖; 10～12日目スケールアップ及び追加のIL-2添加)
ステップE ステップDからTILを回収する
ステップF 最終製剤及び/又は輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)

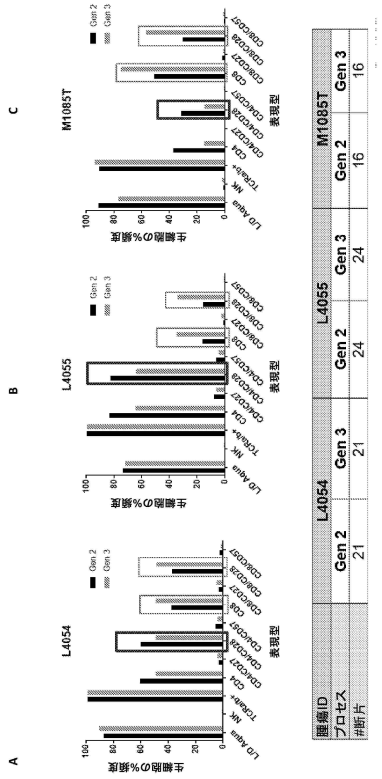
【図８５Ｃ】

小生検プロセス:バージョン2(GEN3ベースのプロセス) ステップA～Eから約17～24日間
ステップA 患者の腫瘍サンプルを入手
ステップB 第1の拡大培養 3日間～12日間(1～3日目のいずれかにOKT-3及び抗原提示フィーダー細胞を使用)
ステップC 第1の拡大培養から第2の拡大培養への移行 貯蔵無し、任意選択により閉鎖系
ステップD 第2の拡大培養 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞 3～12日間 任意選択により閉鎖系
ステップE ステップDからTILを回収する 閉鎖系
ステップF 最終製剤及び/又は輸注バッグに移す (任意選択により凍結保存)

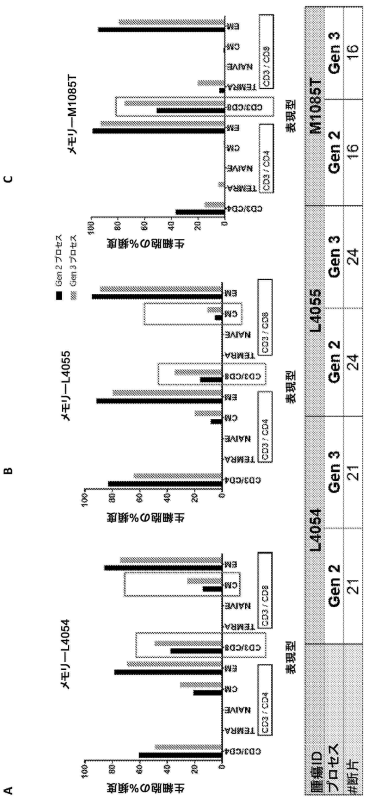
【図８６】



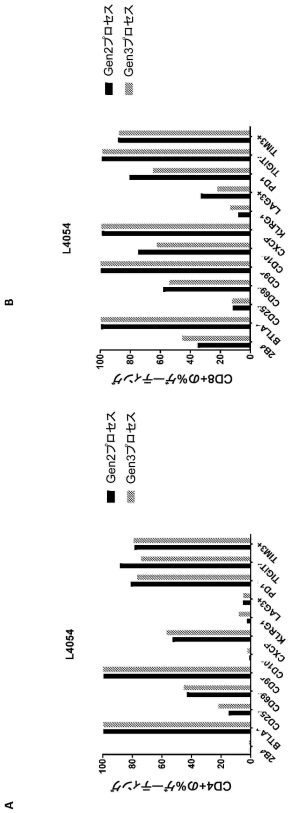
【図８７】



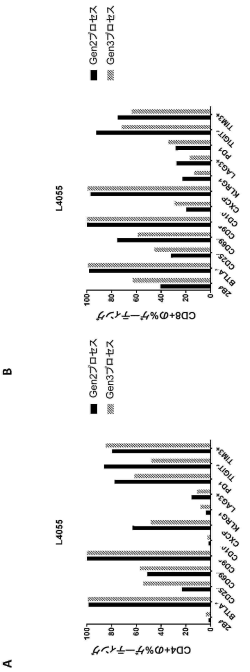
【図８８】



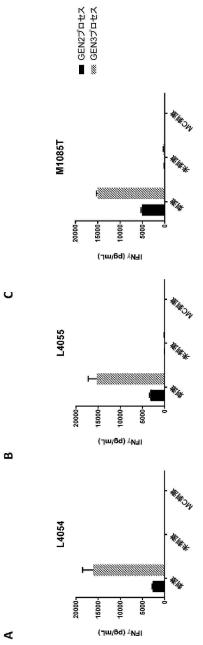
【図８９】



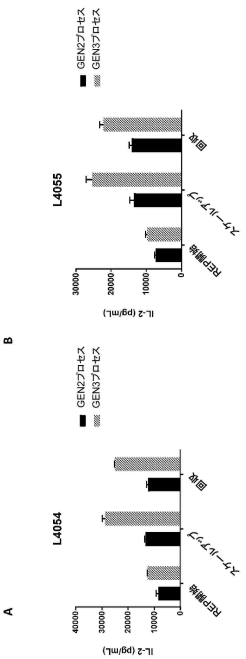
【図９０】



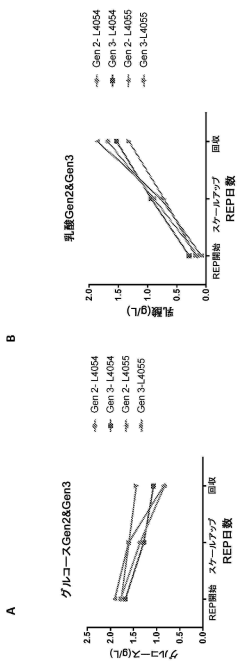
【図９１】



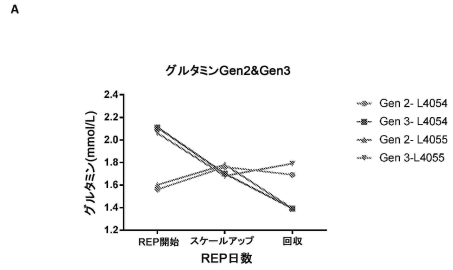
【図９２】



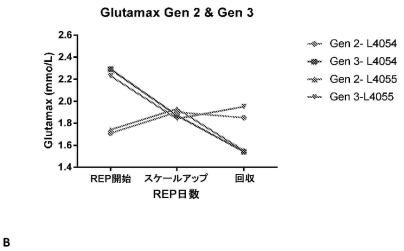
【図９３】



【図９４Ａ】



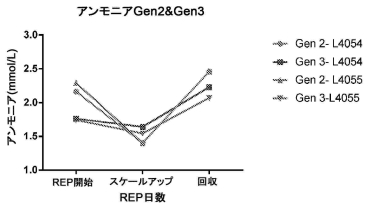
【図９４Ｂ】



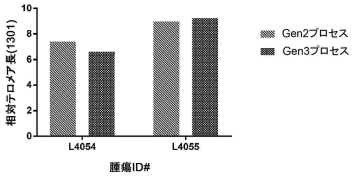
B

【図９４Ｃ】

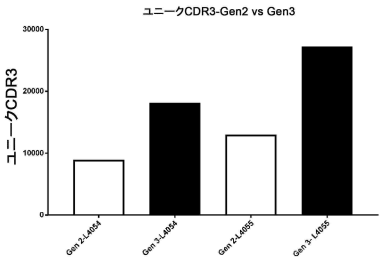
C



【図９５】



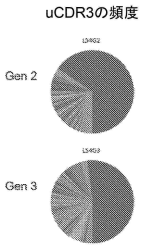
【図９６】



【図９７】

# uCDR3 (%オーバーラップ)	全uCDR3		上位80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

* Gen3及びGen2最終産物で199配列が共有され、これはGen2からのユニークCDR3配列の上位80%の97.07%がGen3最終産物と共有されることに対応する。

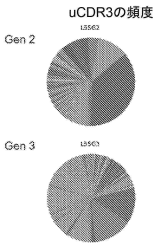


【図９８】

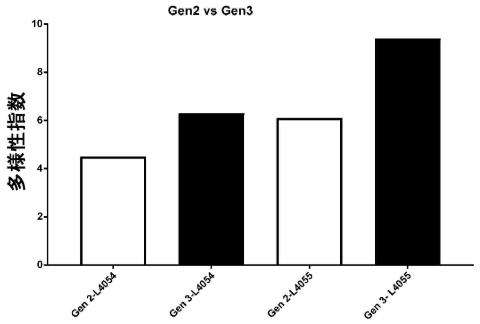
# uCDR3 (%オーバーラップ)	全uCDR3		上位80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

* Gen3及びGen2最終産物で1833配列が共有され、これはGen2からのユニークCDR3配列の上位80%の99.45%がGen3最終産物と共有されることに対応する。

© 2016 Source BioSciences



【図９９】



【図１００】

体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
188	合計	2.46E+05	2.28E+05	2.31E+05	2.35E+05	4.42E+07
	生	2.37E+05	2.27E+05	2.26E+05	2.30E+05	4.32E+07
	死	9.26E+03	7.03E+02	4.63E+03	4.86E+03	9.14E+05
	%生存率	96.20%	99.70%	98.00%	97.97%	
188	合計	8.26E+04	8.00E+04	7.66E+04	7.97E+04	1.50E+07
	生	7.60E+04	7.54E+04	6.89E+04	7.34E+04	1.38E+07
	死	6.61E+03	4.63E+03	7.73E+03	6.32E+03	1.19E+06
	%生存率	92.00%	94.20%	89.90%	92.03%	
200	合計	2.44E+04	4.20E+04	1.05E+04	2.56E+04	5.13E+06
	生	1.74E+04	2.80E+04	7.03E+03	1.75E+04	3.50E+06
	死	7.03E+03	1.40E+04	3.48E+03	8.17E+03	1.63E+06
	%生存率	71.20%	66.70%	66.90%	68.27%	

【図１０１】

ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 3 #L4054 第1ラウンド	1000	合計	1.01E+06	1.01E+06	1.08E+06	1.00E+06	1.00E+09
		生	9.11E+05	8.60E+05	5.09E+04	9.35E+05	9.35E+08
		死	8.60E+05	9.34E+05	1.01E+06	6.44E+04	6.44E+07
		%生存率	94.40%	92.60%	93.70%	93.57%	
Gen 3 #L4055 第2ラウンド	1000	合計	8.56E+05	9.04E+05	8.81E+05	8.80E+05	8.80E+08
		生	8.24E+05	8.67E+05	8.42E+05	8.44E+05	8.44E+08
		死	3.17E+04	3.70E+04	3.87E+04	3.58E+04	3.58E+07
		%生存率	96.30%	95.90%	95.60%	95.93%	
Gen 3 #M1085T	200	合計	2.32E+06	2.25E+06		2.29E+06	4.57E+08
		生	1.68E+06	1.57E+06		1.63E+06	3.25E+08
		死	6.41E+05	6.79E+05		6.60E+05	1.32E+08
		%生存率	72.40%	69.90%		71.15%	
Gen 2 #L4054 第1ラウンド	142	合計	1.08E+06	9.84E+05	1.10E+06	1.04E+06	1.48E+08
		生	1.06E+06	9.71E+05	9.79E+05	1.00E+06	1.42E+08
		死	2.05E+04	1.26E+04	2.12E+04	1.81E+04	2.57E+06
		%生存率	98.10%	98.70%	97.90%	98.23%	
Gen 2 #L4055 第2ラウンド	96	合計	2.93E+05	3.05E+05	2.64E+05	2.87E+05	2.76E+07
		生	2.88E+05	2.96E+05	2.55E+05	2.80E+05	2.68E+07
		死	4.72E+03	9.14E+03	8.26E+03	7.37E+03	7.08E+05
		%生存率	98.40%	97.00%	96.90%	97.43%	
Gen 2 #M1085T	200	合計	9.10E+04	5.60E+04		7.35E+04	1.47E+07
		生	8.05E+04	4.21E+04		6.13E+04	1.23E+07
		死	1.04E+04	1.39E+04		1.22E+04	2.43E+06
		%生存率	88.50%	75.20%		81.85%	

【図１０２】

ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 3 #L4054 第1ラウンド-LOVO前	1243.1	合計	1.40E+07	1.46E+07		1.43E+07	1.78E+10
		生	1.32E+07	1.35E+07		1.34E+07	1.66E+10
		死	8.47E+05	1.12E+06		9.64E+05	1.22E+09
		%生存率	94.00%	92.40%		93.20%	
Gen 3 #L4054 第1ラウンド-LOVO後	330	合計	6.35E+07	6.07E+07		6.21E+07	2.05E+10
		生	5.72E+07	5.44E+07		5.58E+07	1.84E+10
		死	6.35E+06	6.27E+06		6.31E+06	2.08E+09
		%生存率	90.00%	89.70%		89.85%	

ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 3 #L4055 第2ラウンド-LOVO前	1032.6	合計	9.49E+06	1.05E+07		1.00E+07	1.03E+10
		生	8.90E+06	9.79E+06		9.35E+06	9.65E+09
		死	5.85E+05	6.75E+05		6.30E+05	6.51E+08
		%生存率	93.80%	93.60%		93.70%	
Gen 3 #L4055 第2ラウンド-LOVO後	330	合計	3.31E+07	2.82E+07	3.18E+07	3.07E+07	1.01E+10
		生	2.85E+07	2.46E+07	2.77E+07	2.66E+07	8.76E+09
		死	4.56E+06	3.61E+06	4.12E+06	4.09E+06	1.35E+09
		%生存率	86.20%	87.20%	87.10%	86.70%	

ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 3 #M1085T LOVO前	5000	合計	2.26E+06	2.64E+06		2.45E+06	1.23E+10
		生	1.97E+06	2.31E+06		2.14E+06	1.07E+10
		死	2.85E+05	3.30E+05		3.08E+05	1.54E+09
		%生存率	87.40%	87.50%		87.45%	
Gen 3 #M1085T - LOVO後 CS10添加前	150	合計	6.27E+07	5.44E+07		5.86E+07	8.78E+09
		生	5.50E+07	4.74E+07		5.12E+07	7.68E+09
		死	7.70E+06	6.96E+06		7.33E+06	1.10E+09
		%生存率	87.70%	87.20%		87.45%	

ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 2 #L4054 第1ラウンド	913	合計	3.53E+06	4.30E+06		3.92E+06	3.57E+09
		生	3.35E+06	4.00E+06		3.68E+06	3.36E+09
		死	1.75E+05	3.03E+05		2.39E+05	2.18E+08
		%生存率	95.00%	93.00%		94.00%	
Gen 2 #L4055 第2ラウンド	292	合計	1.29E+07	1.36E+07		1.33E+07	3.87E+09
		生	1.16E+07	1.23E+07		1.20E+07	3.49E+09
		死	1.27E+06	1.23E+06		1.25E+06	3.65E+08
		%生存率	90.10%	90.90%		90.50%	
Gen 2 #M1085T	369	合計	6.75E+06	6.98E+06		6.87E+06	2.53E+09
		生	5.22E+06	5.58E+06		5.40E+06	1.99E+09
		死	1.54E+06	1.40E+06		1.47E+06	5.42E+08
		%生存率	77.20%	79.90%		78.55%	

【図１０３】

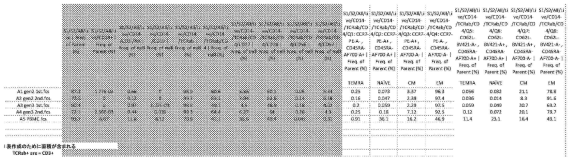
ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 2 #L4054 第1ラウンド-LOVO前	1385.7	合計	3.55E+07	4.12E+07	4.03E+07	3.90E+07	5.40E+10
		生	3.26E+07	3.73E+07	3.67E+07	3.55E+07	4.92E+10
		死	2.93E+06	3.87E+06	3.59E+06	3.46E+06	4.80E+09
		%生存率	91.70%	90.60%	91.10%	91.13%	
Gen 2 #L4054 第1ラウンド-LOVO後	330	合計	1.70E+08	1.79E+08	1.68E+08	1.72E+08	5.69E+10
		生	1.49E+08	1.58E+08	1.48E+08	1.52E+08	5.01E+10
		死	2.16E+07	2.04E+07	2.00E+07	2.07E+07	6.82E+09
		%生存率	87.30%	88.60%	88.10%	87.95%	

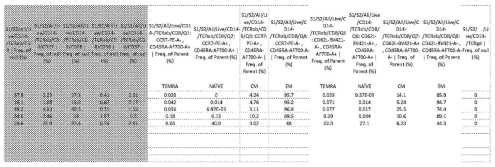
ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 2 #L4055 第1ラウンド-LOVO前	1968.2	合計	3.15E+07	2.51E+07	2.97E+07	2.88E+07	5.66E+10
		生	2.89E+07	2.25E+07	2.72E+07	2.62E+07	5.16E+10
		死	2.57E+06	2.61E+06	2.52E+06	2.57E+06	5.05E+09
		%生存率	91.80%	89.60%	91.50%	90.97%	
Gen 2 #L4055 第1ラウンド-LOVO後	330	合計	2.33E+08	1.89E+08	1.53E+08	1.92E+08	6.33E+10
		生	2.03E+08	1.66E+08	1.33E+08	1.67E+08	5.52E+10
		死	3.00E+07	2.24E+07	1.94E+07	2.39E+07	7.90E+09
		%生存率	87.10%	88.10%	87.30%	87.50%	

ID	体積(mL)		カウント1 (細胞/mL)	カウント2 (細胞/mL)	カウント3 (細胞/mL)	平均 (細胞/mL)	合計セル 平均*体積
Gen 2 #M1085T-LOVO前	N/A	合計				#DIV/0!	#DIV/0!
		生				#DIV/0!	#DIV/0!
		死				#DIV/0!	#DIV/0!
		%生存率				#DIV/0!	
Gen 2 #M1085T - LOVO後 CS10添加前	150	合計	8.51E+07	9.05E+07		8.78E+07	1.32E+10
		生	7.33E+07	7.79E+07		7.56E+07	1.13E+10
		死	1.18E+07	1.26E+07		1.22E+07	1.83E+09
		%生存率	86.10%	86.10%		86.10%	

L4054 Gen2の場合、研究の合計数であるため、LOVO後の数は4つのフラスコに外挿された。1つのフラスコは汚染されており、合計=6.67E+10で外挿が行われた。

【図１０４】





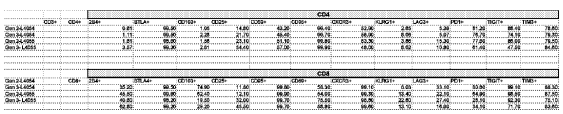
【図１０５】

	CD3/CD4 CD38	HLA-DR	CCR7- CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+ CD45RA-	CCR7-CD45RA-
GEN3-16日目-回収	42.4	95.2	4.96	0.7	1.22	93.1
GEN2-22日目-回収	50.4	98	0.61	0.13	0.3	99

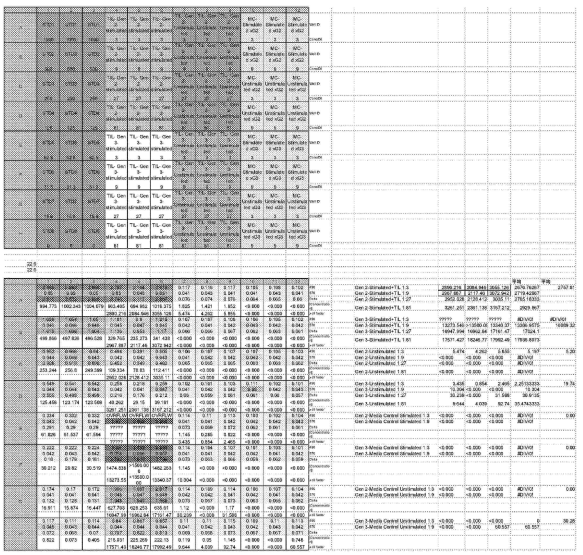
	CD3/CD8 CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-
CD8	77.6	83.2	90.3	20.5	0.013	0.06 79.5
	54.3	88	83.2	4.24	0.026	1.05 94.7

【図１０６】

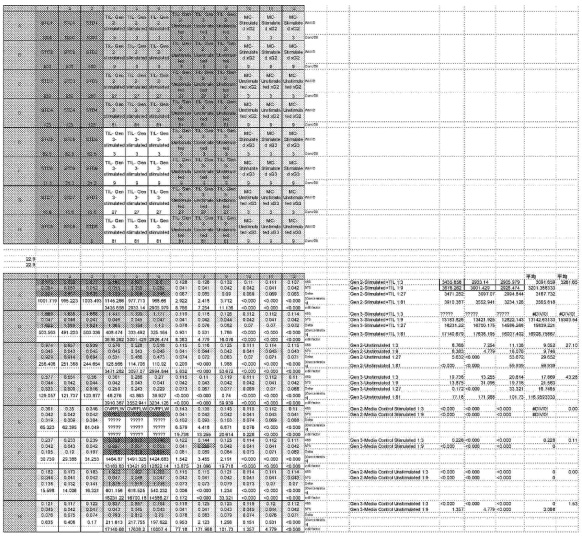
Figure 106



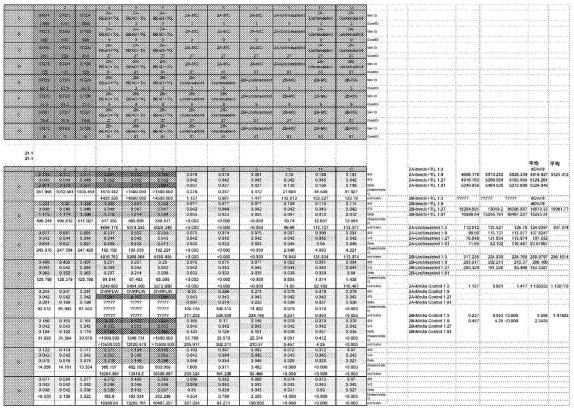
【図１０７】



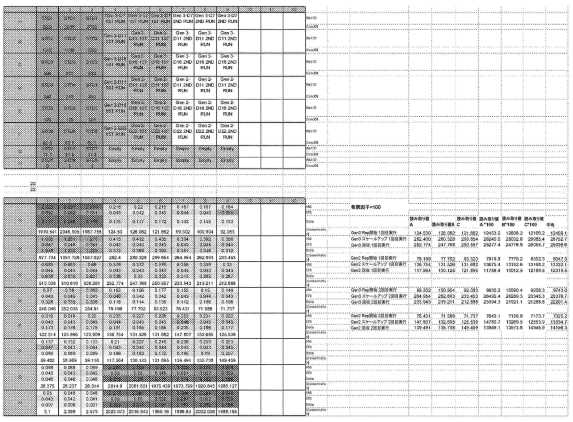
【図１０８】



【図１０９】



【図１１０】



【図１１１】

サンプル番号#	説明	グルコース (g/L)	乳酸(g/L)	アンモニア (mmol/L)	グルタミン (mmol/L)	Glutamax (mmol/L)	Glutamax-グルタミン (mmol/L)
1	Gen2-Rep開始第1ラウンド#4504	1.78	0.14	2.16	1.56	1.71	0.16
2	Gen2-スケールアップ第1ラウンド#4504	1.36	0.89	1.40	1.76	1.90	0.15
3	Gen2-回収第1ラウンド#4504	0.83	1.68	2.46	1.69	1.85	0.17
4	Gen3-Rep開始第1ラウンド#4504	1.68	0.29	1.76	2.11	2.29	0.18
5	Gen3-スケールアップ第1ラウンド#4504	1.28	0.94	1.64	1.70	1.87	0.16
6	Gen3-回収第1ラウンド#4504	1.07	1.53	2.23	1.39	1.54	0.14
7	Gen2-Rep開始第2ラウンド#4504	1.91	0.08	2.29	1.60	1.74	0.14
8	Gen2-スケールアップ第2ラウンド#4504	1.61	0.77	1.40	1.78	1.93	0.15
9	Gen2-回収第2ラウンド#4504	0.85	1.86	2.46	1.39	1.55	0.16
10	Gen3-Rep開始第2ラウンド#4504	1.77	0.18	1.74	2.06	2.23	0.17
11	Gen3-スケールアップ第2ラウンド#4504	1.60	0.72	1.54	1.68	1.84	0.15
12	Gen3-回収第2ラウンド#4504	1.44	1.32	2.07	1.79	1.95	0.16

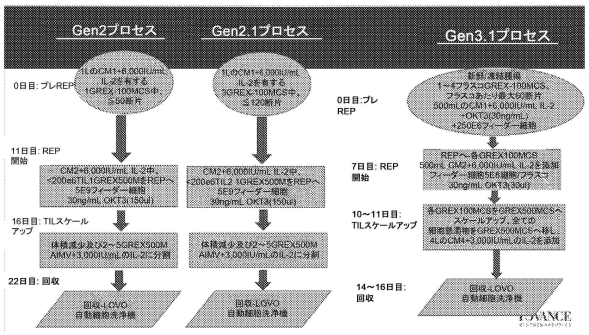
【図１１２】

	$FIL	S/L/1301 | Geometr	S/L/Pt |	幾何平均(FL03-A)
A1 gen2L4054 ne	A1 gen2L4054 neg.fcs	34.5		3.24
A2 gen2L4054 ne	A2 gen2L4054 neg.fcs	34		3.19
A3 gen2L4054 po	A3 gen2L4054 pos.fcs	1834		70.6
A4 gen2L4054 po	A4 gen2L4054 pos.fcs	1872		70.3
A5 gen2L4055 ne	A5 gen2L4055 neg.fcs	31.9		4.23
A6 gen2L4055 ne	A6 gen2L4055 neg.fcs	32.4		4.87
A7 gen2L4055 po	A7 gen2L4055 pos.fcs	1941		88.7
A8 gen2L4055 po	A8 gen2L4055 pos.fcs	1933		91.1
B1 gen3L4054 ne	B1 gen3L4054 neg.fcs	31.2		3.45
B2 gen3L4054 ne	B2 gen3L4054 neg.fcs	31.9		3.39
B3 gen3L4054 po	B3 gen3L4054 pos.fcs	2016		61.3
B4 gen3L4054 po	B4 gen3L4054 pos.fcs	2014		76.2
B5 gen3L4055 ne	B5 gen3L4055 neg.fcs	33.7		6.76
B6 gen3L4055 ne	B6 gen3L4055 neg.fcs	35.4		6.7
B7 gen3L4055 po	B7 gen3L4055 pos.fcs	2158		99.4
B8 gen3L4055 po	B8 gen3L4055 pos.fcs	1938		99.5
平均	-	998		43.3
SD	-	999		41.3

【図１１３】

試験	サンプル	サンプルid	種	鎖	読み取り値	CDR3	ユニークCDR3	DS0
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0.1
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0.9

【図１１４】



【図１１５】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
プレREP 0日目	≦50断片/1G-Rex 100MCS-11日間	≦180断片/3G-Rex 配合済みCM1 温培地 100MCS-11日間	*新鮮/凍結腫瘍* 1G-Rexあたり、≦30断片、最大60断片を有する腫瘍全体 100MCS(最大4G-Rex) 配合済み温培地-7日間。プレREP、フィーダー2.5E8細胞+OKT-3(30ng/mL)
REP開始	REPへ-11日目— <200E6 TIL 1G-Rex 500MCS	REPへ-11日目— <200E6 TIL 1G-Rex 500MCS中、 配合済みCM2温培地	REPへ-7日目-全細胞TIL-同じG-Rex 100MCS(100MCS最大4G-Rex)、 標準培地又は限定培地(無血清)。追加のフィーダー 5E8細胞+OKT-3(30ng/mL)
TIL増殖又はスケールアップ	1~5G-REX 500MCS 16日目に分割	2~5G-REX 500MCS 配合済みCM4 温培地 16日目に分割	G-Rex100MCSからTIL懸濁物を G-Rex500MCSへ移す、最大4GREX500MCS- 標準培地又は限定培地(無血清) 10又は11日目にスケールアップ
回収	22日目に回収 LOVO-自動細胞洗浄機	22日目に回収 LOVO-自動細胞洗浄機 (5洗浄サイクル)	14又は16日目に回収 LOVO-自動細胞洗浄機(5洗浄サイクル)
最終製剤	産物を凍結保存 LN2中、300IU/mL IL-2-CS10 複数アリコート	産物を凍結保存 LN2中、300IU/mL IL-2-CS10 複数アリコート	産物を凍結保存 LN2中、300IU/mL IL-2-CS10 複数アリコート
プロセス時間	22日間	22日間	16日間

【図１１６】

プロセス日	条件	Gen 3.1
0日目-プレREP開始	培地CM1	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	OKT-3 (30ng/mL)	+
	フィーダー(250E+06)	+

プロセス日	条件	Gen 3.1
7日目-REP開始	培地CM2	500 mL
	IL-2 (6000 IU/mL)	+
	7日目に添加したOKT-3(30ng/mL)	+
	7日目に添加したフィーダー	500 E06
	日のフィーダー合計	750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
9~11日目-スケールアップ	G-REX 100MCSからTIL懸濁物をG-REX 500MCSへ移す(最大3GREX 500MCS)	はい
16日目-回収	LOVO-自動細胞洗浄機	はい

【図１１７】

プロセス比較	主要なプロセス変化	利点
Gen 2 : Gen 2.1	• 1つのフラスコの代わりに2つのフラスコでプロセスを開始する • REP開始フィーダー層を2つのG-Rex500MCSフラスコに分ける • 培地を先に配合し、使用前に温める	• TILレパートリーの増加による最終細胞数(用量)の増加の可能性 • プロセス全体を通したプロセスの重複性
Gen 2.1 : Gen 3.1	• 新鮮又は凍結腫瘍 • 14～16日のプロセス(22日から) • プロセスにおける合計フィーダー層を減少させる • フィーダー層及びOKTは0日目に存在する • REPは断片で開始される • 100MCSを500MCSへスケール • 複数のプレREPフラスコへスケール • 標準培地及び限定培地(無血清)	• 効力の増加 • 表現型の改善 • プロセス時間の減少 • 試薬試験の減少 • プロセス変動性の低下 • 試薬の限定 • レパートリーの増加 • 不純物の減少(フィーダー) • 同等又はより高い用量

【図１１８】

プロセス比較	主要なプロセス変化	所望の改善	成功の基準	結果
Gen 2 : Gen 3.0	• 14～16日間 • 最大4つのフラスコの断片でREPを開始 • 100MCSを500MCSへスケール	• 効力の増加 • 表現型の改善 • プロセス時間の減少	• INF-gによって測定される効力の増加 ✓ • 同等の表現型 ✓ • 同等の用量 ✓ • 同等の純度 ✓(フィーダー細胞) • クローン多様性の維持 ✓	• Gen2に対する効力の増加 • CD8細胞におけるCD28の発現の改善 • Gen3.1で16日目までにフラスコの最大容量に到達 • フィーダー細胞利用の減少 • 多様性の増加

【図１１９】

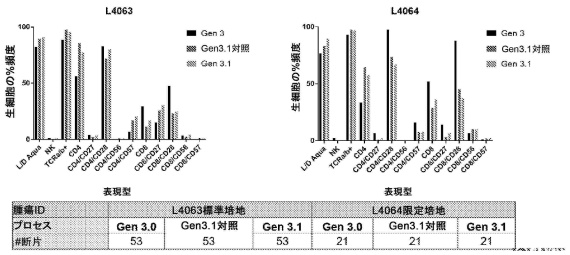
プロセス	Gen 2	Gen 3
L4054	標準培地	標準培地
L4055	標準培地	標準培地
M1085T	標準培地	標準培地

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	限定培地	限定培地	限定培地

標準培地:
プレREP: CM1
REP開始: CM2
分割又はスケールアップ: CM4

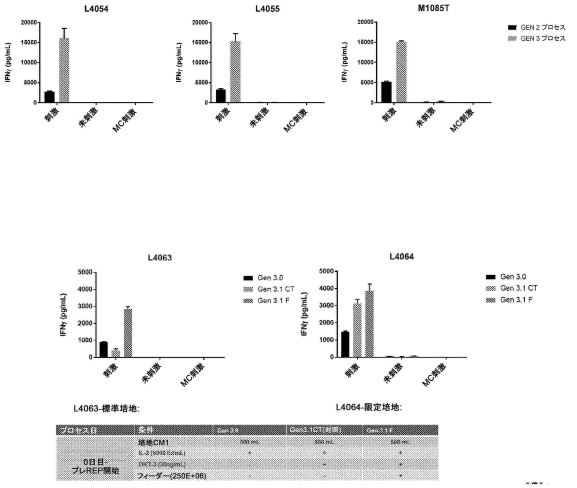
限定培地:
プロセスの各日でCTS Optimizer(無血清培地)

【図１２０】



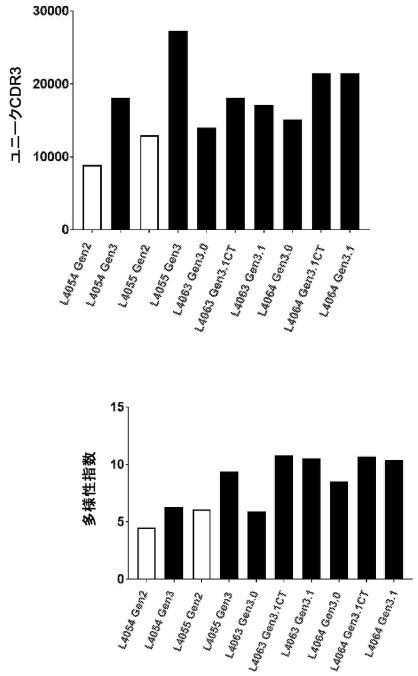
腫瘍ID	L4063標準培地			L4064限定培地		
プロセス	Gen 3.0	Gen3.1対照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen3.1対照	Gen 3.1
#断片	53	53	53	21	21	21

【図１２１】

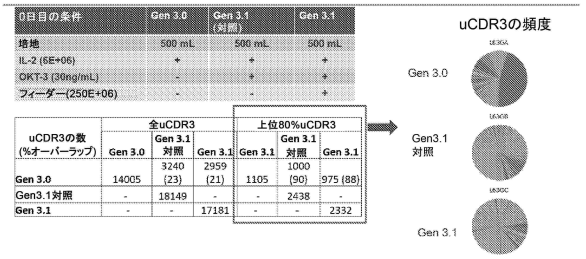


プロセス日	条件	Gen 3.0	Gen3.1CT(対照)	Gen3.1 F
0日目・プレREP開始	培地CM1	500 mL	500 mL	500 mL
	IL-2 (6E+06)	+	+	+
	OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
	フィーダー(250E+06)	-	-	+

【図１２２】



【図１２３】



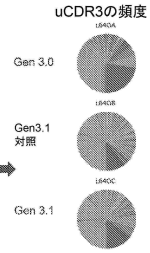
0日目の条件	Gen 3.0	Gen 3.1 (対照)	Gen 3.1
培地	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
フィーダー(250E+06)	-	-	+

uCDR3の数 (%オーバーラップ)	全uCDR3			上位80%uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1	Gen 3.1	Gen 3.1 対照	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen3.1対照	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332

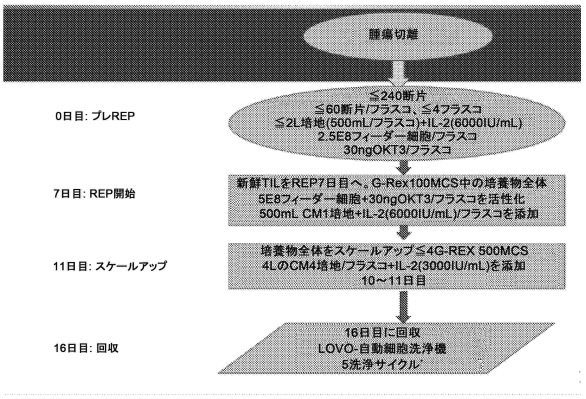
【図１２４】

0日目の条件	Gen 3.0	Gen 3.1 (対照)	Gen 3.1
培地	500 mL	500 mL	500 mL
IL-2 (6E+06)	+	+	+
OKT-3 (30ng/mL)	-	+	+
フィーダー(250E+06)	-	-	+

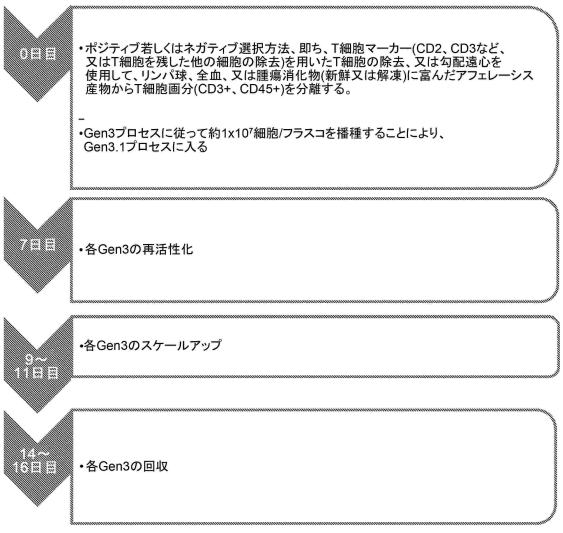
uCDR3の数 (%オーバーラップ)	全uCDR3			上位80%uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 対照	Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36)	5541 (37)	2479	2186 (88)	2163 (87)
Gen3.1対照	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264



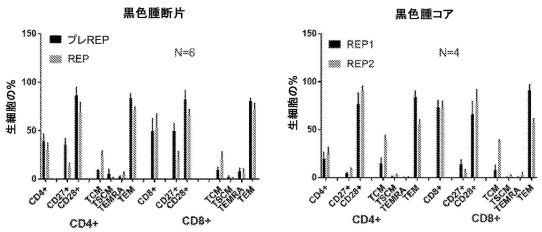
【図１２５】



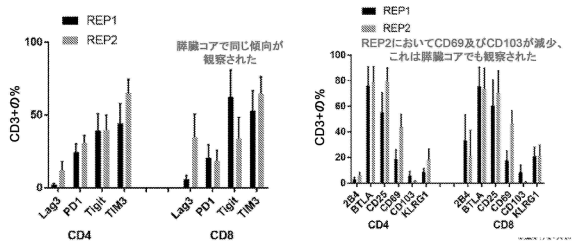
【図１２６】



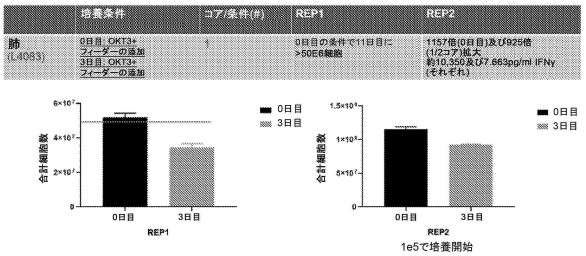
【図１２７】



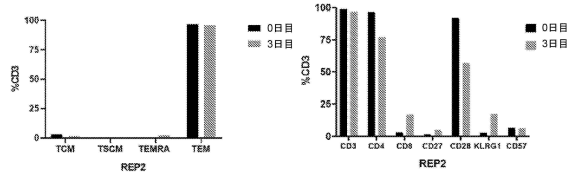
【図１２８】



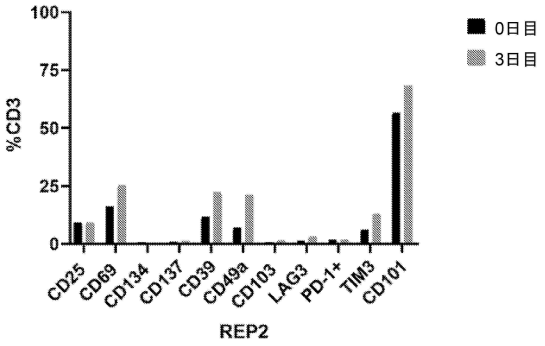
【図１２９】



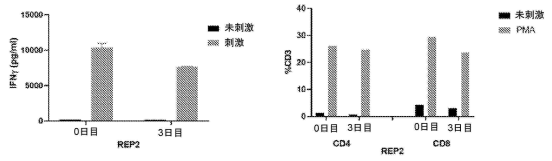
【図１３０】



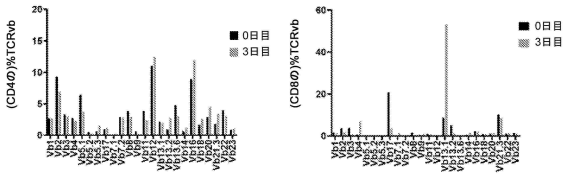
【図１３１】



【図１３２】



【図１３３】



【配列表】

0007557367000001.app

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号 62/756,038
(32)優先日 平成30年11月5日(2018.11.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
アメリカ合衆国，フロリダ州 ３３５４７，リティア，オークリーフ ラン ドライブ １５９０８
(72)発明者 シャルティエ－クルト，セシル
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４３０１，パロ アルト，クーパー ストリート １３５７
審査官 鳥居 敬司
(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１４／００３０８０６（ＵＳ，Ａ１）
米国特許第０５４４３９８３（ＵＳ，Ａ）
特開２０１３－２１５１４１（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１７／００４４４９６（ＵＳ，Ａ１）
特表平１０－５０７６２７（ＪＰ，Ａ）
特表２０１７－５２５７５４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００７／０２０８８０（WO，Ａ１）
特開２００５－０５８１０３（ＪＰ，Ａ）
Journal of immunotherapy，2012年，vol.35, no.3，pp283-292
Scandinavian journal of immunology，2011年，vol.75，pp157-167
Journal of immunotherapy，2009年，vol.32, no.4，pp415-423
Journal of immunotherapy，2008年，vol.31, no.8，pp742-751
Journal of immunotherapy，2003年，vol.26, no.4，pp332-342
Wardell S. et.al.，A Cryopreserved Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Product for LN-144, Generated with an Abbreviated Method Suitable for High Throughput Commercial Manufacturing Exhibits Favorable Quality Attributes For Adoptive Cell Transfer，SITC 32nd annual meeting，P203，2017年11月08日
Cancer immunol. immunother.，2012年，vol.61，pp725-732
Michelle R. Simpson Abelson et al.，The T cell Growth Factor Cocktail IL-2/IL-15/IL-21 Enhances Expansion and Effector Function of Tumor Infiltrating T cells in a Novel Process Developed by Iovance，SITC 32nd annual meeting，P357，2017年11月08日
PLoS ONE，2012年，vol.7, issue 1，pp1-11
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ ５／００－５／２８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）