(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115023270 A
(43)申请公布日 2022.09.06

(21)申请号 202080094469.X

(22)申请日 2020.11.25

(30)优先权数据
62/941,628 2019.11.27 US
63/070,823 2020.08.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/062439 2020.11.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/108727 EN 2021.06.03

(71)申请人 迈斯特治疗公司
地址 美国纽约

(72)发明人 T·J·兰格 J·切卡雷利

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
A61P 35/00(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)
C12N 5/0784(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

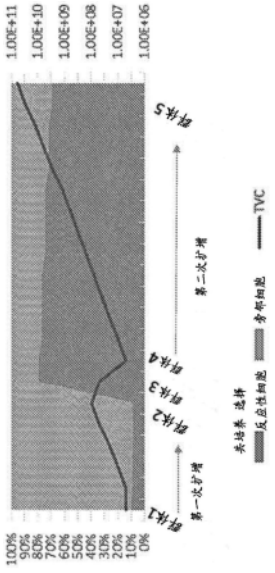
权利要求书13页 说明书167页
序列表7页 附图97页

(54)发明名称

使用调节剂产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法

(57)摘要

本文提供了用于离体扩增包括肿瘤反应性T细胞在内的T细胞的方法以及含有此类T细胞的组合物。还提供了用于使用本公开文本的组合物治疗诸如癌症等的疾病和病症的方法。



CN 115023270 A

1.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

2.根据权利要求1所述的方法,其中步骤(b)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中步骤(c)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中步骤(e)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

5.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自

IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及

(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、细胞凋亡抑制剂和热休克蛋白抑制剂的T细胞佐剂的存在下进行。

8.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第二T细胞群；

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；

(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及

(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物；

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

9.根据权利要求8所述的方法，其中步骤(b)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

10.根据权利要求8或权利要求9所述的方法，其中步骤(c)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

11.根据权利要求8-10中任一项所述的方法，其中步骤(e)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

12.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在免疫抑制阻断剂的存在下进行，以产生第二T细胞群；

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少

一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；

(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及

(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

13.根据权利要求8-12中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

14.根据权利要求8-13中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、细胞凋亡抑制剂和热休克蛋白抑制剂的T细胞佐剂的存在下进行。

15.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第二T细胞群；

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；

(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及

(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物；

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在浓度为或约0.5μM与为或约100μM之间的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

16.根据权利要求15所述的方法，其中步骤(b)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

17.根据权利要求15或权利要求16所述的方法，其中步骤(c)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

18.根据权利要求15-17中任一项所述的方法，其中步骤(e)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

19.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在浓度为或约0.5μM与为或约100μM之间的细胞凋亡抑制剂的存在下进行;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

20.根据权利要求15-19中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

21.根据权利要求15-20中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

22.根据权利要求15-21中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂和热休克蛋白抑制剂的T细胞佐剂的存在下进行。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中重组IL-2的浓度是100IU/mL至6000IU/mL。

26.根据权利要求23-25中任一项所述的方法,其中重组IL-2的浓度是300IU/mL至6000IU/mL、300IU/mL至3000IU/mL或300IU/mL至1000IU/mL,任选地其中重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL或者是为或约1000IU/mL。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-23。

28.根据权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-23。

29.根据权利要求27或权利要求28所述的方法,其中IL-23的浓度是100ng/mL至2000ng/mL,任选地在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间,如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

30.根据权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增在调节细胞因子的

存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-25。

31.根据权利要求1-30中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-25。

32.根据权利要求30或权利要求31所述的方法，其中IL-25的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

33.根据权利要求1-32中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-27。

34.根据权利要求1-33中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-27。

35.根据权利要求33或权利要求34所述的方法，其中IL-27的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

36.根据权利要求1-35中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-35。

37.根据权利要求1-36中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-35。

38.根据权利要求36或权利要求37所述的方法，其中IL-35的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

39.根据权利要求6、8-14和21-38中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

40.根据权利要求6、8-14和21-39中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

41.根据权利要求6、8-14和21-40中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制存在于肿瘤微环境中的免疫抑制因子的活性。

42.根据权利要求41所述的方法，其中所述免疫抑制因子是TGFβ或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)。

43.根据权利要求6、8-14和21-42中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制TGFβ的活性。

44.根据权利要求6、8-14和21-43中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂是针对TGFβ的单克隆抗体，任选地非苏木单抗；针对TGFβ受体的抗体，任选地LY3022859；吡咯-咪唑聚酰胺药物；靶向TGFβ1或TGFβ2mRNA的反义RNA，任选地ISTH0036或ISTH0047；或者ATP-模拟物TβRI激酶抑制剂，任选地加尼舍替。

45.根据权利要求6、8-14和21-42中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂是IDO抑制剂。

46.根据权利要求45所述的方法，其中所述IDO抑制剂是PF-06840003、艾卡哚司他(INCB24360)、INCB23843、纳沃昔莫德(GDC-0919)、BMS-986205、伊马替尼或1-甲基-色氨酸。

47.根据权利要求7和14中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

48.根据权利要求7和14-47中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂的浓度在为或约0.5μM与为或约100μM之间。

49.根据权利要求7和14-48中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂抑制胱天蛋白酶激活或活性。

50.根据权利要求7和14-49中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂抑制胱天蛋白酶2、胱天蛋白酶8、胱天蛋白酶9、胱天蛋白酶10、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶6或胱天蛋白酶7中的一种或多种。

51.根据权利要求7和14-50中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂选自恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390)、NAIP(神经元凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK或其氟甲基酮变体。

52.根据权利要求7和14-51中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是抑制两种或更多种胱天蛋白酶的激活或活性的泛胱天蛋白酶抑制剂。

53.根据权利要求7和14-52中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK、Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK或Z-VDVAD-FMK。

54.根据权利要求7和14-53中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂的浓度在为或约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间，每个都包含端值。

55.根据权利要求7、权利要求14或权利要求22所述的方法，其中所述T细胞佐剂是共刺激激动剂，所述共刺激激动剂是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)激动剂。

56.根据权利要求7、权利要求14、权利要求22或权利要求55所述的方法，其中所述共刺激激动剂是特异性结合TNFRSF成员的抗体或抗原结合片段，或者是包含TNFRSF成员的配体的细胞外结构域或其结合部分的融合蛋白。

57.根据权利要求56所述的方法，其中所述TNFRSF成员选自OX40、4-1BB、GITR和CD27。

58.根据权利要求55-57中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合OX40。

59.根据权利要求55-57或权利要求58所述的方法，其中所述共刺激激动剂是选自以下的抗体或抗原结合片段：他佛利珠单抗、泊加珠单抗、11D4、18D8、Hu119-122、Hu106-222、PF-04518600、GSK3174998、MEDI6469、BMS 986178或9B12，或者是其抗原结合片段。

60.根据权利要求59所述的方法，其中所述共刺激激动剂是他佛利珠单抗。

61.根据权利要求55-57中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合4-1BB。

62.根据权利要求55-57或权利要求书61中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂是乌瑞鲁单抗或乌托鲁单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

63.根据权利要求55-57中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合CD27。

64.根据权利要求55-57或权利要求书63中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂是伐立鲁单抗，或者是前述的抗原结合片段。

65.根据权利要求55-57中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合GITR。

66.根据权利要求55-57或权利要求书65中任一项所述的方法，其中所述共刺激激动剂是MK-1248，或者是前述的抗原结合片段。

67.根据权利要求55-66中任一项所述的方法，其中以如下浓度添加所述共刺激激动剂：在为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间以及在为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间，每个都包含端值。

68.根据权利要求7、权利要求14和权利要求22所述的方法，其中所述T细胞佐剂是检查点抑制剂。

69.根据权利要求68所述的方法，其中所述检查点抑制剂抑制选自以下的免疫检查点的活性：PD-1/PD-L1、CTLA-4、OX40、LAG-3、TIM-3和B7-H3。

70.根据权利要求69所述的方法，其中所述免疫检查点选自PD-1/PD-L1。

71.根据权利要求68、69或70所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗PD-1抗体，任选地其中所述抗体选自派姆单抗、西米普利单抗、纳武单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

72.根据权利要求68-71中任一项所述的方法，其中所述检查点抑制剂是派姆单抗。

73.根据权利要求68、69或70所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗PDL1抗体，任选地其中所述抗体选自阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗和阿特珠单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

74.根据权利要求69所述的方法，其中所述免疫检查点是OX40。

75.根据权利要求68、69或74所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗OX40L抗体，任选地其中所述抗体是奥塞芦单抗或者是其抗原结合片段。

76.根据权利要求69所述的方法，其中所述免疫检查点是CTLA-4。

77.根据权利要求68、69或76所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体，任选地其中所述抗体是伊匹单抗或者是其抗原结合片段。

78.根据权利要求68-77中任一项所述的方法，其中以如下浓度添加所述检查点抑制剂：在为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、在为或约1

μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间以及在为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间，每个都包含端值。

79.根据权利要求7、14、22和55-78中任一项所述的方法，其中在用所述一种或多种重组细胞因子孵育期间连续添加所述T细胞佐剂，其中在所述孵育期间一次或多次补充或更换所述T细胞佐剂。

80.根据权利要求7、14、22和55-78中任一项所述的方法，其中在所述培养的一个或多个步骤期间瞬时添加所述T细胞佐剂，其中在培养的所述一个或多个步骤期间仅添加一次所述T细胞佐剂。

81.根据权利要求7、14、22和55-78中任一项所述的方法，其中在用所述一种或多种重组细胞因子孵育期间瞬时添加所述T细胞佐剂，其中在所述孵育期间仅添加一次所述T细胞佐剂。

82.根据权利要求1-81中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是有核细胞，如树突细胞、单核吞噬细胞、B淋巴细胞、内皮细胞或胸腺上皮细胞。

83.根据权利要求1-82中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。

84.根据权利要求1-83中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞对于所述受试者是自体的，或者对于所述受试者是同种异体的。

85.根据权利要求1-84中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞

86.根据权利要求1-85中任一项所述的方法，其中所述T细胞对于所述受试者是自体的。

87.根据权利要求1-86中任一项所述的方法，其中所述一种或多种肽包含来自所述受试者的肿瘤相关抗原的至少一个新表位。

88.根据权利要求1-87中任一项所述的方法，其中在将来自所述第二T细胞群的细胞与所述APC一起孵育的步骤(c)之前，所述方法进一步包括如下步骤：

(a)通过对来自受试者的健康和肿瘤组织进行外显子组测序来鉴定与一种或多种肿瘤相关抗原相关的体细胞突变；以及

(b)鉴定所述一种或多种肿瘤相关抗原的至少一个新表位。

89.根据权利要求1-88中任一项所述的方法，其中所述MHC分子是I类分子。

90.根据权利要求1-89中任一项所述的方法，其中所述MHC分子是II类分子。

91.根据权利要求1-89中任一项所述的方法，其中所述一种或多种新抗原肽呈递在MHC I类分子和MHC II类分子上。

92.根据权利要求1-91中任一项所述的方法，其中所述T细胞是CD4+细胞。

93.根据权利要求1-92中任一项所述的方法，其中所述T细胞是CD8+细胞。

94.根据权利要求1-93中任一项所述的方法，其中所述T细胞是CD4+细胞和CD8+细胞。

95.根据权利要求1-94中任一项所述的方法，其中所述一种或多种新抗原肽包括单独肽或肽池。

96.根据权利要求1-95中任一项所述的方法，其中已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的APC包括通过转染编码所述一种或多种肽的经体外转录合成的小基因构建体来加载抗原呈递细胞，任选地其中所述一种或多种肽以串联方式在每一侧侧接来自内源蛋白的12

个氨基酸,其中所述经转录的小基因构建体产生单独肽。

97.根据权利要求1-95中任一项所述的方法,其中已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的APC包括肽脉冲,任选地通过电穿孔。

98.根据权利要求97所述的方法,其中所述一种或多种新抗原肽的长度各自单独地为5-30个氨基酸,任选地12-25个氨基酸,任选地为或约25个氨基酸。

99.根据权利要求97或权利要求98所述的方法,其中:

所述一种或多种新抗原肽是肽池,并且用于所述肽脉冲的所述肽池中肽的浓度在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL、0.01μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间;或者

所述一种或多种新抗原肽是单独肽,并且用于所述肽脉冲的单独肽的浓度在为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL或者为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间。

100.根据权利要求97-99中任一项所述的方法,其中所述一种或多种肽中单独肽的浓度平均是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL。

101.根据权利要求97-100中任一项所述的方法,其中所述一种或多种肽中单独肽的浓度平均是为或约0.0001μg/mL至为或约0.001μg/mL。

102.根据权利要求1-101中任一项所述的方法,其中在步骤(c)中,抗原呈递细胞与T细胞的比率在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间、在2.5:1与1:1之间、在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或在1:2.5与1:1之间。

103.根据权利要求1-102中任一项所述的方法,其中在步骤(c)中,抗原呈递细胞与T细胞的比率是或是约1:1。

104.根据权利要求1-103中任一项所述的方法,其中(c)中的所述孵育持续2小时至24小时。

105.根据权利要求1-104中任一项所述的方法,其中(c)中的所述孵育持续为或约6小时。

106.根据权利要求1-100中任一项所述的方法,其中在步骤(d)中将T细胞与APC分离包括从所述共培养物富集对所述一种或多种新抗原肽具有反应性的肿瘤反应性T细胞群,其中富集肿瘤反应性T细胞包括选择对一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。

107.根据权利要求106所述的方法,其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD69、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134(OX40)、CD258、CD256、PD-1、TIM-3和LAG-3。

108.根据权利要求106或权利要求107所述的方法,其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD38、CD39、CD6、CD90、CD134和CD137。

109.根据权利要求106-108中任一项所述的方法,其中所述一种或多种T细胞激活标记物是CD134和/或CD137。

110.根据权利要求106-109中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258和CD256。

111.根据权利要求106-110中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和CD38。

112.根据权利要求106-111中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物包括选自以下的至少两种标记物：CD107a和CD39、CD107a和CD103、CD107a和CD59、CD107a和CD90、CD107a和CD38、CD39和CD103、CD39和CD59、CD39和CD90、CD39和CD38、CD103和CD59、CD103和CD90、CD103和CD38、CD59和CD90、CD59和CD38以及CD90和CD38。

113.根据权利要求110-112中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物进一步包括CD137。

114.根据权利要求113所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物包括选自以下的至少两种标记物：CD107a和CD137、CD38和CD137、CD103和CD137、CD59和CD137、CD90和CD137以及CD38和CD137。

115.根据权利要求108-114中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物进一步包括选自以下的至少一种标记物：PD-1、TIM-3和LAG-3。

116.根据权利要求106-115中任一项所述的方法，其中选择对所述一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞是通过流式细胞术，任选地通过自动化高通量流式细胞术来进行，任选地通过FX500细胞分选仪或Miltenyi Tyto细胞分选仪。

117.根据权利要求116所述的方法，其中通过流式细胞术进行1轮、2轮、3轮或4轮以富集所述样品中的所述肿瘤反应性T细胞。

118.根据权利要求1-117中任一项所述的方法，其中所述方法的步骤中的一个或多个在封闭系统中进行。

119.根据权利要求1-118中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增持续7至21天，任选地7至14天。

120.根据权利要求1-119中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增是在封闭系统中。

121.根据权利要求1-120中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增是在透气性培养器皿中。

122.根据权利要求1-121中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增使用生物反应器来进行。

123.根据权利要求1-122中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增持续7至21天，任选地7至14天。

124.根据权利要求1-123中任一项所述的方法，其中用所述一种或多种第二T细胞刺激剂进行的孵育是在封闭系统中。

125.根据权利要求1-124中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增是在透气性培养器皿中。

126.根据权利要求1-125中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增使用生物反应器来进行。

127.根据权利要求1-126中任一项所述的方法，其中在所述第一次扩增开始后30天内

进行收获。

128.根据权利要求1-127中任一项所述的方法，其中在所述第一次扩增开始后至多30天，任选地在所述第一次扩增开始后7至30天、7至20天、7至14天、7至10天、10至20天、10至14天或14至20天的时间点收获所述细胞。

129.根据权利要求1-128中任一项所述的方法，其中所述受试者展现出癌症。

130.根据权利要求1-129中任一项所述的方法，其中使用包含通过所述方法产生的经扩增的肿瘤反应性T细胞的组合物来治疗所述受试者的癌症。

131.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是上皮癌的肿瘤。

132.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是以下的肿瘤：黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

133.根据权利要求1-130中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是以下的肿瘤：非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

134.根据权利要求1-133中任一项所述的方法，其中所述生物样品是外周血样品、淋巴结样品或肿瘤样品。

135.根据权利要求134所述的方法，其中所述生物样品是外周血样品，并且所述外周血样品是通过抽血或通过单采术来收集，任选地其中所述单采术是白细胞单采术。

136.根据权利要求134所述的方法，其中所述生物样品是淋巴结样品或肿瘤样品，其中所述样品是通过针刺活检，任选地芯针活检或细针抽吸来收集。

137.根据权利要求1-136中任一项所述的方法，其中所述第一T细胞群包含肿瘤浸润淋巴细胞、淋巴的淋巴细胞或外周血单个核细胞。

138.根据权利要求1-134中任一项所述的方法，其中所述生物样品是肿瘤，并且包含T细胞的所述细胞群包含肿瘤浸润淋巴细胞。

139.根据权利要求1-134或权利要求书138中任一项所述的方法，其中所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片。

140.根据权利要求139所述的方法，其中将所述一个或多个肿瘤碎片以约1个肿瘤碎片/2cm^{2}接种，以供用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行孵育。

141.根据权利要求138-140中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是黑色素瘤。

142.根据权利要求1-134或权利要求书138中任一项所述的方法，其中所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是通过对来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片进行匀浆化和/或酶促消化而处理得到的单细胞悬浮液。

143.根据权利要求1-134或权利要求书138中任一项所述的方法，其中所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是通过对来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片进行匀浆化和酶促消化而处理得到的单细胞悬浮液。

144.根据权利要求142或权利要求143所述的方法，其中所述酶促消化是通过用胶原酶，任选地胶原酶IV或胶原酶I/II进行孵育。

145.根据权利要求142-144中任一项所述的方法，其中将所述第一T细胞群以约5x10^{5}至为或约2x10^{6}个总细胞/2cm^{2}接种，以供用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行孵育。

146.根据权利要求138-140和142-145中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是结直肠癌(CRC)。

147.根据权利要求1-146中任一项所述的方法，其中所述方法导致T细胞的倍数扩增或导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增，所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或更多。

148.根据权利要求1-147中任一项所述的方法，其中通过所述方法产生的所述肿瘤反应性细胞组合物能够在抗原特异性刺激后产生浓度大于或大于约30pg/mL，任选地大于或大于约60pg/mL的IFNγ。

149.根据权利要求1-148中任一项所述的方法，所述方法包括用冷冻保护剂配制所述经收获的细胞。

150.一种组合物，所述组合物包含通过根据权利要求1-149中任一项所述的方法产生的肿瘤反应性T细胞。

151.根据权利要求150所述的组合物，其中所述T细胞是CD3+T细胞，或者包括CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。

152.根据权利要求150或权利要求151所述的组合物，其中所述T细胞包括CD4+T细胞和CD8+T细胞，其中CD8+T细胞与CD4+T细胞的比率在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

153.根据权利要求150-152中任一项所述的组合物，其中所述组合物中肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的总T细胞或其活细胞的数量在为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间、在$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间或者在为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间，每个都包含端值。

154.根据权利要求150-153中任一项所述的组合物，所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

155.一种治疗方法，所述治疗方法包括将根据权利要求150-154中任一项的组合物施

用至患有癌症的受试者。

156.根据权利要求155所述的方法，其中所施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

157.根据权利要求155或权利要求156所述的方法，其中治疗有效剂量是$1x10^9$与$10x10^9$之间的T细胞。

158.根据权利要求155-157中任一项所述的方法，其中所述癌症是上皮癌。

159.根据权利要求155-158中任一项所述的方法，其中所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

160.根据权利要求155-159中任一项所述的方法，其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

使用调节剂产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年11月27日提交的标题为“使用调节剂产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法(METHOD OF PRODUCING TUMOR-REACTIVE T CELL COMPOSITION USING MODULATORY AGENTS)”的美国临时申请号62/941,628和2020年8月26日提交的标题为“使用调节剂产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法(METHOD OF PRODUCING TUMOR-REACTIVE T CELL COMPOSITION USING MODULATORY AGENTS)”的美国临时申请号63/070,823的优先权，将其各自的内容通过引用以其整体并入。

通过引用并入序列表

[0002] 本申请是连同电子格式的序列表一起提交的。序列表以2020年11月19日创建的标题为165172000640SeqLis.txt的文件提供，其大小为12,571字节。将电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0003] 本公开文本提供了用于离体扩增包括肿瘤反应性T细胞在内的T细胞的方法以及含有此类T细胞的组合物。还提供了用于使用本公开文本的组合物治疗诸如癌症等的疾病和病症的方法。

背景技术

[0004] 作为肿瘤发生过程的一部分，癌细胞积累许多不同的DNA突变。这些突变可能引起蛋白质编码区中的氨基酸变化。对于待由免疫系统识别的突变，蛋白质需要在细胞内被处理并且呈递用主要组织相容性复合物(MHC)在表面上呈递的突变型肽。新抗原是由MHC复合物呈递的突变型肽，所述突变型肽可以由T细胞经由TCR结合来识别。新抗原是免疫疗法的理想靶标。这些抗原在患上癌症之前在体内不存在并且确实是癌症特有的，不在正常细胞上表达并且不经历脱靶免疫毒性。临床研究已经证明，从经手术切除的肿瘤分离的T细胞具有识别新抗原的TCR，并且在一些情形中，扩增这些新抗原反应性TIL群体并将其再输注到患者体内可以产生显著的临床益处。然而，此类细胞在细胞疗法中的应用的主要障碍是难以获得此类细胞。需要改进的方法来获得和制造用于治疗性用途的含有肿瘤反应性T细胞的细胞组合物。本文提供了满足此类需要的实施方案。

发明内容

[0005] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中任选地，所述一种或多种T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，任选地其中至少一种重组细胞因子是IL-2，以产生第二T细胞群；(c)将来自所述第二T细胞群的T细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种

或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,任选地其中所述一种或多种T细胞刺激剂包括(i)启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂,(ii)启动经由共刺激受体的信号传导的药剂以及(iii)选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35中的一种或多种的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。在所提供的实施方案中,步骤(b)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。在所提供的实施方案中,步骤(c)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。在所提供的实施方案中,步骤(e)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

[0006] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第二T细胞群;(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。在所提供的实施方案中,步骤(b)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。在所提供的实施方案中,步骤(c)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。在所提供的实施方案中,步骤(e)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

[0007] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在选自重组IL-23、重组IL-25、

重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行，以产生第二T细胞群；(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

[0008] 在所提供的任何实施方案中，所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

[0009] 在所提供的任何实施方案中，所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在T细胞佐剂的存在下进行。在一些实施方案中，所述T细胞佐剂是共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、细胞凋亡抑制剂或热休克蛋白抑制剂。

[0010] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第二T细胞群；(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物；其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中，步骤(b)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中，步骤(c)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中，步骤(e)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

[0011] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在免疫抑制阻断剂的存在下进行，以产生第二T细胞群；(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多

种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

[0012] 在所提供的任何实施方案中,所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

[0013] 在所提供的任何实施方案中,所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在T细胞佐剂的存在下进行。在一些实施方案中,所述T细胞佐剂是共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、细胞凋亡抑制剂和热休克蛋白抑制剂。

[0014] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第二T细胞群;(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在浓度为或约0.5μM与为或约100μM之间的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,步骤(b)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,步骤(c)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,步骤(e)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

[0015] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在浓度为或约0.5μM与为或约100μM之间的细胞凋亡抑制剂的存在下进行;(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主

要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

[0016] 在所提供的任何实施方案中，所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

[0017] 在所提供的任何实施方案中，步骤所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

[0018] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在T细胞佐剂的存在下进行。在一些实施方案中，所述T细胞佐剂是共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂和热休克蛋白抑制剂。

[0019] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。在一些实施方案中，所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。在一些实施方案中，重组IL-2的浓度是100IU/mL至6000IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-2的浓度是300IU/mL至6000IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-2的浓度是300IU/mL至3000IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-2的浓度是300IU/mL至1000IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-2的浓度是为或约1000IU/mL。在一些实施方案中，在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)期间添加一次或多次所述特定浓度的所述重组IL-2。

[0020] 在一些实施方案中，所述第一次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-15。在一些实施方案中，所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-15。在一些实施方案中，重组IL-15的浓度是10IU/mL至500IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-15的浓度是10IU/mL至500IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-15的浓度是10IU/mL至400IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-15的浓度是10IU/mL至200IU/mL。在一些实施方案中，重组IL-15的浓度是为或约180IU/mL。在一些实施方案中，在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)期间添加一次或多次所述特定浓度的所述重组IL-15。

[0021] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述调节细胞因子是或包括IL-23。在一些实施方案中，所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-23。在一些实施方案中，所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-23。在一些实施方案中，IL-23的浓度是100ng/mL至2000ng/mL。在一些实施方案中，IL-23的浓度在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，IL-23的浓度是为或约250ng/mL。在一些实施方案中，IL-23的浓度是为或约500ng/mL。在一些实施方案中，浓度是为或约1000ng/mL。在一些实施方案中，在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)期间添加一次或多次所述特定浓度的所述重组IL-23。

[0022] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述调节细胞因子是或包括IL-25。在一些实施方案中,所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-25。在一些实施方案中,所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-25。在一些实施方案中,IL-25的浓度是100ng/mL至2000ng/mL。在一些实施方案中,IL-25的浓度在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中,IL-25的浓度是为或约250ng/mL。在一些实施方案中,IL-25的浓度是为或约500ng/mL。在一些实施方案中,IL-25的浓度是或为或约1000ng/mL。在一些实施方案中,在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)期间添加一次或多次所述特定浓度的所述重组IL-25。

[0023] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述调节细胞因子是或包括IL-27。在一些实施方案中,所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-27。在一些实施方案中,所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-27。在一些实施方案中,IL-27的浓度是100ng/mL至2000ng/mL。在一些实施方案中,IL-27的浓度在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中,IL-27的浓度是为或约250ng/mL。在一些实施方案中,IL-27的浓度是为或约500ng/mL。在一些实施方案中,IL-27的浓度是为或约1000ng/mL。在一些实施方案中,在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)期间添加一次或多次所述特定浓度的所述重组IL-27。

[0024] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述调节细胞因子是或包括IL-35。在一些实施方案中,所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-35。在一些实施方案中,所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行,所述调节细胞因子是重组IL-35。在一些实施方案中,IL-35的浓度是100ng/mL至2000ng/mL。在一些实施方案中,IL-35的浓度在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中,IL-35的浓度是为或约250ng/mL。在一些实施方案中,IL-35的浓度是为或约500ng/mL。在一些实施方案中,IL-35的浓度是为或约1000ng/mL。在一些实施方案中,在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)期间添加一次或多次所述特定浓度的所述重组IL-27。

[0025] 在所提供的任何实施方案中,所述第一次扩增中的所述T细胞刺激剂可以包括启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂和/或启动经由共刺激受体的信号传导的药剂。在所提供的任何实施方案中,所述第二次扩增中的所述T细胞刺激剂可以包括启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂和/或启动经由共刺激受体的信号传导的药剂。

[0026] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,启动TCR/CD3细胞内信号传导的所述药剂是抗CD3抗体(例如OKT3)。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述T细胞共刺激受体是CD28。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,启动经由T细胞共刺激受体的信号传导的所述药剂包含外周血单个核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,所述PBMC是非分裂的或经辐照的PBMC。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,启动经由共刺激受体的信号传导的所述药剂是抗CD28抗体。

[0027] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述第一次扩增中的所述培养是用各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体;和/或所述第二次扩增中的所述培养是用各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体。

[0028] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述生物样品是经切除的肿瘤。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,获得所述第一T细胞群包括使所述经切除的肿

瘤破碎成一个或多个碎片。

[0029] 本文提供了一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：(a)使来自受试者的经切除的肿瘤破碎成一个或多个碎片，所述一个或多个碎片包含第一T细胞群；(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中任选地，所述一种或多种T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，任选地其中至少一种重组细胞因子是IL-2，以产生第一经扩增的T细胞群；(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽各自包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集所述肿瘤反应性T细胞的第四群体；(e)通过用可溶性抗CD3抗体(例如OKT3)、可溶性抗CD28抗体以及选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，以产生第五T细胞群；以及(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物；其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35中的一种或多种的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。

[0030] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述碎片是0.5mm至3mm的碎片。在一些实施方案中，所述碎片是1mm至2mm的碎片。

[0031] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增和/或所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增和/或所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-7和重组IL-15。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增和/或所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2、重组IL-7和重组IL-15。

[0032] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35中的一种或多种的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增在重组IL-23的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增在重组IL-25的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增在重组IL-27的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增在重组IL-35的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

[0033] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第二次扩增在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35中的一种或多种的调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第二次扩增在重组IL-23的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第二次扩增在重组IL-25的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第二次扩增在重组IL-27的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第二次扩增在重组IL-35的存在下进行。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第二次扩增在免疫

抑制阻断剂的存在下进行。

[0034] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,在用所述一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)进行孵育期间连续添加所述调节细胞因子(例如重组IL-23、IL-25、IL-27或IL-35),其中在所述孵育期间一次或多次补充或更换所述调节细胞因子。在一些实施方案中,在所述培养的一个或多个步骤期间瞬时添加所述调节细胞因子(例如重组IL-23、IL-25、IL-27或IL-35),其中在培养的所述一个或多个步骤期间仅添加一次所述调节细胞因子。在一些实施方案中,在用所述一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)进行孵育期间瞬时添加所述调节细胞因子(例如重组IL-23、IL-25、IL-27或IL-35),其中在所述孵育期间仅添加一次所述调节细胞因子。

[0035] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂降低或抑制存在于肿瘤微环境中的免疫抑制因子的活性。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制因子是IL-27、IL-35、TGFβ或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是针对IL-27或其亚基的单克隆抗体。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂降低或抑制IL-35的活性。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是针对IL-27或其亚基的单克隆抗体。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述单克隆抗体结合或识别IL-27β(EBI3)。

[0036] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂降低或抑制TGFβ的活性。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是针对TGFβ的单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗体是非苏木单抗(fresolimumab)。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是针对TGFβ受体的抗体。在一些实施方案中,所述抗体是LY3022859。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是吡咯-咪唑聚酰胺药物。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是靶向TGFβ1或TGFβ2mRNA的反义RNA。在一些实施方案中,所述药剂是ISTH0036或ISTH0047。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是ATP-模拟物TβRI激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述药剂是加尼舍替(galunisertib)。

[0037] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述免疫抑制阻断剂是IDO抑制剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述IDO抑制剂是PF-06840003、艾卡哚司他(INCB24360)、INCB23843、纳沃昔莫德(navoximod)(GDC-0919)、BMS-986205、伊马替尼或1-甲基-色氨酸。

[0038] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,在用所述一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)进行孵育期间连续添加所述免疫抑制阻断剂,其中在所述孵育期间一次或多次补充或更换所述免疫抑制阻断剂。在一些实施方案中,在所述培养的一个或多个步骤期间瞬时添加所述免疫抑制阻断剂,其中在培养的所述一个或多个步骤期间仅添加一次所述免疫抑制阻断剂。在一些实施方案中,在用所述一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)进行孵育期间瞬时添加所述免疫抑制阻断剂,其中在所述孵育期间仅添加一次所述免疫抑制阻断剂。

[0039] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一

个或多个在细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂的浓度在为或约0.5μM与为或约100μM之间。在一些实施方案中，在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)或所述孵育期间添加一次或多次所述特定浓度的所述细胞凋亡抑制剂。

[0040] 在一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂抑制胱天蛋白酶激活或活性。在一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂抑制胱天蛋白酶2、胱天蛋白酶8、胱天蛋白酶9、胱天蛋白酶10、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶6或胱天蛋白酶7中的一种或多种。在一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂选自恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390)、NAIP(神经元凋亡抑制蛋白；BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2；分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP；BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon；BIRC6)、生存蛋白(livin)(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP；BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK或其氟甲基酮变体。在一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是抑制两种或更多种胱天蛋白酶的激活或活性的泛胱天蛋白酶抑制剂。在一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK、Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK或Z-VDVAD-FMK。

[0041] 在任何实施方案的一些实施方案中，所述细胞凋亡抑制剂的浓度在为或约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间，每个都包含端值。在一些实施方案中，在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)或所述孵育期间添加一次或多次所述特定浓度的所述细胞凋亡抑制剂。

[0042] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，在用所述一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)进行孵育期间连续添加所述细胞凋亡抑制剂，其中在所述孵育期间一次或多次补充或更换所述细胞凋亡抑制剂。在一些实施方案中，在所述培养的一个或多个步骤期间瞬时添加所述细胞凋亡抑制剂，其中在培养的所述一个或多个步骤期间仅添加一次所述细胞凋亡抑制剂。在一些实施方案中，在用所述一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)进行孵育期间瞬时添加所述细胞凋亡抑制剂，其中在所述孵育期间仅添加一次所述细胞凋亡抑制剂。

[0043] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述T细胞佐剂是共刺激激动剂，所述共刺激激动剂是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)激动剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在T细胞佐剂的存在下进行，所述T细胞佐剂是共刺激激动剂，所述共刺激激动剂是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)激动剂。在一些实施方案中，所述共刺激激动剂是特异性结合TNFRSF成员的抗体或抗原结合片段，或者是包含TNFRSF成员的配体的细胞外结构域或其结合部分的融合蛋白。在一些实施方案中，所述TNFRSF成员选自OX40、4-1BB、GITR和CD27。在一些实施方案中，以如下浓

度添加所述共刺激激动剂:在为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间以及在为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)或所述孵育期间添加一次或多次所述特定浓度的所述共刺激激动剂。

[0044] 在一些实施方案中,所述共刺激激动剂特异性结合OX40。在一些实施方案中,所述共刺激激动剂是选自以下的抗体或抗原结合片段:他佛利珠单抗(Tavolixizumab)、泊加珠单抗(Pogalizumab)、11D4、18D8、Hu119-122、Hu106-222、PF-04518600、GSK3174998、MEDI6469、BMS 986178或9B12,或者是其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述共刺激激动剂是他佛利珠单抗。

[0045] 在一些实施方案中,所述共刺激激动剂特异性结合4-1BB。在一些实施方案中,所述共刺激激动剂是乌瑞鲁单抗(urelumab)或乌托鲁单抗(Utomilumab),或者是前述任一种的抗原结合片段。

[0046] 在一些实施方案中,所述共刺激激动剂特异性结合CD27。在一些实施方案中,所述共刺激激动剂是伐立鲁单抗(Varlilumab),或者是前述的抗原结合片段。

[0047] 在一些实施方案中,所述共刺激激动剂特异性结合GITR。在一些实施方案中,所述共刺激激动剂是MK-1248,或者是前述的抗原结合片段。

[0048] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述T细胞佐剂是检查点抑制剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述第一次扩增(例如步骤(b))、所述第二T细胞群与APC的所述孵育(例如步骤(c))或所述第二次扩增(例如步骤(e))中的一个或多个在T细胞佐剂的存在下进行,所述T细胞佐剂是检查点抑制剂。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂抑制选自以下的免疫检查点的活性:PD-1/PD-L1、CTLA-4、OX40、LAG-3、TIM-3和B7-H3。在一些实施方案中,所述免疫检查点是PD-1/PD-L1。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是抗PD-1抗体。在一些实施方案中,所述抗PD-1抗体选自派姆单抗、西米普利单抗(cemiplimab)、纳武单抗,或者是前述任一种的抗原结合片段。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是派姆单抗。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是抗PDL1抗体。在一些实施方案中,所述抗PDL1抗体选自阿维鲁单抗(avelumab)、德瓦鲁单抗和阿特珠单抗,或者是前述任一种的抗原结合片段。在一些实施方案中,所述免疫检查点是OX40。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是抗OX40L抗体。在一些实施方案中,所述抗OX40L抗体是奥塞芦单抗(Oxelumab)或者是其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述免疫检查点是CTLA-4。在一些实施方案中,所述检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,所述抗CTLA-4抗体是伊匹单抗或者是其抗原结合片段。在一些实施方案中,以如下浓度添加所述检查点抑制剂:在为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间以及在为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,

在所述扩增培养(第一次扩增或第二次扩增)或所述孵育期间添加一次或多次所述特定浓度的所述检查点抑制剂。

[0049] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,在用所述一种或多种重组细胞因子进行孵育期间连续添加所述T细胞佐剂,其中在所述孵育期间一次或多次补充或更换所述T细胞佐剂。在一些实施方案中,在所述培养的一个或多个步骤期间瞬时添加所述T细胞佐剂,其中在培养的所述一个或多个步骤期间仅添加一次所述T细胞佐剂。在一些实施方案中,在用所述一种或多种重组细胞因子进行孵育期间瞬时添加所述T细胞佐剂,其中在所述孵育期间仅添加一次所述T细胞佐剂。

[0050] 在一些实施方案中,所述抗原呈递细胞是有核细胞,如树突细胞、单核吞噬细胞、B淋巴细胞、内皮细胞或胸腺上皮细胞。在一些实施方案中,所述抗原呈递细胞是树突细胞。在一些实施方案中,所述抗原呈递细胞对于所述受试者是自体的,或者对于所述受试者是同种异体的。在一些实施方案中,所述抗原呈递细胞

[0051] 在一些实施方案中,所述T细胞是CD4+细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD8+细胞。在一些实施方案中,所述T细胞是CD4+细胞和CD8+细胞。所述T细胞对于所述受试者是自体的。

[0052] 在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽包含来自所述受试者的肿瘤相关抗原的至少一个新表位。在一些实施方案中,在将来自所述第二T细胞群的细胞与所述APC一起孵育的步骤(c)之前,所述方法进一步包括如下步骤:(a)通过对来自受试者的健康和肿瘤组织进行外显子组测序来鉴定与一种或多种肿瘤相关抗原相关的体细胞突变;以及(b)鉴定所述一种或多种肿瘤相关抗原的至少一个新表位。在一些实施方案中,在所述孵育期间,所述一种或多种新抗原肽呈递在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上。在一些实施方案中,所述MHC分子是I类分子。在一些实施方案中,所述MHC分子是II类分子。在一些实施方案中,所述一种或多种肽经由MHC I类和II类两种分子呈递在所述APC上。

[0053] 在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽包括单独肽或肽池。

[0054] 在所提供的任何方法中的一些方法中,在培养前,所述方法包括产生新抗原肽的突变文库,并且通过在于所述MHC的表面上呈递所述肽中的一种或多种的条件下用所述肽突变文库脉冲所述APC来使所述APC接触或暴露于所述至少一种新抗原肽。在一些实施方案中,所述肽的长度为8至32个氨基酸,长度为8至24个氨基酸,长度为8至18个氨基酸,长度为8至10个氨基酸,长度为10至32个氨基酸,长度为10至24个氨基酸,长度为10至18个氨基酸,长度为18至32个氨基酸,长度为18至24个氨基酸或者长度为24至32个氨基酸。在一些实施方案中,所述肽是为或约9聚体。

[0055] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,使APC暴露于或接触所述至少一种新抗原肽包括:产生编码包含所述肿瘤特有的突变的所述至少一种新抗原肽的DNA;在体外将所述DNA转录成RNA;在于主要组织相容性复合物(MHC)的表面上呈递所述新抗原肽中的一种或多种的条件下将所述经体外转录的RNA引入所述APC中。在一些实施方案中,所述MHC是MHC II类。在一些实施方案中,所述DNA是小基因构建体。

[0056] 在一些实施方案中,已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的APC包括通过转染编码所述一种或多种肽的经体外转录合成的小基因构建体来加载抗原呈递细胞。在一些实施方案中,所述一种或多种肽以串联方式在每一侧侧接来自内源蛋白的12个氨基酸,其中

所述经转录的小基因构建体产生单独肽。

[0057] 在一些实施方案中,已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的APC包括肽脉冲。在一些实施方案中,所述肽脉冲是通过电穿孔。

[0058] 在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽的长度各自单独地为5-30个氨基酸,如12-25个氨基酸,例如为或约25个氨基酸。

[0059] 在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽是肽池,并且用于所述肽脉冲的所述肽池中肽的浓度在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL、0.01μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽是单独肽,并且用于所述肽脉冲的单独肽的浓度在为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL或者为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间。在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽中单独肽的浓度平均是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL。在一些实施方案中,所述一种或多种新抗原肽中单独肽的浓度平均是为或约0.0001μg/mL至为或约0.001μg/mL。

[0060] 在一些实施方案中,所述T细胞和所述APC的孵育(例如在步骤(c)中),抗原呈递细胞与T细胞的比率在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间、在2.5:1与1:1之间、在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或在1:2.5与1:1之间。抗原呈递细胞与T细胞的比率是或是约1:1。在一些实施方案中,所述孵育持续2小时至24小时。在一些实施方案中,所述孵育持续为或约6小时。

[0061] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述第一次扩增中的所述培养进行7至10天。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述APC是单核细胞源树突细胞。在一些实施方案中,所述APC对于所述受试者是自体的。

[0062] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述第二T细胞群与所述APC/新抗原肽的孵育持续长达96小时、为或约12小时、为或约18小时、为或约24小时或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中,所述孵育持续6至48小时。在一些实施方案中,所述孵育持续24至48小时。在一些实施方案中,所述孵育持续为或约6小时。

[0063] 在一些实施方案中,将T细胞与APC分离(例如在步骤(d)中)包括从所述共培养物富集对所述一种或多种新抗原肽具有反应性的肿瘤反应性T细胞群,其中富集肿瘤反应性T细胞包括选择对一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,在所述第三群体中将T细胞与所述APC分离以产生富集肿瘤反应性T细胞的所述第四群体包括选择对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述一种或多种激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134(OX40)、CD258、CD256、PD-1、TIM-3和LAG-3。在任何此类实施方案的一些实施方案中,所述一种或多种激活标记物是CD137(4-1BB)和CD134(OX40)。

[0064] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD38、CD39、CD6、CD90、CD134和CD137。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物是CD134和/或CD137。

[0065] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258和CD256。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和CD38。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物包括选自以下的至少两种标记物:CD107a和CD39、CD107a和CD103、CD107a和CD59、CD107a和CD90、CD107a和CD38、CD39和CD103、CD39和CD59、CD39和CD90、CD39和CD38、CD103和CD59、CD103和CD90、CD103和CD38、CD59和CD90、CD59和CD38以及CD90和CD38。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物进一步包括CD137。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物包括选自以下的至少两种标记物:CD107a和CD137、CD38和CD137、CD103和CD137、CD59和CD137、CD90和CD137以及CD38和CD137。

[0066] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞激活标记物进一步包括选自以下的至少一种标记物:PD-1、TIM-3和LAG-3。

[0067] 在一些实施方案中,选择对所述一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞是通过流式细胞术,任选地通过自动化高通量流式细胞术来进行。在一些实施方案中,所述流式细胞术是通过FX500细胞分选仪或Miltenyi Tyto细胞分选仪。在一些实施方案中,通过流式细胞术进行选择包括通过流式细胞术进行1轮、2轮、3轮或4轮以富集所述样品中的所述肿瘤反应性T细胞。

[0068] 在一些实施方案中,所述方法的步骤中的一个或多个在封闭系统中进行。

[0069] 在一些实施方案中,所述第一次扩增持续7至21天。在一些实施方案中,所述第一次扩增持续7至14天。在一些实施方案中,所述第一次扩增是在封闭系统中。在一些实施方案中,所述第一次扩增是在透气性培养器皿中。在一些实施方案中,所述第一次扩增使用生物反应器来进行。

[0070] 在一些实施方案中,所述第二次扩增持续7至21天。在一些实施方案中,所述第二次扩增持续7至14天。在一些实施方案中,通过用所述一种或多种第二T细胞刺激剂进行孵育而进行的所述第二次扩增是在封闭系统中。在一些实施方案中,所述第二次扩增是在透气性培养器皿中。在一些实施方案中,所述第二次扩增使用生物反应器来进行。

[0071] 在一些实施方案中,所提供的任何方法的收获在所述第一次扩增开始后30天内进行。在一些实施方案中,在所述第一次扩增开始后至多30天的时间点收获所述细胞。在一些实施方案中,在所述第一次扩增中的所述培养开始后7至30天、7至20天、7至14天、7至10天、10至20天、10至14天或14至20天的时间点收获所述细胞。

[0072] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述第二次扩增中的所述培养持续7至10天。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,进行所述第二次扩增中的所述培养直至达到如下阈值细胞量:为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总

活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞或者为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间的总细胞或总活细胞，每个都包含端值。

[0073] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述受试者展现出疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病或病症是癌症。在一些实施方案中，使用包含通过所述方法产生的经扩增的肿瘤反应性T细胞的组合物来治疗所述受试者的癌症。

[0074] 在所提供的任何实施方案中，所述肿瘤是上皮癌的肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤是以下的肿瘤：黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。在一些实施方案中，所述肿瘤是以下的肿瘤：非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

[0075] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述生物样品是外周血样品、淋巴结样品或肿瘤样品。在一些实施方案中，所述生物样品是外周血样品，并且所述外周血样品是通过抽血或通过单采术来收集。在一些实施方案中，所述单采术是白细胞单采术。在一些实施方案中，所述生物样品是淋巴结样品或肿瘤样品，其中所述样品是通过针刺活检，如芯针活检或细针抽吸来收集。

[0076] 在一些实施方案中，所述第一T细胞群包含肿瘤浸润淋巴细胞、淋巴的淋巴细胞或外周血单个核细胞。在一些实施方案中，所述生物样品是肿瘤，并且包含T细胞的所述细胞群包含肿瘤浸润淋巴细胞。

[0077] 在一些实施方案中，所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片。在一些实施方案中，将所述一个或多个肿瘤碎片以约1个肿瘤碎片/$2cm^2$接种，以供用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行孵育。在一些实施方案中，所述肿瘤是黑色素瘤。

[0078] 在一些实施方案中，所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是通过对来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片进行匀浆化和/或酶促消化而处理得到的

单细胞悬浮液。在一些实施方案中，所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是通过对来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片进行匀浆化和酶促消化而处理得到的单细胞悬浮液。在一些实施方案中，所述酶促消化是通过用胶原酶进行孵育。在一些实施方案中，所述胶原酶是胶原酶IV或胶原酶I/II。在一些实施方案中，将所述第一T细胞群以约$5x10^5$至为或约$2x10^6$个总细胞/2cm2接种，以供用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行孵育。在一些实施方案中，所述肿瘤是结直肠癌(CRC)。

[0079] 在所提供的任何方法中的一些方法中，所述方法导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增，所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或者更多倍。

[0080] 在一些实施方案中，通过所述方法产生的所述肿瘤反应性细胞组合物能够在抗原特异性刺激后产生浓度大于或大于约30pg/mL，如大于或大于约60pg/mL的IFNγ。

[0081] 在所提供的任何方法中的一些方法中，所述方法进一步包括配制所述经收获的细胞用于施用至受试者。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述配制包括冷冻保存，其中在施用至所述受试者之前将所述细胞解冻。在一些实施方案中，所述方法包括用冷冻保护剂配制所述经收获的细胞。

[0082] 本文提供了一种通过所提供的任何方法产生的组合物。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述组合物包含冷冻保护剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述组合物是无菌的。

[0083] 在一些实施方案中，所述组合物含有T细胞，所述T细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，所述T细胞包括CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。在一些实施方案中，所述组合物中的所述T细胞包括CD4+T细胞和CD8+T细胞，其中CD8+T细胞与CD4+T细胞的比率在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

[0084] 在一些实施方案中，所述组合物中肿瘤反应性T细胞或对所述T细胞激活标记物呈表面阳性的总T细胞或其活细胞的数量在为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间、在$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$

之间、在为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间或者在为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间，每个都包含端值。

[0085] 本文提供了一种治疗方法，所述治疗方法包括将所提供的任何组合物施用至患有癌症的受试者。在任何实施方案的一些实施方案中，所述经施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

[0086] 在任何实施方案的一些实施方案中，将所述组合物以治疗有效剂量的肿瘤反应性T细胞施用。在一些实施方案中，所述治疗有效剂量是$1x10^9$与$10x10^9$之间的T细胞。

[0087] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述癌症是上皮癌。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述癌症是乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌以及皮肤癌如鳞状细胞癌和基底细胞癌、前列腺癌或肾细胞癌。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述癌症是黑色素瘤。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述癌症是食道癌、胃(stomach/gastric)癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌、粘膜相关淋巴组织的癌症(MALT淋巴瘤)、胆管树的癌症、结直肠癌(包括结肠癌、直肠癌或两者)、肛门癌或胃肠类癌瘤。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌。在一些实施方案中，所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

附图说明

[0088] 图1A描绘了根据所提供的方法制造T细胞治疗性组合物的示例性过程的示意图。在示例性过程中，从患者获得肿瘤样品用于鉴定和产生肽，用于在与从同一受试者获得的自体T细胞的共培养方法中使用。在一些情形中，将来自患者的例如含有肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或外周血淋巴细胞(PBL)的T细胞群在扩增细胞的条件下进行刺激，之后将其与已经接触或暴露于用于在主要组织相容性复合物上呈递的肽新表位的抗原呈递细胞共培养。在抗原呈递细胞在主要组织相容性复合物的背景下呈递肽的条件下共培养后，可以根据所提供的方法选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物(例如CD70a)呈表面阳性的T细胞，并且在用于扩增的条件下培养，如用一种或多种T细胞刺激剂(例如IL-2和/或抗CD3/抗CD28)进行孵育。所述步骤可以包括根据所提供的方法用调节细胞因子(例如IL-23、IL-25、IL-27和/或IL-35)和/或免疫抑制阻断剂进行孵育。培养可以在一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的存在下进行以支持细胞的增殖和扩增。所述步骤还可以包括根据所提供的方法用T细胞佐剂进行孵育，所述T细胞佐剂是共刺激激动剂(例如OX40或4-1BB激动剂)或细胞凋亡抑制剂(例如Fas/Fas配体抑制剂或胱天蛋白酶抑制剂)。所述过程可以在含有营养素的无血清培养基的存在下进行。一个或多个或者所有步骤可以在封闭系统中进行，如不使细胞暴露于环境。在达到细胞的治疗剂量或阈值数量后，可以收获并配制细胞，在一些情形中进行浓缩或冷冻保存，并且用于如通过输注施用至受试者。

[0089] 图1B描绘了根据所提供的方法制造T细胞治疗性组合物的示例性过程的示意图。

在示例性过程中，使用含有T细胞的生物样品作为所述方法的细胞来源。生物样品可以包括肿瘤浸润淋巴细胞、外周血单个核细胞(例如单采术)或淋巴来源的淋巴细胞。可以根据所提供的方法直接从样品选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物(例如CD70a)呈表面阳性的T细胞，并且在用于扩增的条件下培养，包括根据所提供的方法用调节细胞因子(例如IL-23、IL-25、IL-27和/或IL-35)和/或免疫抑制阻断剂进行孵育，以及用一种或多种T细胞刺激剂(例如IL-2和/或抗CD3/抗CD28)进行孵育。培养可以在一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的存在下进行以支持细胞的增殖和扩增。所述步骤还可以包括根据所提供的方法用T细胞佐剂进行孵育，所述T细胞佐剂是共刺激激动剂(例如OX40或4-1BB激动剂)或细胞凋亡抑制剂(例如Fas/Fas配体抑制剂或胱天蛋白酶抑制剂)。所述过程可以在含有营养素的无血清培养基的存在下进行。一个或多个或者所有步骤可以在封闭系统中进行，如不使细胞暴露于环境。在达到细胞的治疗剂量或阈值数量后，可以收获并配制细胞，在一些情形中进行浓缩或冷冻保存，并且用于如通过输注施用至受试者。图1C描绘了产生患者特有的肿瘤源浸润T细胞群的完整过程流程图。

[0090] 图2A描绘了典型TIL扩增过程中的示例性动力学和T细胞新抗原反应性，所述典型TIL扩增过程涉及具有第一次初始扩增和第二次快速扩增的T细胞大量(bulk)扩增，其中反应性在整个过程中(包括在最终产物内)保持较低。图2B进一步描绘了如本文所提供的TIL扩增过程的示例性动力学，所述TIL扩增过程涉及第一次初始扩增，之后通过与呈递新抗原肽的抗原呈递细胞共培养来富集肿瘤反应性T细胞，针对T细胞激活(上调)标记物来选择肿瘤反应性细胞，以及经富集的反应性细胞的第二次扩增。

[0091] 图3A描绘了使用碎片培养、用酶匀浆化和不用酶匀浆化从患者源CRC肿瘤组织产生总存活群体1细胞。用酶和不用酶消化都得到比从碎片培养更多的总细胞。这些细胞的活力百分比示于图3B中。从碎片产生并用酶消化的培养物的活力高于使用不用酶匀浆化得到的那些培养物的活力。

[0092] 图4A描绘了使用碎片培养或者用酶或不用酶匀浆化从患者源黑色素瘤肿瘤组织产生群体1细胞。碎片培养得到比从单细胞悬浮液起始的培养更多的总细胞。这些细胞的活力百分比示于图4B中。从碎片产生的群体比来自单细胞悬浮液的细胞显示出更高的活力。

[0093] 图5描绘了在常规6孔培养板或24孔透气性培养板中源自原发性CRC肿瘤的群体2细胞的生长曲线(图5A)以及扩增倍数(图5B)。图5还描绘了源自原发性CRC肿瘤的群体2细胞的总细胞数(图5C)以及扩增倍数(图5D)，按细胞提取方法(碎片或单细胞悬浮培养)进行对比。

[0094] 图6描绘了在6孔培养板或24孔透气性培养板中源自原发性黑色素瘤肿瘤的群体2细胞的生长曲线(图6A)以及扩增倍数(图6B)。

[0095] 图7描绘了使用无血清OpTmizer或补充有5％人血清的RPMI培养基，源自原发性CRC肿瘤的群体2细胞的总细胞数(图7A)以及扩增倍数(图7B)。类似地，图8描绘了使用无血清OpTmizer或补充有5％人血清的RPMI培养基，源自原发性黑色素瘤肿瘤的群体2细胞的总细胞数(图8A)以及扩增倍数(图8B)。

[0096] 图9描绘了源自CRC肿瘤并在补充有低浓度(300IU/mL)或高浓度(6000IU/mL)重组人IL-2的培养基中培养的群体2细胞的总细胞数(图9A)以及扩增倍数(图9B)。黑色素瘤肿瘤源细胞的这些数据类似地描绘于图10A-B中。没有观察到高浓度的IL-2是细胞扩增所必

需的。

[0097] 图11A描绘了来自未经刺激或用一种抗CD3单克隆抗体OKT3刺激的黑色素瘤源细胞培养物的群体2总细胞数，并且图11B描绘了扩增倍数，观察到两种情况在很大程度上是类似的。

[0098] 图12A-C描绘了在用OKT3激活后0与48小时之间，CD8+T细胞上的激活标记物CD38和CD39(图12A)、CD134和CD137(图12B)以及CD69和CD90(图12C)的上调百分比。

[0099] 图13A-C描绘了在用OKT3激活后0与48小时之间，CD4+T细胞上的激活标记物CD38和CD39(图13A)、CD134和CD137(图13B)以及CD69和CD90(图13C)的上调百分比。

[0100] 图14描绘了在第0天从CRC肿瘤产生的单细胞悬浮培养物中所选示例性标记物的表达。

[0101] 图15A-E描绘了作为占群体1细胞百分比的CD3+细胞纯度。图15A描绘了在不用酶、用1mg/ml(低)酶和5mg/ml(高)酶匀浆化后，来自CRC肿瘤的第0天SCS的细胞的纯度。黑色素瘤源培养物的这些数据类似地示于图15B中。图15C描绘了来自在存在或不存在OKT3刺激的情况下培养的碎片的第0天(基线SCS)和第6天的CD3+群体1细胞的纯度。图15D示出了使用在补充有6000IU/mL(高)或300IU/mL(低)重组IL-2的培养基中培养的碎片在第11天来自CRC供体的CD3+细胞的相对纯度。图15E描绘了来自在无血清OpTmizer培养基或RPMI中在OKT3刺激的情况下和/或用高或低浓度IL-2的情况下培养的碎片的群体1细胞(第9天)。这些观察结果支持，来自CRC患者的肿瘤活检的SCS可以比从肿瘤碎片培养获得的细胞更能够提供更大数量的T细胞用于扩增。

[0102] 图16描绘了源自黑色素瘤患者的作为在高和低IL-2浓度下以及用含有血清的RPMI培养基或无血清OpTmizer的情况下第9天的碎片培养物的CD3+群体1细胞的纯度。

[0103] 图17A描绘了在与加载有浓度为0.1ng/mL至20ng/mL的肽的树突细胞共培养后产生群体3细胞。图17B描绘了在同一实验中相对于与未经加载的树突细胞共培养的T细胞的增加倍数(图17B)。

[0104] 图18A比较了用一种肽或两种肽进行的刺激，报告为41BB/OX40表达％。图18B描绘了用一种肽或两种肽进行的刺激，报告为相对于未经激活的T细胞的增加倍数。

[0105] 图19A比较了T细胞与树突细胞的两种比率1:1和1:2，报告为41BB/OX40表达％。图19B比较了T细胞与树突细胞的两种比率1:1和1:2，报告为相对于未经激活的T细胞的增加倍数。

[0106] 图20A描绘了在将来源自三名健康供体的外周血的T细胞与自体新抗原肽共培养与分选之前和之后的新抗原反应性TCR百分比。图20B描绘了CD8+细胞共培养与分选之前和之后的平均I类反应性。

[0107] 图21A和图21B描绘了来自使用Sony FX500的细胞分选的回收，作为两个独立运行的总细胞输入和输出(图21A)以及回收百分比(图21B)。

[0108] 图22描绘了来自使用Sony FX500的细胞分选的CD4+群体的纯度和门控。结果证明，在选择和分选对上调标记物呈阳性的细胞后，细胞的回收率较高。

[0109] 图23A-图23C描绘了分选后肿瘤浸润T淋巴细胞的扩增。图23A描绘了在与或不与加载有野生型肽、肿瘤相关肽或不加载肽的树突细胞共培养后，源自群体4细胞的群体5细胞的总细胞数，并且图23B描绘了扩增倍数。在群体4细胞扩增为群体5细胞后，分选后在不

同的细胞回收数情况下的预计细胞数示于图23C中。

[0110] 图24A描绘了在用来自卵巢癌患者的突变型(mut)肽或正常野生型(WT)肽刺激后，在大量共培养物、来自大量共培养细胞(经富集)的按照CD137和/或CD134表达的阳性分选(经选择)群体或来自大量共培养细胞的阴性分选(未经选择)群体内所测量的IFN-γ分泌。图24B描绘了与大量未经分选的T细胞相比，阳性分选和阴性分选中肿瘤反应性特异性细胞的新抗原特异性群体的富集。图24C描绘了存在于未经选择的和经选择的群体中的TCR克隆型的数量，并且证明未经分选的T细胞群中引进的TCR的多样性是高的，并且在经选择的群体中存在独特TCR克隆的富集。图24D描绘了来自样品A的分选之前和之后的细胞群，观察到它们含有CD4+和CD8+细胞，表明经富集的群体中存在I类和II类反应性细胞。

[0111] 图25A描绘了在用来自结直肠癌患者的抗CD3(OKT3)刺激后，在大量共培养物、来自大量共培养细胞(经富集)的按照CD137和/或CD134表达的阳性分选(经选择)群体或来自大量共培养细胞的阴性分选(未经选择)群体内所测量的IFN-γ分泌。图25B描绘了与大量未经分选的T细胞相比，阳性分选和阴性分选中肿瘤反应性特异性细胞的新抗原特异性群体的富集。图25C描绘了存在于未经选择的和经选择的群体中的TCR克隆性谱。图25D描绘了分选之前和之后的细胞群，观察到它们含有CD4+和CD8+细胞，表明经富集的群体中存在I类和II类反应性细胞。

[0112] 图26A描绘了在大量共培养物、来自大量共培养细胞(经富集)的按照CD137和/或CD134表达的阳性分选(经选择)群体或来自大量共培养细胞的阴性分选(未经选择)群体中肿瘤反应性特异性细胞的新抗原特异性群体的富集。图26B描绘了存在于未经选择的和经选择的群体中的TCR克隆性谱。图26C描绘了分选之前(大量)和之后的细胞群，观察到它们含有CD4+I类反应性细胞和CD8+II类反应性细胞两者。

[0113] 图27A-C示出了在补充OKT3刺激的情况下在多种T细胞佐剂的存在下生长的细胞的总活CD3+细胞计数。所示的结果是关于以下佐剂：10μg/mL的他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、派姆单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248、抗人FasL；25μM的Z-VAD-FMK泛胱天蛋白酶抑制剂；250nM的HSP抑制剂NVP-HSP990；以及1000IU/mL的细胞因子(IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)。

[0114] 图28A-C示出了在没有补充OKT3刺激的情况下在多种T细胞佐剂的存在下生长的细胞的总活CD3+细胞计数。所示的结果是关于以下佐剂：10μg/mL的他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、派姆单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248、抗人FasL；25μM的Z-VAD-FMK泛胱天蛋白酶抑制剂；250nM的HSP抑制剂NVP-HSP990；以及1000IU/mL的细胞因子(IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)。

[0115] 图29示出了IL-7(图29A)和IL-15(图29B)的剂量反应曲线。

[0116] 图30A-B-图32A-B示出了源自三名健康供体中的每一名并在实验条件下生长的细胞的总细胞数和细胞活力。观察到尽管存在固有的供体变异性，但在连续胱天蛋白酶抑制的存在下生长的细胞显示出优异的生长。

[0117] 图33A-B-图36A-B示出了两名供体的在用抗CD3/抗CD28连续激活或暂时激活(暂时激活)后的处理组的细胞效应。两名供体的用抗CD3/抗CD28单次激活(瞬时激活)的处理组的细胞活力示于图33A-B中，并且相同处理的总细胞数示于图34A-B中。两名供体的用抗CD3/抗CD28连续激活的处理组的细胞活力示于图35A-B中，并且相同处理的总细胞数示于

图36A-B中。

[0118] 图37A-C示出了在存在或不存在泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK的情况下生长的SCS和肿瘤碎片两种来源的培养物的扩增倍数(图37A)、总活细胞(图37B)和活力百分比(图37C)。

[0119] 图38A-D-图40A-D示出了在用多种T细胞佐剂进行孵育后T细胞的T细胞表型。示出了在不同浓度的伊匹单抗(抗CTLA4)、派姆单抗(抗PD1)、他佛利珠单抗(抗TNFRSF4)、乌瑞鲁单抗(抗CD137)和伐立鲁单抗(抗CD27)的存在下生长的CD3+(图38A-D)、CD4+(图39A-D)和CD8+(图40A-D)细胞的T细胞表型。

[0120] 图41A-图49A示出了在IL-2与另外的调节细胞因子或其他T细胞佐剂的存在下生长的细胞的总活CD3+细胞计数。所示的结果是关于三种浓度的以下佐剂:奥塞芦单抗(图48A)、抗GITR MK-1248(图47A)、Z-VAD-FMK泛胱天蛋白酶抑制剂(图49A);以及细胞因子IL-23、IL-21、IL-35、IL-27、IL-15、IL-7(图41A、42A、43A、44A、45A和46A)。

[0121] 图41B-图49B描绘了在三种浓度的奥塞芦单抗(图48B)、抗GITR MK-1248(图47B)、Z-VAD-FMK泛胱天蛋白酶抑制剂(图49B)以及细胞因子IL-23、IL-21、IL-35、IL-27、IL-15、IL-7(图41B、42B、43B、44B、45B和46B)的存在下生长的细胞中随幼稚和中枢记忆细胞群变化的T细胞表型。

[0122] 图50A-50C示出了在培养来自代表性健康供体的在IL-2与另外的调节细胞因子或其他T细胞佐剂的存在下生长的细胞后的CD4+/CD8+细胞比率,如在培养期结束时通过流式细胞术所评估的。所测试的抗体(图50A)、细胞因子(图50B)和其他调节剂(图50C)相对于在单独IL-2的情况下观察到的CD4+/CD8+T细胞比率都未显著改变CD4+/CD8+T细胞比率。

具体实施方式

[0123] 本文提供了用于制造表达细胞表面受体的T细胞的方法,所述细胞表面受体识别靶细胞(如肿瘤)表面上的肽。T细胞可以是识别肿瘤相关抗原(如新抗原)的肿瘤反应性T细胞。所述方法包括离体培养T细胞,其中T细胞已经从作为T细胞的细胞来源的生物样品分离或获得。在一些情形中,细胞来源包括外周血淋巴细胞、淋巴结来源的淋巴细胞或肿瘤浸润淋巴细胞。培养细胞的方法包括用于增殖和扩增细胞的方法,特别是涉及富集以供增殖和扩增肿瘤反应性T细胞的步骤,如通过选择此类细胞或基于与此类细胞相关的T细胞激活标记物。所提供的方法还在T细胞疗法的离体产生中使用某些T细胞调节剂或佐剂。在一些实施方案中,T细胞调节剂包括来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和重组IL-35的至少一种细胞因子。在一些实施方案中,T细胞调节剂包括至少一种免疫抑制因子阻断剂,如阻断TGFβ和/或吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶(IDO)的药剂。在此类实施方案中,T细胞的培养可以在此种T细胞调节剂(例如至少一种重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和重组IL-35和/或至少一种免疫抑制因子阻断剂)的进一步存在下用重组IL-2进行。在一些实施方案中,一种或多种另外的T细胞佐剂可以被包括在T细胞的离体培养中,如共刺激激动剂或者抑制细胞中的细胞凋亡或细胞凋亡途径的药剂(在下文中,“细胞凋亡抑制剂”)、抑制细胞中的热休克蛋白或热休克蛋白活性的药剂或者免疫检查点调节剂。在特定实施方案中,与非反应性T细胞相比,此类方法可以富集以供扩增反应性T细胞,并且促进其在离体培养中的存活和生长。预期所提供的方法可以比现有方法更大程度地增加扩增至治疗剂量和/或针对治疗效

果增加T细胞疗法的功能性。所提供的方法可以用于支持供体细胞在体外的生长和存活，如与产生T细胞疗法的方法结合，用于再递送回患者供体或另一名患者体内。

[0124] 本文提供了用于肿瘤反应性T细胞的离体富集和扩增的方法，所述方法涉及如下离体步骤：从来自受试者的样品分离T细胞(例如TIL)，刺激(激活)T细胞以使样品中的T细胞进行初始扩增，通过将经初始扩增的T细胞群与呈递肽新抗原的抗原呈递细胞(APC)一起培养来对肿瘤反应性T细胞进行共培养富集，从共培养物分离肿瘤反应性T细胞，以及扩增肿瘤反应性T细胞，其中一个或多个步骤包括用(1)选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的调节细胞因子和/或(2)一种或多种免疫抑制因子(如细胞因子、生长因子)阻断剂(在下文中，免疫抑制阻断剂)(如IL-27、IL-35、TGFβ和/或吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶(IDO)的阻断剂)进行孵育。在所提供的方法中，在所述一个或多个步骤期间在细胞培养基中提供调节细胞因子或免疫抑制阻断剂，其中细胞培养基进一步包括一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3和/或抗CD28 T细胞刺激剂)和/或来自重组IL-2、重组IL-7、重组IL-15和/或重组IL-21的一种或多种其他T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中，还可以包括一种或多种其他T细胞佐剂(例如T细胞激动剂)或细胞凋亡抑制剂(例如胱天蛋白酶抑制剂)。在一些方面，在从来自受试者的样品分离和刺激后和/或在培养期间在肿瘤反应性T细胞的富集和扩增期间，除了一种或多种其他药剂之外，在培养此类T细胞期间使用此类调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂可以改进潜在的目的反应性T细胞(如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的离体回收和/或扩增。

[0125] 在所提供的用于肿瘤反应性T细胞的离体富集和扩增的方法的实施方案中，所述方法包括如下离体步骤：从来自受试者的样品分离T细胞(例如TIL)，刺激(激活)T细胞以使样品中的T细胞进行初始扩增，通过将经初始扩增的T细胞群与呈递肽新抗原的抗原呈递细胞(APC)一起培养来对肿瘤反应性T细胞进行共培养富集，从共培养物分离肿瘤反应性T细胞，以及扩增肿瘤反应性T细胞，其中一个或多个步骤包括用(1)选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的调节细胞因子进行孵育。在所提供的方法中，在所述一个或多个步骤期间在细胞培养基中提供调节细胞因子，其中细胞培养基进一步包括来自重组IL-2、重组IL-7、重组IL-15和/或重组IL-21的一种或多种其他T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中，所述一种或多种其他T细胞刺激细胞因子包括重组IL-2。在一些实施方案中，所述一种或多种其他T细胞刺激细胞因子包括重组IL-15。在一些实施方案中，还可以包括一种或多种其他T细胞佐剂，如T细胞激动剂(例如共刺激激动剂)或细胞凋亡抑制剂(例如胱天蛋白酶抑制剂)。在一些方面，在从来自受试者的样品分离和刺激后和/或在培养期间在肿瘤反应性T细胞的富集和扩增期间，除了一种或多种其他药剂之外，在培养此类T细胞期间使用来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的至少一种调节细胞因子可以改进潜在的目的反应性T细胞(如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的离体回收和/或扩增。

[0126] 所提供的方法涉及产生对肿瘤相关抗原(如新抗原)具有反应性的T细胞疗法。作为肿瘤发生过程的一部分，癌细胞积累许多不同的DNA突变。这些突变可能引起蛋白质编码区中的氨基酸变化。对于待由免疫系统识别的突变，蛋白质需要在细胞内被处理并且呈递用主要组织相容性复合物(MHC)在表面上呈递的突变型肽。肽新抗原(在本文中也称为新表位或肽新表位)是由MHC复合物呈递的突变型肽，所述突变型肽可以由T细胞经由TCR结合来识别。为了让免疫系统识别突变，它必须经由MHC复合物在癌细胞的表面上表达，并且T细胞

必须具有识别经突变的肽的TCR。这些新抗原可以分别由MHC I类和MHC II类呈递，并且由CD8+和CD4+T细胞识别。

[0127] 在所提供的方法的特定实施方案中，T细胞群是或包括表达细胞表面受体(如T细胞受体(TCR))的反应性T细胞，所述细胞表面受体能够识别靶细胞表面上的肽抗原。具体而言，对于待由免疫系统识别的抗原，蛋白质需要在细胞内被处理为肽片段，然后用主要组织相容性复合物(MHC)在表面上呈递所述肽片段。TCR具有两条蛋白质链，它们被设计为与在某些细胞的表面上由主要组织相容性复合物(MHC)蛋白呈递的特定肽结合。由于TCR识别在靶细胞的表面上表达的在MHC分子背景下的肽，因此TCR具有不仅识别直接在靶细胞(例如癌细胞)的表面上呈递的抗原，而且识别由抗原呈递细胞呈递的抗原(如在肿瘤、炎性和感染微环境中，以及在次级淋巴器官中)的潜力。表达此类细胞表面受体的反应性T细胞可以用于靶向并杀伤任何靶细胞，包括但不限于受感染的细胞、受损的细胞或功能障碍细胞。此类靶细胞的例子可以包括癌细胞、病毒感染的细胞、细菌感染的细胞、功能障碍性激活的炎性细胞(例如，炎性内皮细胞)以及功能障碍免疫反应中涉及的细胞(例如，自身免疫性疾病中涉及的细胞)。

[0128] 在一些实施方案中，“T细胞受体”或“TCR”是如下分子，所述分子含有可变α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ)或可变γ和δ链(也分别称为TCRγ和TCRδ)或其抗原结合部分，并且所述分子能够与结合至MHC分子的肽特异性结合。在一些实施方案中，TCR呈αβ形式。通常，以αβ和γδ形式存在的TCR在结构上大体类似，但是表达它们的T细胞可能具有不同的解剖学位置或功能。可以在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现TCR，在此处TCR通常负责识别结合至主要组织相容性复合物(MHC)分子的抗原。

[0129] 在一些方面，反应性T细胞是识别癌症新抗原的肿瘤反应性T细胞。作为肿瘤发生过程的一部分，癌细胞积累许多不同的DNA突变。这些突变可能引起蛋白质编码区中的氨基酸变化。新抗原是由肿瘤特有的突变基因编码并由MHC复合物呈递的突变型肽，所述突变型肽可以由T细胞经由TCR结合来识别。为了使免疫系统识别突变，新抗原在癌细胞的表面上经由MHC复合物来表达，用于由具有识别突变肽的TCR的T细胞识别。这些新抗原可以分别由MHC I类和MHC II类呈递，并且由CD8+和CD4+T细胞识别。大部分新抗原源自乘客突变(passenger mutation)，意味着它们不暗示对癌细胞的任何生长优势。少数突变积极促进肿瘤生长，这些称为驱动突变(driver mutation)。乘客突变可能会产生为每名患者独有的新抗原，并且可能存在于所有癌细胞的子集中。驱动突变产生可能存在于个体的所有肿瘤细胞中的新抗原，并且可能被共享。在所提供的方法的一些实施方案中，T细胞群含有可以识别含有乘客突变和/或驱动突变的新抗原的肿瘤反应性T细胞。

[0130] 在特定方面，所提供的方法可以用于离体产生T细胞疗法，包括用于离体扩增自体肿瘤反应性T细胞。在一些方面，新抗原是免疫疗法的理想靶标，因为它们代表疾病特有的靶标。例如，此类抗原通常在患上癌症之前在体内不存在并且确实是癌症特有的，不在正常细胞上表达并且不经历脱靶免疫毒性。因此，为患者特有的新抗原的独特库可以引发对癌细胞具有特异性的强免疫反应，从而避开正常细胞。这是优于可能并非疾病特有的靶标的其他细胞疗法靶标的优势，因为在靶向一般抗原的工程化疗法的背景下，即使是正常细胞上低水平的靶抗原也可能导致严重的致命的自身免疫毒性。例如，黑色素瘤患者中的抗MAGE-A3-TCR程序由于研究相关死亡而被停止，所述死亡归因于与类似靶标MAGE-A12的交

叉反应性，所述MAGE-A12以低水平在脑中表达。癌症免疫疗法中的重大挑战一直是鉴定癌症靶标。

[0131] 最近的临床研究已经证明，从经手术切除的肿瘤分离的T细胞具有识别新抗原的TCR，并且在一些情形中，扩增这些新抗原反应性TIL群体并将其再输注到患者体内可以产生显著的临床益处。此个性化疗法已经在某些患有常见上皮肿瘤的患者中产生显著的临床反应。

[0132] 用于获得和产生肿瘤反应性T细胞的现有方法并不完全令人满意。例如，在没有扩增的情况下从受试者直接分离肿瘤反应性T细胞是不可行的，因为无法获得治疗有效量的此类细胞。作为替代方案，已经尝试鉴定对所需新抗原具有特异性的TCR，以将所述TCR重组工程化到T细胞中，用于在过继细胞治疗方法中使用。然而，此类方法仅产生针对特定新抗原的单一TCR，因此缺少多样性而无法识别更广泛的多种肿瘤特有的突变库。其他方法涉及大量扩增来自肿瘤来源的T细胞，这有扩增对肿瘤抗原无反应性的T细胞和/或扩增可能包括许多可展现出抑制活性的旁邻细胞在内的T细胞的风险。例如，肿瘤调节性T细胞(Treg)是$CD4^+$T细胞的子群体，所述$CD4^+$T细胞专门抑制免疫反应并且可以限制T细胞产物的反应性。作为另一替代方案，可以通过在自体抗原呈递细胞的存在下自体大量T细胞的离体共培养方法来鉴定这些细胞。在现有方法中，使自体抗原呈递细胞接触或呈递潜在肿瘤肽的来源，以鉴定对新抗原突变具有反应性的TCR。尽管现有方法可以导致产生反应性T细胞，但程序通常较长，需要使用液滴技术进行单细胞共培养，和/或涉及超出GMP受控环境的方法，导致与内毒素、支原体和无菌性相关的安全性风险。在许多情形中，这些寻求离体扩增肿瘤反应性T细胞的另外方法没有选择性，使得相对于反应性T细胞，可能优先扩增培养物中的非反应性T细胞，导致最终产物缺少令人满意的反应性和/或其中肿瘤反应性T细胞的数量仍然不足。需要产生用于疗法的肿瘤反应性T细胞的方法。

[0133] 所提供的实施方案涉及用于离体鉴定和扩增用于在T细胞疗法中使用的T细胞(包括肿瘤反应性T细胞)的改进方法。所提供的实施方案涉及用于离体鉴定和扩增用于在T细胞疗法中使用的T细胞(包括肿瘤反应性T细胞)的改进方法。在一些实施方案中，所提供的方法改进或增加T细胞(如肿瘤反应性T细胞)在体外的生长和存活。在特定实施方案中，与非反应性T细胞相比，所述方法富集以供扩增反应性T细胞，并且促进其在离体培养中的存活和生长。在一些实施方案中，所得方法可以在封闭系统中进行。在一些实施方案中，所述方法以自动化或部分自动化的方式进行。

[0134] 在所提供的方法的一些实施方案中，使用潜在肿瘤肽的来源在包括扩增对肿瘤新抗原肽具有反应性的T细胞的过程中鉴定对新抗原具有反应性的TCR。所提供的方法包括离体共培养方法，其中将已经从存在于或来自生物样品(例如肿瘤碎片或外周血或T细胞的其他来源)的T细胞扩增的T细胞群在已经接触或呈递新抗原肽的抗原呈递细胞的存在下进行孵育。在特定方面，T细胞和抗原呈递细胞对于鉴定出肽的荷瘤受试者是自体的。所提供的方法进一步包括在肿瘤反应性T细胞的进一步离体扩增之前或结合离体扩增，从共培养物分离、富集和/或选择所述肿瘤反应性T细胞的步骤。

[0135] 所提供的方法如基于在呈递突变型抗原后对上调标记物的选择以及限制旁邻细胞扩增的一个或多个步骤产生对患者特有的突变具有反应性的经富集的T细胞群。所提供的方法产生含有肿瘤反应性T细胞的产物，其可以靶向许多突变和/或含有数百种对不同肿

瘤抗原具有反应性的TCR。因此，与细胞被转导以表达单一新表位反应性TCR的现有方法相比，此类肿瘤反应性T细胞具有优势。

[0136] 此外，所提供的方法包括减少或限制所得产物中旁邻细胞的存在和/或富集肿瘤反应性T细胞的步骤。在特定方面，使用调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35中的一种或多种)和/或免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)可以帮助促进T细胞功能性，同时破坏或降低不需要的细胞(如抑制性Treg细胞)的活性。在一些方面，由于肿瘤微环境中的抑制因子，此类调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂在从肿瘤分离TIL期间可能特别有利。在一些方面，在分离或富集后扩增肿瘤反应性T细胞和与APC/肽新表位共培养期间还可以包括所提供的此类调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的使用。例如，在一些实施方案中，调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35中的一种或多种)和/或免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO1)在TIL的初始刺激和扩增以及经分离的或经富集的新抗原肿瘤反应性T细胞的扩增期间可以被证明在肿瘤培养中是有益的。在其他例子中，调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或IL-35中的一种或多种)和/或免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO1)在来自抑制性肿瘤微环境的TIL的初始刺激和扩增期间以及在用刺激剂(如IL-2)进行扩增期间防止新抗原肿瘤反应性T细胞的免疫抑制可以被证明是有益的。在另外的例子中，此类调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂的存在可以优化在肿瘤细胞培养期间在初始刺激和扩增期间的TIL回收。

[0137] 图1A描绘了根据所提供的方法制造T细胞治疗性组合物的示例性过程的示意图。在示例性过程中，从患者获得肿瘤样品用于鉴定和产生肽，用于在与呈递肽的抗原呈递细胞(APC)和从同一受试者获得的自体抗原T细胞的共培养方法中使用。在一些情形中，用一种或多种刺激剂在第一次扩增中在扩增细胞的条件下孵育或培养来自患者的例如含有肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)或外周血淋巴细胞(PBL)的T细胞群(其是第一T细胞群)，从而产生含有经扩增的T细胞的第二T细胞群。然后将经初始扩增的T细胞(第二T细胞群)与已经接触或暴露于用于在主要组织相容性复合物上呈递的肽新表位(新抗原肽)的抗原呈递细胞共培养，以富集含有识别在APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体。在抗原呈递细胞在主要组织相容性复合物的背景下呈递肽的条件下共培养后，可以从共培养物选择含有肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物(也称为上调标记物或反应性T细胞标记物，例如CD70a)呈表面阳性的T细胞的第三T细胞群，从而产生进一步富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群。然后根据所提供的方法在第二次扩增中在用于扩增条件下进一步孵育或培养经选择的细胞(第四T细胞群)，其中产生经扩增并经富集的肿瘤反应性T细胞的第五群体。孵育或培养可以在如所述的一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35中的一种或多种)的存在下进行以支持细胞的增殖和扩增。所述过程可以在含有营养素的无血清培养基的存在下进行。一个或多个或者所有步骤可以在封闭系统中进行，如不使细胞暴露于环境。在达到细胞的治疗剂量或阈值数量后，可以收获并配制细胞，在一些情形中进行浓缩或冷冻保存，并且用于如通过输注施用至受试者。在所提供的例子中，一个或多个步骤在选自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种调节细胞因子的存在下进行。在一些所提供的例子中，一个或多个步骤在免疫抑制阻断剂(例如针对TFGβ或IDO)的存在下进行。在一些例子中，一个或多个步骤还可以包括T细胞佐剂(如共刺激激动剂、细胞

凋亡抑制剂、免疫检查点调节剂和/或热休克蛋白抑制剂)。图1C描绘了示例性过程,其中可以在一个或多个步骤后进行冷冻保存步骤。

[0138] 所提供的方法提供了与用于产生扩增TIL的现有方法相比的优势,因为所提供的方法涉及富集肿瘤反应性细胞的步骤,如通过与肽呈递APC的共培养步骤,之后选择已经上调一种或多种T细胞激活标记物的反应性T细胞克隆。借助此过程,使从生物样品(例如肿瘤)扩增的肿瘤反应性T细胞的初始小群体富集是或可能是肿瘤反应性细胞的细胞,之后进行后续第二次扩增步骤,从而促进目的细胞的保存和扩增并且限制对肿瘤抗原无反应性和/或可以包括展现出抑制性活性的细胞在内的旁邻T细胞的扩增(图2B,其与图2A中描绘的在旁邻者T细胞中高而在肿瘤反应性T细胞中低的替代方法形成对比)。因此,所提供的方法与现有方法形成对比,所述现有方法涉及大量T细胞的被动扩增,其中使来自肿瘤的所有T细胞经受第一次初始扩增(例如用高IL-2浓度),之后是初始扩增后存在的T细胞的第二次快速扩增。在此类其他方法中,虽然可以通过这些替代过程大量扩增总活细胞(TVC)(如图2A所示),但没有主动确保主要繁殖肿瘤反应性T细胞的步骤(如通过如图2B所描绘的所提供的方法发生)。此外,进行所提供的方法以使可以收集的肿瘤反应性细胞的数量最大化,例如通过将第一次扩增后增殖的所有细胞与肽呈递APC共培养,然后在共培养后从所有大量细胞选择对所述一种或多种激活标记物呈阳性的细胞,之后进行后续第二次扩增。在所提供的方法的方面,所述方法的所有步骤都在封闭系统中进行。

[0139] 在一些方面,将从肿瘤样品分离的T细胞在一种或多种刺激剂如一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)的存在下,并且进一步在一种或多种其他调节细胞因子(如重组IL-23、重组IL-25或重组IL-27和重组IL-35中的一种或多种)的存在下进行孵育或培养。在所提供的实施方案中,用所述一种或多种重组细胞因子(包括IL-23、IL-25、IL-27或IL-35调节细胞因子中的一种或多种)对经分离的T细胞群的孵育在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下进行。在一些实施方案中,经分离的T细胞的孵育包括IL-2以及来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种细胞因子的存在。在一些实施方案中,经分离的T细胞的孵育包括IL-15以及来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种细胞因子的存在。在一些情形中,在培养或孵育期间还可以包括如所述的另一T细胞佐剂,如共刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂)、细胞凋亡抑制剂、免疫检查点调节剂和/或热休克蛋白抑制剂。所提供的方法可以促进来自受试者的肿瘤的T细胞群的初始扩增,同时促进T细胞功能性并减少不需要的细胞的存在或活性。

[0140] 在一些方面,将从肿瘤样品分离的T细胞在一种或多种刺激剂如一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35中的一种或多种)的存在下,并且进一步在阻断TGFβ或IDO活性的一种或多种其他免疫抑制阻断剂的存在下进行孵育或培养。在一些实施方案中,经分离的T细胞的孵育包括IL-2以及阻断TGFβ或IDO活性的所述一种或多种其他免疫抑制阻断剂的存在。在一些实施方案中,经分离的T细胞的孵育包括IL-15以及阻断TGFβ或IDO活性的所述一种或多种其他免疫抑制阻断剂的存在。在一些实施方案中,经分离的T细胞的孵育包括IL-2,来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种细胞因子,以及阻断TGFβ或IDO活性的所述一种或多种其他免疫抑制阻断剂的存在。在一些实施方案中,经分离的T细胞的孵育包括IL-15,来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种细胞因子,以及阻断TGFβ或IDO活性的所述一种或多种其他免疫抑制阻断剂的存在。在

所提供的实施方案中，用所述一种或多种重组细胞因子对经分离的T细胞群的孵育在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下进行。在一些情形中，在培养或孵育期间还可以包括如所述的另一T细胞佐剂，如共刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂)、细胞凋亡抑制剂、免疫检查点调节剂和/或热休克蛋白抑制剂。所提供的方法可以促进来自受试者的肿瘤的T细胞群的初始扩增，同时促进T细胞功能性并减少不需要的细胞的存在或活性。

[0141] 在所提供的方法的实施方案中，所述方法进一步包括将经初始扩增的T细胞群(第一T细胞群)与已经接触或暴露于用于在MHC上呈递的肽新表位(新抗原肽)的抗原呈递细胞共培养，以富集含有识别在APC上的MHC上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体，从第三群体选择对一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞，其中获得经选择的T细胞的第四群体，然后在用于扩增的条件下进一步孵育或培养经选择的细胞(第四T细胞群)，其中产生经扩增并经富集的肿瘤反应性T细胞的第五群体。在所提供的任何方法的实施方案中，所述一个或多个另外的步骤可以在如所述的一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35中的一种或多种)的存在下进行。在一些实施方案中，所述一个或多个另外的步骤包括IL-2的存在。在一些实施方案中，所述一个或多个另外的步骤包括IL-15的存在。在一些实施方案中，所述一个或多个另外的步骤包括IL-2以及来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种细胞因子的存在。在一些实施方案中，所述一个或多个另外的步骤包括IL-15以及来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种细胞因子的存在。在所提供的任何方法的一些实施方案中，所述一个或多个另外的步骤可以用阻断TGFβ或IDO活性的免疫抑制阻断剂进行。在所提供的任何方法的一些实施方案中，所述一个或多个另外的步骤可以在T细胞佐剂如共刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂)、细胞凋亡抑制剂、免疫检查点调节剂和/或热休克蛋白抑制剂的存在下进行。

[0142] 在一些实施方案中，所述方法的步骤中的任何一个或多个可以包括用一种或多种T细胞刺激剂如抗CD3抗体(例如OKT3)或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如抗CD3/抗CD28珠，如Dynabead)孵育T细胞群。在其他实施方案中，所述方法不包括如下任何步骤，所述步骤包括用抗CD3抗体(例如OKT3)或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如抗CD3/抗CD28珠，如Dynabead)孵育细胞。

[0143] 在一些方面，将与APC/肽新表位共培养后分离或富集的肿瘤反应性T细胞在一种或多种T细胞刺激剂如抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体和/或重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)的存在下，并且进一步在一种或多种其他调节细胞因子(如重组IL-23或重组IL-25或重组IL-27和重组IL-35)的存在下进行孵育。在一些情形中，在培养期间还可以包括如所述的另一T细胞佐剂，如共刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂)或细胞凋亡抑制剂。

[0144] 在一些方面，将与APC/肽新表位共培养后分离或富集的肿瘤反应性T细胞在一种或多种T细胞刺激剂如抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体和/或重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)的存在下，并且进一步在一种或多种阻断TGFβ或IDO1活性的一种或多种免疫抑制阻断剂的存在下进行孵育。在一些情形中，在培养期间还可以包括如所述的另一T细胞佐剂，如共刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂)或细胞凋亡抑制剂。

[0145] 在所提供的任何方法的特定实施方案中，与T细胞一起孵育进一步包括T细胞佐剂(如共刺激激动剂、细胞凋亡抑制剂、免疫检查点调节剂和/或热休克蛋白抑制剂)的存在。

在一些实施方案中,T细胞佐剂是可溶性蛋白,如不结合或附着至固体表面(例如珠或其他固体支持物)的蛋白质。T细胞佐剂可以包括小分子、肽或蛋白质。此类T细胞佐剂包括可溶性配体、抗体或抗原结合片段或者其他结合剂。在一些实施方案中,共刺激激动剂可以包括与共刺激分子(如4-1BB或OX40)特异性结合的分子,以诱导或刺激细胞中的共刺激信号。在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂可以包括与介导或参与诱导细胞中的细胞凋亡的受体特异性结合的分子。在一些实施方案中,免疫检查点调节剂可以包括与"检查点"蛋白(如PD1)特异性结合的分子。在一些实施方案中,热休克蛋白抑制剂可以包括与热休克蛋白(如Hsp90)特异性结合的分子。在一些实施方案中,这些分子可以在制造过程期间容易地去除,如通过结合细胞制造或在最终配制细胞以供施用之前洗涤细胞。

[0146] 在所提供的实施方案中,T细胞的孵育包括在刺激或激活样品中的一种或多种T细胞表达的共刺激受体的条件下存在共刺激激动剂。在特定实施方案中,共刺激激动剂是4-1BB激动剂。在其他特定实施方案中,共刺激激动剂是OX40激动剂。在一些此类方面,共刺激激动剂(如4-1BB激动剂或OX40激动剂)提供初始刺激以增强或加强群体中T细胞的增殖能力和/或功能活性。

[0147] 在所提供的实施方案中,T细胞的孵育包括细胞凋亡抑制剂的存在。在特定实施方案中,细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是胱天蛋白酶的抑制剂,所述两者都参与诱导特别是经激活的T细胞的细胞凋亡。在特定实施方案中,细胞凋亡抑制剂是一种或多种胱天蛋白酶的抑制剂(也称为胱天蛋白酶抑制剂)。如本文所示,在本文中发现胱天蛋白酶抑制剂显著提高肿瘤反应性T细胞的扩增潜力,特别是来自患者肿瘤的肿瘤反应性T细胞,或者当在肿瘤微环境中可能存在的条件下激活细胞时。在一些此类方面,细胞凋亡抑制剂保护T细胞免于发生细胞凋亡,从而恢复群体中的T细胞增殖和扩增的潜力。

[0148] 所提供的方法包括一种或多种特征,所述特征提供或涉及改进的、更有效的和/或更稳健的用于离体产生肿瘤反应性T细胞治疗性组合物的过程。特别地,本公开文本涉及提供优于用于产生TIL治疗性细胞组合物的现有方法的优势的方法。此类优势包括例如降低成本、流线型化、改进治疗性组合物中肿瘤反应性T细胞的富集以及增加治疗性组合物的功效,包括在不同受试者和肿瘤条件之间。

[0149] 与唯一的T细胞刺激剂或调节细胞因子是重组IL-2的替代方法相比,本文所提供的发现包括所提供的方法促进生长的改进,同时还增加中枢记忆和幼稚T细胞的百分比。在一些实施方案中,与唯一的T细胞刺激剂或调节细胞因子是重组IL-2的替代方法相比,中枢记忆和幼稚T细胞的百分比增加大于或大于约1.2倍、大于或大于约1.3倍、大于或大于约1.4倍、大于或大于约1.5倍、大于或大于约2.0倍、大于或大于约2.5倍、大于或大于约3.0倍、大于或大于约4.0倍或者大于或大于约5.0倍。在一些实施方案中,所提供的方法由此导致具有更多耗竭表型的T细胞减少。在一些实施方案中,通过所提供的方法富集和扩增的肿瘤反应性T细胞展现出改进的持久性。

[0150] 本文的发现包括以下观察结果:可以在一个或两个扩增步骤期间成功采用较低浓度的重组IL-2。许多现有方法使用6000IU/mL高浓度的IL-2用于TIL的T细胞扩增。然而,高IL-2浓度可以增加过程的成本并且可能具有限制性。在一些情形中,高IL-2浓度可能因驱使效应T细胞分化超过在治疗性T细胞组合物中可能更期望的早期记忆T细胞而导致对T细胞分化的负面影响。所提供的方法可以用数倍低于6000IU/mL的浓度,如低于或低于约

1000IU/mL,例如为或为约300IU/mL至为或约1000IU/mL的浓度来进行。在特定实施方案中,IL-2的浓度是为或约300IU/mL。

[0151] 在所提供的方法的实施方案中,从已知含有T细胞的生物样品获得T细胞群。

在一些实施方案中,从来自受试者(特别是人类受试者)的生物样品富集T细胞群。生物样品可以是含有T细胞的大量群体的任何样品。在一些实施方案中,生物样品是或包括外周血单个核细胞。在一些实施方案中,生物样品是外周血或血清样品。在一些实施方案中,生物样品是淋巴结样品。在一些实施方案中,生物样品是肿瘤样品。在一些方面,大量T细胞可以包括肿瘤浸润T细胞(TIL)。在一些实施方案中,受试者是人类受试者。在一些实施方案中,受试者是患有癌症、病毒感染、细菌感染的受试者,或者是患有炎性病症的受试者。在特定实施方案中,受试者患有癌症。

[0152] 在所提供的方法的方面,所述方法中的细胞起始来源可以是肿瘤碎片(例如1-8mm直径的碎片),或者可以是来自肿瘤碎片的酶促消化的单细胞悬浮液制剂。在本文中发现,虽然某些来源可能对一些肿瘤类型更优越,但碎片和单细胞悬浮液两者都可以支持T细胞扩增和肿瘤反应性T细胞的富集。在一些情形中,可以根据肿瘤类型或癌症来选择肿瘤细胞来源,如以优化或增加来自肿瘤的肿瘤反应性T细胞的扩增和富集。在一个例子中,癌症是黑色素瘤,并且淋巴细胞的起始群体是如来自经切除的肿瘤的肿瘤碎片。在另一个例子中,癌症是结直肠癌,并且淋巴细胞的起始群体是通过肿瘤碎片的酶促消化(例如胶原酶)获得的单细胞悬浮液。

[0153] 在一些实施方案中,所述方法包括将经初始扩增的T细胞与已经加载有肽的自体抗原呈递细胞共培养的步骤。本文的发现证明,相对较低浓度的肽或肽池(含有多种肽,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100种或更多种或者任何前述值之间的任何值),如每种单独肽低于20ng/mL,并且甚至低至0.1ng/mL,可以导致培养期间T细胞的激活增加。在一些实施方案中,这可以导致在选择对一种或多种T细胞激活标记物(即上调标记物或反应性T细胞标记物)呈阳性的细胞之前,改进肿瘤反应性T细胞在共培养物中的富集。在一些实施方案中,所提供的方法中的共培养步骤包括为或约1:5至为或约5:1(如1:3至为或约3:1,例如为或约1:1)的含有T细胞的肿瘤源细胞与自体APC(例如树突细胞)的比率,并且涉及用单独肽或肽池加载APC。在一些实施方案中,APC加载有一定浓度的肽或肽池,其中单独肽或者肽池中的单独肽平均低于或低于约20ng/mL,如为或约0.1ng/mL至为或约1ng/mL,例如为或约0.1ng/mL。

[0154] 在一些实施方案中,所提供的方法包括从生物样品富集或选择T细胞群。在一些方面,通过阳性或阴性选择技术分离T细胞或T细胞的特定子群体,如对一种或多种表面标记物呈阳性或表达高水平的所述表面标记物的细胞(例如,CD3+、CD4+或CD8+T细胞)。在一些方面,针对CD4+T细胞富集或选择经富集的T细胞。在一些方面,针对CD8+T细胞富集或选择经富集的T细胞。在一些方面,针对CD4+和CD8+T细胞富集或选择经富集的T细胞。例如,对于表达CD3的大量T细胞,可以阳性选择CD4+和CD8+T细胞。可替代地,可以通过对表达CD4的T细胞子群体的阳性选择以及对表达CD8的T细胞子群体的阳性选择,单独(同时或以任何顺序依序)选择CD4+和CD8+T细胞。对CD4+和CD8+T细胞的选择确保富集表达MHC II类和MHC I类的T细胞,以提供如下T细胞疗法,所述T细胞疗法是能够识别一套多样化的抗原(如癌症抗原)的泛肿瘤扫描靶标。

[0155] 在一些实施方案中，所提供的方法包括进一步基于一种或多种标记物来富集T细胞(如CD3+T细胞或其CD4+和/或CD8+子集)，所述标记物在反应性T细胞上表达或者是反应性T细胞特有的(在下文中，“反应性T细胞标记物”)。在一些情形中，标记物的表达在肿瘤反应性T细胞上被上调(例如与静息或未经激活的T细胞相比)。在反应性T细胞的内源TCR识别靶细胞或组织上的抗原时，如在TCR识别肿瘤上的新抗原时，所述反应性T细胞将表达某些反应性标记物。示例性的反应性T细胞标记物包括以下中的一种或多种，如两种、三种、四种或更多种：CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134(OX40)、CD258、CD256、PD-1、TIM-3或LAG-3。对一种或多种此类反应性T细胞标记物呈阳性的细胞的富集或选择可以在扩增方法的一个或多个步骤之前或期间进行。在特定实施方案中，所提供的方法包括在通过与肽呈递APC(例如树突细胞，DC)的共培养孵育激活T细胞群后，富集或选择对反应性或经激活的T细胞上的一种或多种上调标记物呈阳性的细胞。在一些实施方案中，从共培养物选择对反应性或经激活的T细胞上的一种或多种上调标记物呈阳性的细胞的步骤可以导致2倍或更高的抗原特异性肿瘤反应性T细胞的富集，和/或显著降低TCR克隆性，从而证实TCR克隆型的富集与肿瘤反应性T细胞的富集一致。此外，与来自共培养物的未经选择的T细胞或大量T细胞相比，此类经富集的T细胞可以在抗原特异性刺激后展现出改进的产生IFN-γ的能力。

[0156] 在一些实施方案中，所述方法产生或扩增用于在过继细胞治疗方法中使用的T细胞，所述过继细胞治疗方法用于治疗如下疾病或病症，其中已知或怀疑与所述疾病或病症相关的细胞或组织表达由T细胞识别的抗原靶标。在一些实施方案中，T细胞疗法对于受试者是自体的。在一些实施方案中，T细胞疗法对于受试者是同种异体的。

[0157] 将在本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入，其并入程度如同将每个单独出版物通过引用单独并入一般。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义矛盾或以其他方式不一致，则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0158] 本文所用的章节标题仅用于组织目的，而不应解释为限制所描述的主题。

I.肿瘤反应性T细胞的离体扩增

[0159] 所提供的方法涉及特别是用于与治疗癌症结合的T细胞治疗性组合物的离体扩增和产生。在一些实施方案中，制造方法涉及患者细胞在体外的生长和操纵。在特定实施方案中，所述方法涉及用于扩增含有对肿瘤相关抗原具有特异性的内源TCR的T细胞(在下文中，“肿瘤反应性T细胞”)的方法。出于本公开文本的目的，提及肿瘤反应性T细胞包括如下T细胞，所述T细胞展现出对肿瘤抗原的反应性或者由于T细胞激活标记物的上调或表面阳性表达而可能是或怀疑是肿瘤反应性T细胞。在一些方面，这些细胞的天然存在的频率可能较低，并且为了将这些细胞扩增至达到治疗剂量，用于富集和扩增的离体方法是必需的。

[0160] 所提供的用于扩增肿瘤反应性T细胞的方法涉及一系列扩增步骤以刺激或诱导T细胞群中T细胞的增殖。在一些情形中，所述方法包括单独用或与一种或多种其他重组细胞因子(例如IL-7、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27、IL-35)，以及在一些情形中一种或多种其他免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)组合用重组IL-2或IL-15孵育T细胞群。另外，在一些情形中，可以使用一种或多种T细胞佐剂，包括共刺激激动剂、细胞凋亡和热休克蛋白抑制剂以及免疫检查点调节剂。在一些实施方案中，用于培养T细胞的方法还可以包括向细胞提供

初级和/或次级(共刺激)信号的刺激剂,如通过用由抗CD3(例如OKT3)和/或抗CD28试剂提供的T细胞刺激剂孵育T细胞群。在一些实施方案中,T细胞刺激剂包括抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28抗体。通常,此类方法还包括含有营养素的培养基,使得细胞可以在体外存活。

[0161] 在所提供的方法中,所述方法包括离体培养含有肿瘤反应性T细胞的T细胞群,其中培养的至少一部分包括用来自IL-23、IL-25、IL-27、IL-35的至少一种细胞因子进行孵育和/或用免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)进行孵育。另外,在所提供的方法的一个或多个步骤中培养T细胞群可以进一步包括添加另外的T佐剂,包括药物激动剂,以及在一些情形中细胞凋亡或热休克蛋白介导途径的抑制剂。将一种或多种此类调节剂添加至T细胞的制造中可以在向患者再输注时增加T细胞的离体和体内功能性。与所提供的方法结合,所述方法进一步包括富集含有对肿瘤相关抗原具有特异性的内源TCR的T细胞(“肿瘤反应性T细胞”),以使所需治疗性细胞的扩增最大化。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原是或包括新抗原。

[0162] 因此,所提供的方法包括培养T细胞以制造肿瘤反应性T细胞的方法,所述方法既涉及(1)使用另外的T细胞调节剂(例如来自IL-23、IL-25、IL-27、IL-35的至少一种)和/或用免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)进行孵育,如在一种或多种标准T细胞刺激剂如重组细胞因子(例如单独或一起或与IL-7、IL-21组合的IL-2或IL-15)或者在一些情形中抗CD3和/或抗CD28之前或与其同时,并且(2)进一步涉及肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的富集或选择。预期所提供的方法可以比现有方法更大程度地增加扩增至治疗剂量和/或针对治疗效果增加T细胞疗法的功能性。

[0163] 所提供的方法涉及从受试者收集已知或可能含有肿瘤反应性T细胞的生物样品。在所提供的方法的实施方案中,含有T细胞的群体(在下文中也称为第一T细胞群)是从来自受试者(如人类受试者)的含有T细胞的生物样品获得、选择或分离的细胞群。在一些实施方案中,含有T细胞的群体可以来自已知或怀疑含有T细胞的任何来源样品,所述T细胞是或可能包括或潜在地可能包括肿瘤反应性T细胞。样品可以包括含有肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的肿瘤样品、含有外周血单个核细胞(PBMC)的血液样品(例如单采术或白细胞单采术样品)或淋巴结样品。在一些实施方案中,样品是含有肿瘤浸润淋巴细胞或TIL的肿瘤样品或肿瘤碎片。可以直接从受试者(例如健康或癌症受试者)获得T细胞群,如通过从来自受试者的生物样品选择T细胞或其子集。在特定实施方案中,生物样品来自患有肿瘤并且含有肿瘤反应性T细胞或有潜力含有或可能含有可以通过所提供的方法富集的肿瘤反应性T细胞的受试者。在一些实施方案中,可以直接从患有肿瘤的受试者收集生物样品,其中在一些情形中,可以已经将此类经分离的或所获得的T细胞共培养或在体内暴露于肿瘤。

[0164] 所提供的用于扩增肿瘤反应性T细胞的方法涉及第一次扩增,所述第一次扩增涉及用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养经选择的或经分离的含有T细胞的群体(即第一T细胞群)。通常,此类刺激包括一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)(如通常是重组IL-2)以及含有营养素的培养基,使得细胞可以在体外存活。在一些情形中,第一次扩增还在一种或多种其他调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35)和/或TGFβ或IDO的一种或多种其他免疫抑制阻断剂的存在下

进行。用一种或多种T细胞刺激剂培养或孵育含有T细胞的群体可以进一步在一种或多种T细胞调节剂如一种或多种T细胞刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂)和/或细胞凋亡抑制剂(例如,如章节II中描述的任何一种)的存在下进行。由于存在于第一群体中的T细胞的扩增或增殖,初始或第一次扩增产生富集T细胞的第二T细胞群。

[0165] 在所提供的方法中,可以通过一个或多个另外的步骤从第一步骤中扩增的经刺激的T细胞进一步鉴定或富集肿瘤反应性T细胞,所述另外的步骤进一步包括在抗原呈递细胞以及包括肿瘤抗原的新表位的一种或多种肽(APC/肽新表位)的存在下离体共培养经刺激T细胞(第二T细胞群)。在一些实施方案中,所提供的方法包括离体共培养,其中如在已经诱导APC呈递来自肿瘤相关抗原的一种或多种肽的条件下将第二T细胞群与已经暴露于或接触一种或多种肽(例如合成肽)的人工抗原呈递细胞(APC)一起孵育。在一些实施方案中,T细胞群是来自患有肿瘤的受试者的自体T细胞,并且合成肽的来源是源自同一受试者的肿瘤抗原的肿瘤抗原肽。在一些实施方案中,来自离体共培养物的细胞是包括肿瘤反应性T细胞的细胞群(第三群体),所述肿瘤反应性T细胞识别培养物中APC的MHC上呈递的肽或被所述肽激活。在一些情形中,T细胞与APC和肽的共培养还可以在一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)(如通常是重组IL-2)的存在下进行。在一些实施方案中,共培养还可以包括存在如所述的一种或多种其他T细胞调节剂,如来自IL-23、IL-25、IL-27、IL-35的至少一种细胞因子,免疫抑制阻断剂,共刺激激动剂(例如TNFSFR激动剂),免疫检查点抑制剂和/或细胞凋亡抑制剂。

[0166] 在一些实施方案中,来自离体共培养物的细胞代表富集肿瘤反应性T细胞的细胞来源。在一些情形中,可以通过分离或选择表达与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种激活标记物的细胞来进一步富集肿瘤反应性T细胞(进一步分离或选择产生经富集的肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群)。T细胞激活标记物可以包括其表达被上调或为已经暴露于抗原并被激活的T细胞特有的细胞表面标记物。下文描述了示例性T细胞激活(或上调)标记物。与所提供的方法结合,所述方法导致含有对肿瘤相关抗原具有特异性的内源TCR的T细胞的富集,以使所需治疗性细胞的扩增最大化。

[0167] 因此,所提供的实施方案包括如下方法,所述方法包括离体鉴定或产生含有或怀疑含有肿瘤反应性T细胞的T细胞群的那些方法,所述肿瘤反应性T细胞如对肿瘤相关抗原(例如新抗原)或肿瘤相关抗原的肽展现出抗原特异性的T细胞。此类方法包括但不限于如下步骤:(1)鉴定、获得或产生含有为受试者肿瘤特有的新表位的多种肽;(2)获得从供体受试者(如从经切除的肿瘤或通过直接从生物样品(例如肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体)选择T细胞)获得的含有T细胞的群体;(3)在已经接触或暴露于所述多种肽中的一种或多种的抗原呈递细胞(APC)的存在下在APC呈递一种或多种MHC相关非天然肽的条件下共培养含有T细胞的群体;以及(4)富集含有对抗原呈递细胞(APC)上呈递的肽具有反应性的内源TCR的T细胞。在一些情形中,在共培养前,可以用一种或多种T细胞刺激剂(例如一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15))刺激从生物样品获得的T细胞群,如下所述,以激活或刺激T细胞以扩增T细胞群。在一些情形中,此步骤还在一种或多种其他调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35)和/或TGFβ或IDO的一种或多种免疫抑制阻断剂的存在下进行。在一些方面,通过从T细胞群分离抗原呈递细胞来富集含有内源TCR的T细胞。可替代地或另外地,通过选择对与肿瘤反应性T细胞

相关的一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞来富集此类细胞。

[0168] 在特定实施方案中，所提供的方法包括但不限于如下步骤：(1)鉴定、获得或产生含有为受试者肿瘤特有的新表位的多种肽；(2)获得从供体受试者(如从经切除的肿瘤或通过直接从生物样品(例如肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体)选择T细胞)获得的T细胞群；(3)通过用一种或多种T细胞刺激剂如一种或多种重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)以及任选地一种或多种另外的T细胞调节剂(如TNFRSF激动剂和/或细胞凋亡抑制剂)刺激或激活T细胞来进行第一次扩增，以产生含有经扩增的或经刺激的T细胞的第二T细胞群；(4)在已经接触或暴露于所述多种肽中的一种或多种的抗原呈递细胞(APC)的存在下在APC呈递一种或多种MHC相关非天然肽的条件下共培养含有经刺激的T细胞的第二群体，以产生第三T细胞群；以及(5)富集含有对抗原呈递细胞(APC)上呈递的肽具有反应性的内源TCR的T细胞，以产生第四T细胞群。第一次扩增还可以在一种或多种其他调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35)和/或针对TGFβ或IDO的一种或多种免疫抑制阻断剂的存在下进行。在一些方面，通过从T细胞群分离抗原呈递细胞来富集含有内源TCR的T细胞。可替代地或另外地，通过选择对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞来富集此类细胞。

[0169] 在特定实施方案中，如在分离或选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞后，对从共培养物富集或分离的T细胞进行第二次扩增。第二次扩增涉及孵育以进一步用一种或多种T细胞刺激剂如抗CD3抗体(例如OKT3)、抗CD28抗体和/或重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)以及任选地一种或多种T细胞调节剂(例如TNFSFR激动剂和/或细胞凋亡抑制剂)刺激T细胞。第二次扩增还可以在一种或多种其他调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35)和/或TGFβ或IDO的一种或多种免疫抑制阻断剂的存在下进行。允许根据需要扩增T细胞(如肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞)持续某个天数和/或直至满足治疗剂量或收获剂量。然后可以收获经扩增的T细胞的组合物并配制用于施用至受试者，以供治疗受试者的癌症。

[0170] 在特定实施方案中，所提供的方法包括但不限于如下步骤：(1)鉴定、获得或产生含有为受试者肿瘤特有的新表位的多种肽；(2)获得从供体受试者(如从经切除的肿瘤或通过直接从生物样品(例如肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体)选择T细胞)获得的T细胞群(第一T细胞群)；(3)通过用一种或多种T细胞刺激剂如来自IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15的一种或多种重组细胞因子(例如至少包括重组IL-2)以及任选地来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的至少一种另外的T细胞调节性重组细胞因子刺激或激活第一T细胞群来进行第一次扩增，以产生含有经扩增的或经刺激的T细胞的第二T细胞群；(3)在已经接触或暴露于所述多种肽中的一种或多种的抗原呈递细胞(APC)的存在下在APC呈递一种或多种MHC相关非天然肽的条件下共培养含有经刺激的T细胞的第二群体，以产生第三T细胞群；以及(5)从第三T细胞群富集含有对抗原呈递细胞(APC)上呈递的肽具有反应性的内源TCR的T细胞，以产生第四T细胞群。在一些方面，通过从T细胞群分离抗原呈递细胞来富集含有内源TCR的T细胞。可替代地或另外地，通过选择对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞来富集此类细胞。在特定实施方案中，如在分离或选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标

记物呈表面阳性的T细胞后，对第四T细胞群(即从共培养物富集或分离的T细胞)进行第二次扩增。第二次扩增涉及孵育以进一步用一种或多种T细胞刺激性重组细胞因子IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15(例如至少包括重组IL-2)刺激T细胞。在所提供的实施方案中，共培养或第二次扩增可以进一步在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的至少一种另外的T细胞调节性重组细胞因子的存在下进行。在一些实施方案中，T细胞刺激性抗CD3抗体(例如OKT3)和/或抗CD28抗体可以被包括在一个或多个孵育(如第一次扩增或第二次扩增)中。所提供的方法产生针对肿瘤反应性T细胞扩增并富集肿瘤反应性T细胞的T细胞组合物(或第五T细胞群)。

[0171] 在特定实施方案中，所提供的方法包括但不限于如下步骤：(1)鉴定、获得或产生含有为受试者肿瘤特有的新表位的多种肽；(2)获得从供体受试者(如从经切除的肿瘤或通过直接从生物样品(例如肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体)选择T细胞)获得的T细胞群(第一T细胞群)；(3)通过用一种或多种T细胞刺激剂如来自IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15的一种或多种重组细胞因子(例如至少包括重组IL-2)以及任选地针对TGFβ或IDO的免疫抑制阻断剂刺激或激活第一T细胞群来进行第一次扩增，以产生含有经扩增的或经刺激的T细胞的第二T细胞群；(3)在已经接触或暴露于所述多种肽中的一种或多种的抗原呈递细胞(APC)的存在下在APC呈递一种或多种MHC相关非天然肽的条件下共培养含有经刺激的T细胞的第二群体，以产生第三T细胞群；以及(5)从第三T细胞群富集含有对抗原呈递细胞(APC)上呈递的肽具有反应性的内源TCR的T细胞，以产生第四T细胞群。在一些方面，通过从T细胞群分离抗原呈递细胞来富集含有内源TCR的T细胞。可替代地或另外地，通过选择对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞来富集此类细胞。在特定实施方案中，如在分离或选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞后，对第四T细胞群(即从共培养物富集或分离的T细胞)进行第二次扩增。第二次扩增涉及孵育以进一步用一种或多种T细胞刺激性重组细胞因子IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15(例如至少包括重组IL-2)刺激T细胞。在所提供的实施方案中，共培养或第二次扩增可以进一步在针对TGFβ或IDO的至少一种免疫抑制阻断剂的存在下进行。在所提供的实施方案中，第一次扩增、共培养或第二次扩增可以进一步在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的至少一种另外的T细胞调节性重组细胞因子的存在下进行。在一些实施方案中，T细胞刺激性抗CD3抗体(例如OKT3)和/或抗CD28抗体可以被包括在一个或多个孵育(如第一次扩增或第二次扩增)中。所提供的方法产生针对肿瘤反应性T细胞扩增并富集肿瘤反应性T细胞的T细胞组合物(或第五T细胞群)。

[0172] 在所提供的实施方案中，任何一个或多个步骤(例如第一次扩增、共培养或第二次扩增)可以进一步包括T细胞共刺激激动剂，如如所述的任何一种。在所提供的实施方案中，任何一个或多个步骤(例如第一次扩增、共培养或第二次扩增)可以进一步包括免疫检查点调节剂，如如所述的任何一种。在所提供的实施方案中，任何一个或多个步骤(例如第一次扩增、共培养或第二次扩增)可以进一步包括细胞凋亡抑制剂，如如所述的任何一种。在所提供的实施方案中，任何一个或多个步骤(例如第一次扩增、共培养或第二次扩增)可以进一步包括热休克蛋白抑制剂，如如所述的任何一种。

[0173] 在所提供的方法的实施方案中，一个或多个步骤可以在无血清培养基中进行。在一个实施方案中，无血清培养基是OpTmizer CTS(LifeTech)、Immunocult XF(Stemcell

technologies)、CellGro(CellGenix)、TexMacs(Miltenyi)、Stemline(Sigma)、Xvivo15(Lonza)、PrimeXV(Irvine Scientific)或Stem XVivo(RandD systems)。无血清培养基可以补充有血清代用品，如来自LifeTech的ICSR(免疫细胞血清替代物)。血清代用品(例如，ICSR)的水平可以例如高达5％，例如约1％、2％、3％、4％或5％。在一些实施方案中，无血清培养基含有0.5mM至5mM的二肽形式的L-谷氨酰胺，如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutamaxTM)。在一些实施方案中，二肽形式的L-谷氨酰胺(如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是从或从约0.5mM至5mM、0.5mM至4mM、0.5mM至3mM、0.5mM至2mM、0.5mM至1mM、1mM至5mM、1mM至4mM、1mM至3mM、1mM至2mM、2mM至5mM、2mM至4mM、2mM至3mM、3mM至5mM、3mM至4mM或4mM至5mM，每个都包含端值。在一些实施方案中，二肽形式的L-谷氨酰胺(如L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)的浓度是或是约2mM。

[0174] 在一些实施方案中，在培养期间洗涤细胞一次或多次，以去除在培养期间存在的药剂和/或向培养基补充一种或多种另外的药剂。在一些实施方案中，在培养期间洗涤细胞，以在培养完成之前减少或去除所述一种或多种T细胞刺激剂或调节剂或者佐剂。

[0175] 在一些实施方案中，本文所提供的培养或孵育T细胞的方法包括适合于人T淋巴细胞生长的温度，例如至少约25摄氏度，通常是至少约30摄氏度，并且通常是为或约37摄氏度。在一些实施方案中，培养或孵育方法在无血清培养基中进行。

[0176] 在特定实施方案中，所提供的方法包括如通过选择对一种或多种T细胞激活标记物(例如CD107、CD107a、CD039、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD134(OX40)或CD103)呈表面阳性的T细胞，从生物样品(直接来源自体内样品，或来源自与抗原呈递细胞(APC)的离体共培养物)富集具有可以识别肿瘤相关抗原(例如新抗原)的内源TCR的T细胞。

[0177] 在一些实施方案中，所述方法的任何一个或多个步骤可以在封闭系统中或者在GMP条件下进行。在某些实施方案中，所有过程操作都在GMP套件中进行。在一些实施方案中，使用封闭系统进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中，一个或多个或者所有处理步骤(例如，分离、选择和/或富集、处理、培养步骤，包括与细胞扩增结合的孵育)以及配制步骤使用集成式或自容式系统中的系统、装置或设备，和/或以自动化或可编程方式来进行。在一些方面，所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序，其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0178] 在一些实施方案中，第一次扩增持续不超过14天、不超过12天、不超过10天、不超过7天、不超过5天、不超过3天或不超过2天。在一些实施方案中，第一次扩增持续2-14天，如2-12天、2-10天、2-8天、2-6天、2-4天、4-12天、4-10天、4-8天、4-6天、6-12天、6-10天、6-8天、8-12天、8-10天或10-12天。在一些实施方案中，第一T细胞群的第一次扩增持续为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或任何前述时间之间的任何时间范围。在一些实施方案中，第一次扩增的孵育进行7-10天。在一些实施方案中，第一次扩增的孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，第一次扩增的孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，第一次扩增的孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，第一次扩增的孵育持续为或约10天。

[0179] 在一些实施方案中，第二次扩增持续不超过14天、不超过12天、不超过10天、不超过7天、不超过5天、不超过3天或不超过2天。在一些实施方案中，第二次扩增持续2-14天，如

2-12天、2-10天、2-8天、2-6天、2-4天、4-12天、4-10天、4-8天、4-6天、6-12天、6-10天、6-8天、8-12天、8-10天或10-12天。在一些实施方案中，第四T细胞群的第二次扩增持续为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或任何前述时间之间的任何时间范围。在一些实施方案中，第二次扩增的孵育进行7-10天。在一些实施方案中，第二次扩增的孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，第二次扩增的孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，第二次扩增的孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，第二次扩增的孵育持续为或约10天。

[0180] 在一些实施方案中，进行根据所提供的任何方法的培养细胞的时间，直至获得阈值量的细胞(如肿瘤反应性细胞或对一种或多种T细胞激活标记物呈阳性的细胞)。在一些实施方案中，所述方法包括根据所提供的任何方法培养细胞，直至获得阈值量的细胞和/或直至开始用所述至少一种T细胞刺激性重组细胞因子进行孵育后至多20天。在一些实施方案中，根据所提供的方法培养细胞的总时间进行7至20天、7至14天、7至10天、10至20天、10至14天或14至20天。应理解，提及培养是指维持T细胞活力、增殖和扩增的条件。因此，应理解，提及培养不包括在所述方法的一个或多个步骤之后、在解冻前和在继续后续培养之前可以冷冻保存T细胞群的时间。

[0181] 在一些实施方案中，进行培养直至获得阈值量的细胞，其中阈值量是为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞或者为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间的总细胞或总活细胞，每个都包含端值。

[0182] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述方法导致T细胞的倍数扩增或导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增，所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或更多。

[0183] 所提供的方法的各方面的非限制性描述进一步描述于以下小节中。

A.新表位鉴定和肽产生

[0184] 所提供的方法包括在电脑上产生或鉴定含有至少一个癌症特有的新表位的多种肽(也称为“P”或“n聚体”)的步骤，以及在电脑上过滤肽从而获得新表位序列的子集的另一步骤。在一些实施方案中，使用来自新表位序列子集的序列信息制备至少一种合成肽，然后将合成肽用于根据所提供的方法富集肿瘤反应性T细胞的方法中。

[0185] 在一些实施方案中，用于离体产生肿瘤反应性T细胞的方法包括从来自受试者的癌细胞鉴定或分离肿瘤相关抗原或其肽序列。在一些实施方案中，通过从受试者的癌细胞鉴定或分离肿瘤相关抗原或其肽序列来确定癌症特有的癌症新表位。癌细胞可以从源自含有或预期含有肿瘤或癌细胞的患者的任何身体样品获得。身体样品可以是任何组织样品，如血液、从原发性肿瘤或肿瘤转移物获得的组织样品、淋巴结样品或含有肿瘤或癌细胞的任何其他样品。在一些方面，获得来自此类癌细胞的核酸并进行测序。在实施方案中，如通过全外显子组测序对基因组中基因的蛋白质编码区进行测序。为了鉴定肿瘤特有的序列，可以将测序数据与参考测序数据(如通过对来自同一受试者的正常细胞或非癌细胞进行测序获得的数据)进行比较。在一些实施方案中，使用下一代测序(NGS)方法。

[0186] 在一些实施方案中，肿瘤是血液肿瘤。血液肿瘤的非限制性例子包括白血病(包括急性白血病(如l lq23阳性急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓细胞性白血病以及成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病(如慢性粒细胞(myelocytic/granulocytic)白血病、慢性髓细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高分级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0187] 在一些实施方案中，肿瘤是实体瘤。实体瘤(如肉瘤和癌)的非限制性例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌(包括基底乳腺癌、导管癌和小叶乳腺癌)、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌和CNS肿瘤(如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。在几个例子中，肿瘤是黑色素瘤、肺癌、淋巴瘤、乳腺癌或结肠癌。

[0188] 在一些实施方案中，癌症是涉及胃肠道(GI道)癌症的胃肠癌，包括上消化道或下消化道或附属消化器官(如食道、胃、胆管系统、胰腺、小肠、大肠、直肠或肛门)的癌症。在一些实施方案中，癌症是食道癌、胃(stomach/gastric)癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌、粘膜相关淋巴组织的癌症(MALT淋巴瘤)、胆管树的癌症、结直肠癌(包括结肠癌、直肠癌或

两者)、肛门癌或胃肠类癌瘤。在特定实施方案中,癌症是结直肠癌。

[0189] 在一些实施方案中,肿瘤来自乳腺癌,如导管癌或小叶癌。在一些实施方案中,肿瘤来自前列腺癌。在一些实施方案中,肿瘤来自皮肤癌,如基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西肉瘤或黑色素瘤。在一些实施方案中,肿瘤来自肺癌,如腺癌、支气管肺泡癌、大细胞癌或小细胞癌。在一些实施方案中,肿瘤来自脑癌,如胶质母细胞瘤或脑膜瘤。在一些实施方案中,肿瘤来自胃肠癌,如上文所述的任何一种。在一些实施方案中,肿瘤来自结肠癌。在一些实施方案中,肿瘤来自肝癌,如肝细胞癌。在一些实施方案中,肿瘤来自胰腺癌。在一些实施方案中,肿瘤来自肾癌,如肾细胞癌。在一些实施方案中,肿瘤来自睾丸癌。

[0190] 在一些实施方案中,癌症不是黑色素瘤。黑色素瘤是一种通常具有高突变率的癌症。高肿瘤突变负荷已经被认为是与靶向肿瘤新抗原的免疫疗法治疗相关的成功的特别理想的预后标记物(Simpson等人,Journal of Clinical Oncology 2017,35:15_增刊,9567-9567;McGranahan等人Science 2016,351:1463-1469)。在一些实施方案中,所提供的方法可以用于具有较低肿瘤突变负荷的癌症中,因为所述方法的进行主动(与被动相反)富集肿瘤反应性T细胞。

[0191] 在一些实施方案中,受试者是具有小于(少于)8个突变的肿瘤突变负荷(TMB)的受试者。在一些方面,TMB包括每种肿瘤的非同义突变数。在一些实施方案中,可以通过以下方式来计算TMB:计数横跨0.8兆碱基至1.2兆碱基(Mb)区域的同义和非同义突变数,并且将结果报告为突变/Mb。在一些实施方案中,可以通过对肿瘤组织样品进行下一代测序(NGS)来确定TMB。在一些情形中,可以使用全外显子组测序或者可以使用计算种系状态过滤(Chalmers等人Genome Med 2017 9:34)。在一些实施方案中,受试者的TMB小于或小于约60个突变/Mb,如小于或小于约55个突变/Mb、小于或小于约50个突变/Mb、小于或小于约45个突变/Mb、小于或小于约40个突变/Mb、小于或小于约30个突变/Mb、小于或小于约25个突变/Mb或者小于或小于约20个突变/Mb,或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中,受试者的TMB小于或小于约41个突变/Mb、小于或小于约40个突变/Mb、小于或小于约39个突变/Mb、小于或小于约38个突变/Mb、小于或小于约37个突变/Mb或更小。

[0192] 在一些实施方案中,肽(P)是源自恶化前病症的肿瘤相关抗原,所述恶化前病症如原位癌变体或者外阴上皮内瘤变、宫颈上皮内瘤变或阴道上皮内瘤变。

[0193] 在一些方面,获得来自肿瘤或癌症的此类细胞的核酸并进行测序。在实施方案中,获得基因组中基因的蛋白质编码区,如通过组学分析,如通过全基因组测序数据、外显子组测序数据和/或转录组数据的分析。为了鉴定肿瘤特有的序列,可以将测序数据与参考测序数据(如从来自同一受试者的正常细胞或非癌细胞获得的数据)进行比较。在一些实施方案中,使用下一代测序(NGS)方法。

[0194] 在一些实施方案中,所述方法包括使用肿瘤的匹配的正常组学数据的步骤。在此类方法中,电脑分析涉及组学分析以鉴定肿瘤中相对于同一患者的正常组织(如同一患者的未患病组织)的突变。通常考虑到,匹配的正常组学数据是全基因组测序数据、外显子组测序数据和/或转录组数据,并且将匹配的正常组学数据针对治疗患者前的正常情况进行匹配。在一个特定实施方案中,对健康和患病组织进行全外显子组测序,以鉴定与肿瘤相关的体细胞突变。

[0195] 在一些实施方案中,遵循标准组织处理方案和测序方案从一个或多个患者活检样

品获得组学数据。在特定实施方案中，数据是患者匹配的肿瘤数据(例如，肿瘤相比于同一患者正常情况)。在一些情形中，相比于其他参考(例如，先前同一患者正常情况或先前同一患者肿瘤，或同类统计资料(homo statisticus))的不匹配或匹配也被认为适用于本文中。组学数据可以是最新的组学数据或从先前程序(或甚至不同患者)获得的组学数据。例如，可以在第一步骤中通过对肿瘤活检(或淋巴活检或转移部位的活检)和匹配的正常组织(即，来自同一患者的未患病组织，如外周血)的全基因组和/或外显子组分析从患者肿瘤鉴定新表位。在一些实施方案中，基因组分析可以经由对如此获得的组学信息进行位置指导的同步比较来处理。

[0196] 基因组分析可以通过许多分析方法来进行。在特定实施方案中，所述方法包括使用下一代测序(如大规模平行测序方法、离子激流测序、焦磷酸测序)对肿瘤和匹配的正常样品两者的WGS(全基因组测序)和外显子组测序。对序列数据的计算分析可以以多种方式来进行。在一些实施方案中，数据格式呈SAM、BAM、GAR或VCF格式。作为例子，可以在电脑中通过对肿瘤和正常样品的位置指导的同步比对来进行分析，如例如在使用BAM文件和BAM服务器的US 2012/0059670A1和US 2012/0066001 A1中所披露。还考虑了用于序列分析的替代文件格式(例如，SAM、GAR、FASTA等)。

[0197] 在任何实施方案的一些实施方案中，包含由错义突变产生的新抗原的肽(P)涵盖由1个或多个核苷酸多态性编码的氨基酸变化。包含由移码突变、剪接位点变异、插入、倒位和缺失产生的新抗原的肽(P)应当涵盖新型肽序列和新型肽序列的接点。包含具有新型翻译后修饰的新抗原的肽(P)应当涵盖带有一种或多种翻译后修饰(如磷酸酯或聚糖)的氨基酸。

[0198] 一旦鉴定出这些突变，则鉴定出新表位。新表位是由患者的T细胞识别的突变型肽。这些新表位必须由肿瘤或抗原呈递细胞通过MHC复合物呈递，然后由T细胞上的TCR识别。在一些实施方案中，所提供的方法包括计算一个或多个新表位以定义为肿瘤和患者特有的新表位的步骤。因此，应当认识到，可以在仅电脑环境中从组学信息鉴定患者和癌症特有的新表位，从而最终预测为患者和肿瘤类型独有的潜在表位。在特定方面，如此鉴定的癌症新表位是患者以及患者的特定癌症独有的(例如，在被诊断为患有相同癌症的癌症患者群体中，频率占所有新表位的小于0.1％，并且更通常地小于0.01％)，但是如此鉴定的癌症新表位具有在肿瘤中被呈递的高可能性。

[0199] 在任何实施方案的一些实施方案中，肽(P)的长度取决于具体应用并且通常在约5至约50个氨基酸之间。在优选实施方案中，肽(P)在约7至35个氨基酸之间，例如7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸。在一些方面，所述方法可以用单独肽进行，所述单独肽包括氨基酸序列的一个或多个变化(例如突变)。在一些方面，所述方法可以用肽池进行，其中所述池中的肽含有氨基酸序列的一个或多个变化(例如突变)。肽池可以包括数十种至数百种单独肽。在一些情形中，肽池包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100种或更多种单独肽，或者任何前述值之间的任何值。肽池可以代表一种新抗原或者可以代表几种新抗原。在一些情形中，肽池可以包括同一新抗原的多个重叠肽。因此，对于肿瘤相关抗原，可以将抗原分为7至35个氨基酸(例如，25个氨基酸)的肽(P)，其中每个肽(P)含有独特的氨基酸组成；或者，肽(P)可以是重叠肽池，其中抗原被分为一定数量的7至

35个氨基酸(例如,25个氨基酸)的具有重叠序列的肽(P)。例如,可以将构成100个氨基酸的抗原的重叠肽池分为八个25个氨基酸的肽(P),每个肽偏移12个氨基酸(即,构成100个氨基酸的肽序列的每个后一个25个氨基酸的肽始于前一个肽的第13个氨基酸位置)。本领域技术人员应理解,存在许多排列用于从抗原产生肽池。

[0200] 可以将如本文所考虑的新表位序列定义为具有相对较短长度的序列延伸段(例如,5-30聚体,更通常地7-11聚体或12-25聚体),其中此类延伸段包括氨基酸序列的一个或多个变化(例如突变)。最通常地,所述一个或多个变化位于中心或中心附近(例如,距中心位置少于4个、或少于5个、或少于6个氨基酸)。在特定方面,本文所考虑的新表位序列将尤其包括如下那些新表位序列,其中相对于匹配的正常序列交换单个氨基酸,并且其中变化的氨基酸的位置位于新表位序列的中心或中心附近(例如,在9聚体中,变化的氨基酸位于位置2、3、4或5,并且更通常地位于位置3、4或5,并且最通常地位于位置4或5)。应当理解,在包括变化的氨基酸的多个新表位序列中可能存在单个氨基酸变化,根据变化的氨基酸的位置而定。

[0201] 在特定实施方案中,将计算新表位以具有2-50个氨基酸之间、更通常地5-30个氨基酸之间、并且最通常地9-15个氨基酸之间的长度。例如,在待由MHC-I复合物呈递表位的情况下,典型表位长度将是约8-11个氨基酸,而经由MHC-II复合物呈递的典型表位长度将具有约13-17个氨基酸的长度。如应易于理解的,由于变化的氨基酸在新表位中的位置可能并非中心,因此新表位的实际肽序列以及随之的实际拓扑学可能显著变化。此外,在将新表位作为合成肽呈递至免疫感受态(或其他)细胞的情况下,应当理解,合成肽可以显著长于MHC-I或MHC-II系统最终结合的肽部分,从而允许细胞中的蛋白质水解处理。例如,所考虑的合成肽可以因此具有在变化的氨基酸的上游和下游8与15个之间的氨基酸。

[0202] 在一些实施方案中,可以合成长肽用于使用电穿孔脉冲至抗原呈递细胞中。然后可以通过待由CD8细胞识别的抗原呈递细胞来呈递长肽。长肽适合于通过用于由CD8细胞识别的MHC I类限制性分子来表达。通常,对于用于由CD4细胞识别的MHC II类限制性分子,长肽不起作用。在一些情形中,MHC II类限制性分子必须作为编码突变DNA的基因来呈递,并且被电穿孔至抗原呈递细胞中。

[0203] 已经开发出多种算法并且可以用于将T细胞表位(MHC I类和II类限制性两者)映射至各种起源的蛋白质分子内。在一些实施方案中,许多程序利用来自实验测量的大规模肽-MHC结合亲和力矩阵的可用性,来训练基于机器学习(ML)的分类器区分MHC结合物与非结合物(参见例如,Zhao等人(2018)PLoS Comput Biol 14(11):e1006457)。用于MHC I类(例如9聚体)的示例性预测方法包括smm、smmpmbec、ann(NetMHC3.4)、NetMHC4、PickPocket、共有序列、NetMHCpan2.8、NetMHCpan3、NetMHCpan4、NetMHCcons、mhcflurry、mhcflurry_pan或MixMHCpred。用于MHC II类(例如15聚体)的示例性预测方法包括NetMHCIIpan、NetMHCII2.3、nn_align、smm_align、共有序列、comblib、tepitope或mhcflurry。可以使用任何此类方法。

[0204] 在使用合成肽进行直接MHC-I结合的实施方案中,总长度将在8与10个氨基酸之间。在使用合成肽进行直接MHC-II结合的实施方案中,总长度将在12与25个氨基酸之间,如14与20个氨基酸之间。在一些情形中,在MHC呈递之前在细胞中处理合成肽(通常通过蛋白酶体处理)的情况下,总长度通常将在10与40个氨基酸之间,其中变化的氨基位于合成肽的

中心位置处或附近。在一些实施方案中，用于MHC-I结合的肽是9聚体。在一些实施方案中，用于MHC-II结合的肽是23聚体。在一些实施方案中，用于MHC-II结合的肽是25聚体。

[0205] 作为例子，肽(P)可以在侧接由于突变产生的氨基酸变化或新型接点的任一侧包括0-25个氨基酸。在一个实施方案中，肽(P)是在侧接由单核苷酸多态性产生的氨基酸变化的任一侧包含12个氨基酸的新抗原序列，例如，25个氨基酸的肽，其中第13个氨基酸是得自单核苷酸多态性的氨基酸残基。在一些实施方案中，肽(P)是在侧接具有新型翻译后修饰的氨基酸的任一侧包含12个氨基酸的新抗原序列，例如，25个氨基酸的肽，其中第13个氨基酸是得自新翻译后修饰位点的氨基酸残基。在其他实施方案中，肽(P)是在侧接通过插入、缺失或倒位产生的新型接点的任一侧包含0-12个氨基酸的新抗原序列。在一些情形中，包含得自新型序列的新抗原的肽(P)可以涵盖整个新型序列，其在也可能出现的新型接点的任一侧包括0-25个氨基酸。

[0206] 在一些实施方案中，可以基于癌症和患者特有的突变对如此鉴定的序列差异进行进一步下游分析，以鉴定导致新肽序列的那些序列差异。因此，新表位可以通过考虑突变的类型(例如，缺失、插入、颠换、转换、易位)和影响(例如，无义、错义、移码等)来鉴定，并且可以因此用作内容过滤器，经由其消除沉默和其他无关(例如，非表达)突变。

[0207] 在一些实施方案中，可以针对所鉴定的患者HLA类型在电脑中进一步过滤所鉴定的新表位。此种HLA匹配被认为确保新表位与有核细胞的MHC-I复合物以及特定抗原呈递细胞的MHC-II复合物的强结合。靶向两种抗原呈递系统特别被认为产生治疗有效且持久的免疫反应，所述免疫反应涉及免疫系统的细胞和体液两个分支。还应当理解，由此鉴定的HLA匹配的新表位可以在体外以生化方式验证。

[0208] MHC-I和MHC-II两者的HLA确定可以使用多种方法来进行。在一些实施方案中，可以使用含有大多数或所有已知和/或常见HLA类型的参考序列在电脑中从组学数据预测HLA类型。例如，查明患者的HLA类型(使用湿法化学或电脑确定)，并且从数据库计算或获得HLA类型的结构方案，然后将其在电脑中用作对接(docking)模型以确定新表位与HLA结构方案的结合亲和力。用于确定结合亲和力的合适系统包括NetMHC平台(参见例如，Nucleic Acids Res.2008年7月1日;36(Web Server issue):W509-W512.)、HLAMatchmaker(http://www.epitopes.net/downloads.html)和IEDB Analysis Resource(http://tools.immuneepitope.org/mhcii/)。然后选择针对先前确定的HLA类型具有高亲和力(例如，对于MHC-I，小于100nM、小于75nM、小于50nM;对于MHC-II，小于500nM、小于300nM、小于100nM)的新表位。在计算最高亲和力时，可以通过将N末端和/或C末端修饰添加至表位中来实现对新表位的修饰，以进一步增加合成新表位与患者的HLA类型的结合。因此，新表位可以是如所鉴定的天然的，或者被进一步修饰以更好地匹配特定HLA类型。在一些实施方案中，可以基于等位基因频率乘以每百万转录物数量对新表位进行评分/评级，以得到似然度得分。然后可以使用HLA信息以及与患者HLA类型的计算或实际结合亲和力进一步增大此得分。

[0209] 所提供的实施方案包括如下实施方案，其中将新表位与含有已知人序列的数据库进行比较，从而避免使用与人相同的序列。

[0210] 在电脑中鉴定合适的新表位序列后，然后在体外制备相应的合成肽(例如，使用固相合成)。在特定实施方案中，制备代表来自受试者的多个不同新表位的合成肽文库。文库

可以包括100、1000、10000种或更多种不同的肽。为了获得针对一个或多个所鉴定的新表位的合成抗体，考虑在体外制备电脑鉴定者以产生合成肽。

[0211] 多种方法可以用于制备合成肽。例如，可以在固相上(例如，使用Merrified合成)、经由液相合成或者从较小肽片段来制备具有癌症新表位序列的肽。可以通过化学合成使用市售自动化肽合成仪获得肽表位。在一些实施方案中，可以例如通过使用由Lu等人(1981).J.Org.Chem.46,3433以及其中的参考文献披露的固相肽合成的Fmoc-聚酰胺模式来合成肽。在一些方面，可以通过在合适的宿主中并用合适的表达系统表达重组核酸来产生肽。在一些方面，可以使用重组方法，其中多个新表位位于单条肽链上，如在新表位或切割位点之间具有间隔子。

[0212] 可以通过任何一种技术或技术的组合纯化肽，所述技术如重结晶、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、疏水相互作用色谱以及使用例如乙腈/水梯度分离的反相高效液相色谱。在一些实施方案中，可以将肽沉淀，并且例如通过高效液相色谱(HPLC)进一步纯化。肽的分析可以使用如下方式来进行：薄层色谱、电泳(特别是毛细管电泳)、固相提取(CSPE)、反相高效液相色谱、酸水解后的氨基酸分析、以及通过快原子轰击(FAB)质谱分析、以及MALDI和ESI-Q-TOF质谱分析。

B.T细胞群的选择和刺激

[0213] 所提供的方法包括从生物样品获得并富集或选择T细胞群，以用作第一或输入T细胞群。在一些情形中，第一T细胞群是已知或可能含有如下T细胞的群体，所述T细胞对肿瘤抗原具有反应性或者能够对肿瘤抗原具有反应性，如在与肿瘤抗原的自体来源离体共培养后。例如，通常，第一T细胞群来自肿瘤的生物样品或者已知或可能患有肿瘤的受试者的生物样品。在特定实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂(例如一种或多种重组细胞因子，如IL-2)，以及在一些情形中一种或多种T细胞佐剂进一步刺激第一T细胞群，以产生含有已经在刺激后扩增的T细胞的第二或经刺激的T细胞群。

[0214] 在一些情形中，用于通过用一种或多种T细胞刺激剂以及在一些情形中一种或多种T细胞佐剂进行培养来刺激T细胞的条件导致存在于第一或输入T细胞群中的T细胞的扩增或长出(outgrowth)。在一些实施方案中，用于用一种或多种T细胞刺激剂以及在一些情形中一种或多种T细胞佐剂刺激T细胞的条件可以包括在导致T细胞大量扩增的条件下培养T细胞。在其他特定实施方案中，用于刺激T细胞的条件可以包括在一定条件下培养T细胞，所述条件的进行导致所需T细胞的优先或有利的富集或长出，同时最小化或减少可能不需要的某些T细胞子集。例如，如本文所提供的某些培养条件可以用于下调或减少调节性(Treg)细胞的存在或活性，同时维持并且从而富集传统的T辅助细胞或细胞毒性T细胞。在特定实施方案中，所提供的方法包括用某些调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35)的培养条件，与仅用重组IL-2培养细胞的条件相比，所述培养条件可以增加或富集作为幼稚或中枢记忆T细胞的经扩增的细胞。

[0215] 在所提供的方法中，然后将经刺激的T细胞组合物用于富集和扩增肿瘤反应性T细胞的后续下游步骤中，包括如下步骤，所述步骤包括在T细胞新表位(经突变的)肽抗原的存在下将经刺激的T细胞与抗原呈递细胞(APC)共培养，以产生、得到或挑出作为肿瘤反应性T细胞的T细胞。在特定实施方案中，所提供的方法还可以包括在将T细胞与APC/肽新表位共培养后选择或富集对肿瘤抗原具有反应性的T细胞(肿瘤反应性T细胞)的步骤。可以在用于

扩增的条件下培养肿瘤反应性T细胞群,如以产生治疗性T细胞组合物。

[0216] 在特定实施方案中,T细胞包括来自受试者(如人类受试者)的原代T细胞。在一些实施方案中,受试者是健康受试者。在一些实施方案中,受试者患有肿瘤。在所提供的方法中,可以从来自受试者的生物样品选择或富集T细胞,如用于在所提供的方法中使用的输入T细胞群。多种方法可以用于培养具有抗原特异性的细胞,参见例如美国公开的申请号US2017/0224800。

[0217] 在一些实施方案中,生物样品是来自患有肿瘤的受试者的样品,已知所述样品含有或所述样品可能含有肿瘤反应性T细胞,所述样品的此类T细胞已经在体内暴露于肿瘤新抗原或者被肿瘤新抗原激活。在一些实施方案中,从生物样品选择T细胞进一步包括富集或选择肿瘤反应性T细胞或表达与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种激活标记物的T细胞。T细胞激活标记物包括其表达被上调或为已经暴露于抗原并被激活的T细胞特有的细胞表面标记物。示例性标记物描述于下文章节I.D.中。

[0218] 在所提供的任何方法的方面,在一种或多种T细胞刺激剂的存在下孵育输入或第一T细胞群。在特定实施方案中,在所述一种或多种T细胞刺激剂激活或刺激细胞或者促进存在于输入或第一T细胞群中的T细胞的扩增的条件下进行孵育。

[0219] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激性细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子包括单独的或与来自IL-7、IL-15和/或IL-21的另一种细胞因子组合的IL-2。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子包括单独的或与来自IL-7、IL-15和/或IL-21的另一种细胞因子组合的IL-15。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子是IL-15。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子是IL-7和IL-15。在所提供的实施方案中,用来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-25的至少一种另外的调节细胞因子进行孵育,如章节II.A中所述。

[0220] 在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用接合CD3和共刺激分子(如CD28)的一种或多种药剂进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用抗CD3抗体(如OKT3)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用由APC呈递、固定在固体表面(例如珠)上或作为可溶性抗体的抗CD3(例如OKT3)/抗CD28抗体进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用可溶性抗CD3(如OKT3)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用抗CD3/抗CD28(包括固定在珠上的此类试剂,例如如由Dynabead提供)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用APC(如经辐照的APC)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用非分裂的PBMC(如经辐照的PBMC)进行孵育。

[0221] 所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括接合CD3和共刺激分子(如CD28)的一种或多种药剂。所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括抗CD3抗体(如OKT3)和抗CD28药剂(由APC呈递或作为可溶性抗体)。在实施方案中,在将T细胞与APC共培养的至少一部分之前和/或期间,在一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3(例如OKT3)/抗CD28抗体)的存在下孵育选自生物样品的T细胞(输入群体)。因此,在APC的存在下共培养之前或在选择反应性细胞之后,用淋巴细胞的一种或多种T细胞刺激剂(如但不限于抗CD3抗体(例如OKT3)和抗CD28(由APC呈

递或作为可溶性抗体))孵育T细胞,以产生包括经激活的或经刺激的T细胞的第二T细胞群。在特定实施方案中,在孵育期间,一种或多种重组细胞因子也作为另外的T细胞刺激剂而存在。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育包括用至少一种T细胞刺激性重组细胞因子(例如重组IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)以及接合T细胞上的CD3和/或共刺激分子(例如CD28)的另外一种或多种T细胞刺激剂进行孵育。

[0222] 在一些实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂进行孵育是直接对选自来自受试者的生物样品的T细胞的输入群体(或第一群体)进行,其中用所述一种或多种T细胞刺激剂孵育选自生物样品的T细胞群(例如来自受试者的自体T细胞)。在其他实施方案中,T细胞的输入群体(第一群体)包括富集可能是或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞,其中针对对在经激活的T细胞上上调的表面标记物(例如4-1BB或OX40)呈阳性的细胞进一步选择选自来自受试者的生物样品的T细胞。在此类实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂进行的孵育是在富集包含肿瘤反应性T细胞的T细胞群之后进行的。在所提供的实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂进行的孵育是在将此类T细胞(经刺激的T细胞)与APC/肽新表位共培养之前进行的。

[0223] 在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂(例如重组IL-2)进行孵育可以继续足以激活或刺激细胞的时间段。在一些实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂(例如重组IL-2)进行的孵育进行为或约1天,如通常是为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或任何前述时间之间的任何时间范围。在一些实施方案中,孵育进行7-10天。在一些实施方案中,孵育持续为或约7天。在一些实施方案中,孵育持续为或约8天。在一些实施方案中,孵育持续为或约9天。在一些实施方案中,孵育持续为或约10天。在一些实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂(例如重组IL-2)进行的孵育持续12小时至96小时,如24小时至48小时,并且通常是为或约48小时。

[0224] 在一些实施方案中,在孵育或培养期间洗涤细胞一次或多次,以去除在培养期间存在的药剂和/或向培养基补充一种或多种另外的药剂。在一些实施方案中,在孵育或培养期间洗涤细胞,以在培养完成之前减少或去除所述一种或多种T细胞刺激剂以及任选地一种或多种T细胞佐剂。

[0225] 在一些实施方案中,本文所提供的培养T细胞的方法包括在适合于人T淋巴细胞生长的温度(例如,至少约25摄氏度,通常是至少约30度,并且通常是为或约37摄氏度)下用一种或多种T细胞刺激剂以及任选地用T细胞佐剂进行孵育。在一些实施方案中,培养或孵育方法在无血清培养基中进行。

1.选择T细胞群

[0226] 所提供的方法包括从可以用作T细胞的来源或输入的生物样品选择或获得T细胞群,用于用一种或多种T细胞刺激剂(例如重组IL-2),以及在所提供的实施方案中还用T细胞调节剂或佐剂或其他药剂(如来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的T细胞调节细胞因子和/或免疫抑制阻断剂)进行刺激。在一些实施方案中,T细胞来自受试者的已知或可能含有肿瘤反应性T细胞的生物样品。所收集的生物样品含有或怀疑含有具有对肿瘤上存在的突变具有反应性的内源TCR的淋巴细胞。

[0227] 在所提供的任何实施方案的方面,获得来自受试者(如来自目的患者,即怀疑患有或已知患有癌症的患者)的合适的生物样品。在一些实施方案中,样品是已知或怀疑含有T

细胞的样品，所述T细胞如可以或可能表达对肿瘤相关抗原具有特异性、结合或识别所述肿瘤相关抗原的内源T细胞受体(TCR)的T细胞。样品可以源自任何可能含有或怀疑含有此类T细胞的初始来源。在一些方面，目的生物样品来源包括但不限于许多不同的生理来源，例如组织源样品(例如匀浆)和血液或其衍生物。

[0228] 多种样品中的任何一种可以用作潜在反应性T细胞的来源。尽管肿瘤和下游淋巴结可能具有最高频率的反应性T细胞(Powell等人,Clin.Cancer.Res.,2014)，但也可以使用其他样品来源。在一些情形中，样品是肿瘤样品、三级淋巴部位、引流淋巴结、外周血或骨髓。在一些实施方案中，样品是肿瘤样品。在一些实施方案中，样品是淋巴样品。在一些实施方案中，样品是外周血样品。

[0229] 样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品，以及得自一个或多个处理步骤(如分离(例如选择或富集)、离心、洗涤和/或孵育)的样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或被处理的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品，包括源自它们的处理样品。

[0230] 在一些方面，样品是血液或血液源样品，或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单个核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰腺、乳房、骨、前列腺、宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自它们的细胞。在细胞疗法(例如，过继细胞疗法)的背景下，样品包括来自自体和同种异体来源的样品。

[0231] 在许多实施方案中，样品可以源自至少怀疑存在目的T细胞的流体。在许多实施方案中，样品的合适的初始来源是血液。在一些实施方案中，生物样品是血液源样品。血液源样品可以源自全血或其部分，例如血清、血浆等，其中在许多实施方案中，样品源自从全血收获的血细胞。在一些方面，样品来源含有单核细胞。例如，生物样品是或含有外周血单个核细胞(PBMC)，或者源自PBMC。

[0232] 在样品是PBMC源样品的一些实施方案中，样品通常是流体PBMC源样品。可以采用用于产生流体PBMC样品的任何便捷方法。在许多实施方案中，通过从全血分离PBMC(即，收集PBMC)来制备流体PBMC源样品，例如通过离心(如通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心，其中用于此类分离程序的代表性方案披露于WO 98/15646和美国专利号5,985,565中)。

[0233] 在一些实施方案中，样品是肿瘤样品，并且由此提供肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的来源。在一些方面，TIL是已经离开受试者的血流并且移动至肿瘤中或浸润肿瘤的T细胞。在特定方面，TIL对肿瘤抗原具有反应性。

[0234] 可以通过多种方法中的任何一种获得患者肿瘤样品，其中所述方法获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品。在一些实施方案中，通过手术切除获得肿瘤样品。在一些实施方案中，通过针刺活检获得肿瘤样品。通常，肿瘤样品可以来自任何实体瘤，包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移肿瘤。肿瘤样品也可以是液体瘤，如从血液恶性肿瘤获得的肿瘤。实体瘤可以属于任何癌症类型，包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌(胃肠癌)和皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑色素瘤)。在特定实施方案中，肿瘤是如章节IV中描述的任何一种。在一些实施方案中，肿瘤样品来自与用于鉴定用于制备肽新表位的新抗原相同的肿瘤来源。

[0235] 在所提供的实施方案中，将所获得的肿瘤样品破碎成小块，其大小在为或约1mm^{3}与为或约8mm^{3}之间，如在为或约1mm^{3}与为或约6mm^{3}之间、在为或约1mm^{3}与为或约4mm^{3}之间、在为或约1mm^{3}与为或约2mm^{3}之间。在一些实施方案中，肿瘤碎片是约2-3mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片是约1-2mm^3。在一些实施方案中，通过物理破碎(如通过剥离)获得肿瘤碎片。在一些实施方案中，通过锐剥离获得肿瘤碎片。

[0236] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，将所获得的肿瘤样品破碎成小块，其直径在为或约1mm与为或约8mm之间，如直径在为或约1mm与为或约6mm之间，直径在为或约1mm与为或约4mm之间，直径在为或约1mm与为或约2mm之间。在一些实施方案中，肿瘤碎片的直径是约2-3mm。在一些实施方案中，肿瘤碎片的直径是约1-2mm。在一些实施方案中，通过物理破碎(如通过剥离)获得肿瘤碎片。在一些实施方案中，通过锐剥离获得肿瘤碎片。

[0237] 在一些实施方案中，在破碎前将肿瘤样品冷冻保存。在一些实施方案中，将肿瘤碎片冷冻保存。

[0238] 在一些实施方案中，在维持T细胞扩增的条件下并且在有维持T细胞扩增的适当营养素的情况下，如在小节I.B.2下描述的用于刺激T细胞的任何条件，以及任选地在一种或多种另外的调节剂或佐剂如T细胞调节细胞因子(例如重组IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)和/或免疫抑制阻断剂的存在下，将所获得的肿瘤碎片置于培养基中。在一些实施方案中，将1至500个肿瘤碎片(例如各自的大小为1-8mm)在用于扩增的条件下置于适当培养器皿中。在一些实施方案中，在用于扩增的条件下培养10、20、30、40、50个或更多个碎片。培养器皿可以是微孔、烧瓶、管、袋或其他封闭系统装置。在一些实施方案中，培养器皿是提供透气性表面区域的封闭容器，如透气性烧瓶。提供透气性表面区域的示例性培养器皿包括G-Rex板或烧瓶。在一些实施方案中，对于培养器皿的每个约2cm^{2}区域，放置1个肿瘤碎片(直径为约1-8mm)。可以基于可用肿瘤碎片的数量和/或所需的细胞产量来选择特定培养器皿。可以通过线性缩放接种至培养器皿的表面区域的碎片数量来选择培养器皿(例如G-Rex)的选择。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约2cm^2(例如G-Rex 24孔板)，并且将约1个肿瘤碎片(直径为约1-8mm)置于培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约10cm^2(例如G-Rex 10或G-Rex 10M)，并且将约5个肿瘤碎片(各自的直径为约1-8mm)置于培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约100cm^2(例如G-Rex 100M/100M-CS)，并且将约50个肿瘤碎片(各自的直径为约1-8mm)置于培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约500cm^2(例如G-Rex 500M/500M-CS)，并且将约250个肿瘤碎片(各自的直径为约1-8mm)置于培养器皿中。在所提供的方法的方面，与涉及较小培养器皿和/或每个器皿较少碎片的方法相比，增加培养器皿的大小并因此增加每个器皿的肿瘤碎片数量可以降低变异性，如通过汇集更多数量的碎片以使碎片之间的肿瘤间变异性最小化。

[0239] 在一些实施方案中，使用在小节I.B.2下描述的任何条件，以及任选地在一种或多种另外的调节剂或佐剂如T细胞调节细胞因子(例如重组IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)和/或免疫抑制阻断剂的存在下，将肿瘤碎片置于培养基中以刺激细胞。在一些实施方案中，培养基是无血清培养基，其含有来自IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的重组细胞因子，如重组IL-2或重组IL-7和IL-15。可以选择用于孵育的重组细胞因子的特定浓度以促进T细胞扩增和维持T细胞活力。下文进一步描述了用于在所提供方法中使用的示例性T细胞刺激细胞因子浓度。在特定实施方案中，培养基是含有重组IL-2(如以为或约300IU/mL至为或约

1000IU/mL,例如为或约300IU/mL的浓度添加)的无血清培养基。在一些实施方案中,培养基是含有抗CD3抗体和/或CD28靶向剂(例如抗CD28抗体)和一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的无血清培养基。在一些实施方案中,培养基含有如章节II中描述的一种或多种另外的T细胞刺激激动剂或细胞凋亡抑制剂。根据所提供的方法,培养基还可以含有一种或多种调节细胞因子(例如IL-23、IL-25、IL-27和/或IL-35)和/或一种或多种其他免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)。

[0240] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及从肿瘤碎片获得细胞,如通过对肿瘤碎片进行酶促消化以获得TIL。在这样的例子中,与肿瘤碎片相反,在一种或多种T细胞刺激剂的存在下培养悬浮细胞。酶促消化可以使用胶原酶(如IV型胶原酶或I/II型胶原酶)来进行。酶(如胶原酶)可以以如下浓度存在于培养基中用于酶促消化:为或约1mg/mL至为或约5mg/mL,如为或约1mg/mL、为或约2mg/mL、为或约3mg/mL、为或约4mg/mL或者为或约5mg/mL,或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中,酶促消化是用包括IV型胶原酶(如为或约1mg/mL至为或约5mg/mL)的培养基。在一些实施方案中,酶促消化是用包括I/II型胶原酶(如为或约1mg/mL至为或约5mg/mL)的培养基。在其他实施方案中,可以使用来自Miltenyi人肿瘤解离试剂盒的酶(例如目录号130-095-929;Miltenyi Biotec)。含有酶的酶培养基可以是无血清培养基,如如所述的任何一种。在特定实施方案中,酶培养基包括胶原酶,例如Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640缓冲液、2mM谷氨酸盐(例如GlutaMAX)、10mg/mL庆大霉素、30个单位/mL的DNA酶和1.0mg/mL胶原酶。在一些实施方案中,酶培养基包括无血清培养基(例如OpTmizer),其含有2mM谷氨酸盐(例如GlutaMAX)、10μg/mL庆大霉素、免疫细胞血清替代物(例如CTS免疫细胞血清替代物)和1.0mg/mL至5.0mg/mL胶原酶。在一些实施方案中,胶原酶是IV型胶原酶。在一些实施方案中,胶原酶是I/II型胶原酶。

[0241] 然后例如使用组织解离器将肿瘤碎片机械剥离以解离TIL。可以通过如下方式产生肿瘤消化物:将肿瘤置于酶培养基中并机械解离肿瘤大约1分钟,之后在37℃下在5%CO_2中孵育30分钟,之后在前述条件下重复机械解离和孵育循环,直至只有小组织块存在。在此过程结束时,如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞,可以使用FICOLL进行密度梯度分离以去除这些细胞。可以使用本领域已知的替代方法,如美国专利申请公开号2012/0244133Al中描述的那些方法,将其公开内容通过引用并入本文。任何前述方法都可以用于本文所述的用于获得用于在所提供的方法中使用的TIL的方法的任何实施方案中。

[0242] 在一些实施方案中,在维持T细胞扩增的条件下并且在有维持T细胞扩增的适当营养素的情况下,如在小节I.B.2下描述的用于刺激T细胞的任何条件,以及任选地在一种或多种另外的调节剂或佐剂如T细胞调节细胞因子(例如重组IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)和/或免疫抑制阻断剂的存在下,将从肿瘤碎片消化的细胞置于培养基中。以适合于特定培养器皿的特定密度接种细胞。培养器皿可以是微孔、烧瓶、管、袋或其他封闭系统装置。在一些实施方案中,培养器皿是提供透气性表面区域的封闭容器,如透气性烧瓶。提供透气性表面区域的示例性培养器皿包括G-Rex板或烧瓶。在一些实施方案中,对于培养器皿的每个约2cm^2区域,接种经酶促消化的单细胞悬浮液的大约5x10^5至2x10^6个细胞。可以基于可用细胞的数量和/或所需的细胞产量来选择特定培养器皿。可以通过线性缩放接种至培养器皿的表面区域的细胞数来选择培养器皿(例如G-Rex)的选择。在一些实施方案中,培养器皿的表面区域是约2cm^2(例如G-Rex24孔板),并且将经酶促消化的单细胞悬浮液的约5x10^5至2x10^6

个细胞置于培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约10cm^2(例如G-Rex10或G-Rex10M)，并且将经酶促消化的单细胞悬浮液的约2.5x10^6至1x10^7个细胞置于培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约100cm^2(例如G-Rex100M/100M-CS)，并且将经酶促消化的单细胞悬浮液的约2.5x10^7至1x10^8个细胞置于培养器皿中。在一些实施方案中，培养器皿的表面区域是约500cm^2(例如G-Rex500M/500M-CS)，并且将经酶促消化的单细胞悬浮液的约1.25x10^8至5x10^8个细胞置于培养器皿中。

[0243] 在一些实施方案中，培养基是无血清培养基，其含有来自IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的重组细胞因子，如重组IL-2或重组IL-7和IL-15。可以选择用于孵育的重组细胞因子的特定浓度以促进T细胞扩增和维持T细胞活力。下文进一步描述了用于在所提供方法中使用的示例性T细胞刺激细胞因子浓度。在特定实施方案中，培养基是含有重组IL-2(如以为或约300IU/mL至为或约1000IU/mL，例如为或约300IU/mL的浓度添加)的无血清培养基。在一些实施方案中，培养基是含有抗CD3抗体和/或CD28靶向剂(例如抗CD28抗体)和一种或多种重组细胞因子(例如IL-2)的无血清培养基。在一些实施方案中，培养基含有如章节II中描述的一种或多种另外的T细胞刺激激动剂或细胞凋亡抑制剂。根据所提供的方法，培养基还可以含有一种或多种调节细胞因子(例如IL-23、IL-25、IL-27和/或IL-35)和/或一种或多种其他免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)。

[0244] 可以从多个不同的受试者/患者/宿主获得样品。通常，此类宿主是“哺乳动物(mammal)”或“哺乳动物(mammalian)”，其中这些术语被广泛用于描述哺乳纲内的生物，包括食肉目(例如，狗和猫)、啮齿目(例如，小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长目(例如，人、黑猩猩和猴)。在许多实施方案中，宿主将是人。

[0245] 在一些方面，受试者是人。因此，在一些实施方案中，细胞是原代细胞，例如原代人细胞。在一些实施方案中，样品对于待治疗的受试者是自体的，所述受试者如作为需要特定治疗干预(如根据所提供的方法分离、处理和/或扩增细胞所用于的过继细胞疗法)的患者的受试者。在一些实施方案中，样品对于待治疗的受试者是同种异体的。

[0246] 在一些实施方案中，可以通过多种方式富集或分选用于与所提供的方法结合使用的T细胞，所述方式包括但不限于磁珠分离、荧光细胞分选和基于一次性封闭盒的细胞分选仪。在特定方面，可以使用对T细胞或其子集具有特异性的一种或多种试剂，如对用于选择反应性细胞的T细胞激活标记物具有特异性的试剂，包括但不限于细胞选择设备(但不限于CliniMACS、Sony FX500或Tyto细胞分选系统(Miltenyi))上的荧光抗体、纳米颗粒或珠。

[0247] 在一些方面，可以从生物样品选择T细胞，如基于T细胞标记物CD3、CD4或CD8。在一些实施方案中，选择对一种或多种细胞表面标记物呈表面阳性的T细胞包括基于此类标记物分离的任何方法。

[0248] 在一些实施方案中，分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如，在一些方面，分离包括基于一种或多种标记物(通常是细胞表面标记物)在细胞中的表达或表达水平来分离细胞和细胞群，例如通过用与此类标记物特异性结合的抗体或结合配偶体进行孵育，之后通常进行洗涤步骤并将已经结合所述抗体或结合配偶体的细胞与尚未结合至所述抗体或结合配偶体的那些细胞分离。在一些实施方案中，基于免疫亲和力的选择包括使包含细胞的样品如包含含有CD3+T细胞或CD4+和CD8+细胞的大量T细胞(例如原代人T细胞)群体的样品与特异性结合至一种或多种细胞表面标记物的抗体或结合配偶体接触。在一些实

施方案中,抗体或结合配偶体结合至固体支持物或基质(如球或珠,例如纳米颗粒、微珠、纳米珠,包括琼脂糖、磁珠或顺磁珠),以允许分离细胞用于阳性和/或阴性选择。在一些实施方案中,可以将球或珠填充至柱中以实现免疫亲和色谱,其中使包含含有CD3+T细胞或CD4+和CD8+细胞的细胞(如原代人T细胞)的样品与柱的基质接触,随后从所述柱洗脱或释放。在其他实施方案中,抗体或结合配偶体被可检测地标记。

[0249] 在一些方面,用小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如纳米颗粒或顺磁珠))孵育待分离的细胞的样品或组合物。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与期望分离(例如,期望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记物)特异性结合。此类珠是已知的并且可从多种来源购得,在一些方面,所述来源包括Dynabeads®(Life Technologies,加利福尼亚州卡尔斯巴德)、MACS®珠(Miltenyi Biotec,加利福尼亚州圣地亚哥)或Streptamer®珠试剂(IBA,德国)。在一些方面,将样品置于磁场中,并且附着有磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引至磁体并与经未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被吸引至磁体的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未经标记的细胞)。

[0250] 在某些实施方案中,使样品与特异性结合至细胞表面标记物的结合剂(例如,可检测标记的结合剂)接触。在某些实施方案中,对所述一种或多种可检测标记的结合剂进行荧光标记。在某些实施方案中,通过流式细胞术来鉴定用对细胞表面标记物具有特异性的结合剂标记的T细胞。在某些实施方案中,所述方法进一步包括将用所述一种或多种结合剂标记的任何所得T细胞与样品的其他组分分离,以产生富集对所述一种或多种细胞表面标记物呈表面阳性的T细胞的组合物。可以使用具有足够高通量的细胞选择分选设备来操作大的体积和细胞数。非限制性细胞分选设备包括例如Sony FX500或Tyto细胞分选系统(Miltenyi)。

[0251] 孵育通常在如下条件下进行,由此附着至磁性颗粒或磁珠和/或被可检测地标记的抗体或结合配偶体或者与此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果在样品内的细胞上存在)特异性结合。在一些方面,可以回收结合至抗体的细胞,或者将其与样品中的未结合细胞分离。

[0252] 在一些方面,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步处理或使其经受进一步的分离步骤。此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留尚未结合至抗体或结合配偶体的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面,在无法获得特异性鉴定异质性群体中的细胞类型的抗体,使得最好基于除了所需群体以外的细胞表达的标记物来进行分离的情况下,阴性选择可能特别有用。

[0253] 分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记物的细胞。例如,对特定类型的细胞(如表达标记物的那些细胞)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但是不需要使不表达标记物的细胞完全不存在。同样,对特定类型的细胞(如表达标记物的那些细胞)的阴性选择、去除或耗尽是指减少此类细胞的数量或百分比,但是不需要使所有此类细胞完全去除。例如,在一些方面,CD4+或CD8+群体之一的选择富集所述群体,即CD4+或CD8+群体,但是也可以含有一些残留或小百分比的其他未选择的细胞,其在一些情形中包括仍存在于经富集的群体中的CD4或CD8群体中的另一群体。

[0254] 在一些实施方案中，通过如下方式进行分离：通过阳性选择富集特定细胞群，或者通过阴性选择耗尽特定细胞群。在一些实施方案中，通过如下方式完成阳性或阴性选择：用与一种或多种表面标记物特异性结合的一种或多种抗体或其他结合剂孵育细胞，所述一种或多种表面标记物分别在阳性或阴性选择的细胞上表达(标记物$^{+}$)或以相对较高的水平表达(标记物^{高})。

[0255] 在特定实施方案中，T细胞群包括CD4+和CD8+两种T细胞。在一些情形中，从生物样品分离、选择或富集CD4+和CD8+T细胞群。许多癌症(包括实体瘤，如许多常见的上皮适应证(例如GI))表达I类和II类限制性突变。为了使T细胞产物靶向此类适应证(例如常见的上皮适应证)，预期识别I类MHC限制性分子的CD8+T细胞和识别II类MHC限制性分子的CD4+T细胞都是必要的。

[0256] 在一些实施方案中，所述方法包括分离、选择和/或富集CD3+细胞。在一些实施方案中，所述方法包括分离、选择和/或富集CD4+和CD8+细胞。在一些方面，使用$CD4^{+}$或$CD8^{+}$选择步骤(如针对CD4的阳性选择和针对CD8的阳性选择)来分离$CD4^{+}$辅助T细胞和$CD8^{+}$细胞毒性T细胞。在一些方面，此类选择是同时进行的，并且在其他方面，是以任何顺序依序进行的。在一些实施方案中，所述方法包括通过选择对CD3呈表面阳性的T细胞，或者通过依序或同时选择对CD4呈表面阳性的T细胞和对CD8呈表面阳性的T细胞，来富集CD4+和CD8+T细胞。可以通过针对如下标记物阳性或阴性选择将此类CD3+T细胞或$CD4^{+}$和/或$CD8^{+}$群体进一步分选为子群体，所述标记物在肿瘤反应性T细胞上或在具有与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞激活标记物的表达的T细胞上表达或以相对更高的程度表达，例如如章节I.D中所述。

[0257] 在一些实施方案中，细胞或群体的分离进一步包括一个或多个制备和/或不基于亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中，将细胞在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育，例如以去除不需要的组分，富集所需的组分，裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中，基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、大小、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0258] 在一些实施方案中，经选择的群体富集CD3+T细胞，并且以占群体中总细胞的如下百分比包含CD3+T细胞：大于或大于约60％、大于或大于约70％、大于或大于约80％、大于或大于约90％或者大于或大于约95％。在一些实施方案中，经选择的群体富集CD4+T细胞和CD8+T细胞，并且以占群体中总细胞的如下百分比包含CD4+T细胞和CD8+T细胞：大于或大于约60％、大于或大于约70％、大于或大于约80％、大于或大于约90％或者大于或大于约95％。在特定实施方案中，CD8+T细胞与CD4+T细胞的比率在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

[0259] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，生物样品是外周血样品，任选地单采术样品，并且其中：培养开始时的细胞数是为或约$1x10^{9}$与$7x10^{9}$之间的总活细胞；或者是为或约$1x10^{9}$个总活细胞、为或约$2x10^{9}$个总活细胞、$3x10^{9}$个总活细胞、$4x10^{9}$个总活细胞、$5x10^{9}$个总活细胞、$6x10^{9}$个总活细胞或$7x10^{9}$个总活细胞，或者任何前述值之间的任何值；和/或培养开始时肿瘤反应性T细胞的百分比在为或约0.02％与为或约40％、为或约0.02％与为或约24％、为或约0.02％与为或约18％、为或约0.02％与为或约0.9％或者为或约0.02％与为或约6.0％之间；和/或培养开始时对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的数

量是为或约$0.1x10^6$与为或约$60x10^6$之间的T细胞、$0.1x10^6$与为或约$8x10^6$之间的T细胞、$0.1x10^6$与为或约$20x10^6$之间的T细胞、$0.3x10^6$与为或约$35x10^6$之间的T细胞或者$0.3x10^6$与为或约$60x10^6$之间的T细胞;或者是为或约$0.1x10^6$个T细胞、$0.3x10^6$个T细胞、$0.6x10^6$个T细胞、$1x10^6$个T细胞、$5x10^6$个T细胞、$10x10^6$个T细胞、$35x10^6$个T细胞或$60x10^6$个T细胞,或者任何前述值之间的任何值。

[0260] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,生物样品是淋巴来源的样品或肿瘤来源的样品,并且其中:培养开始时的细胞数是为或约$10x10^6$与$100x10^6$之间的总活细胞、$20x10^6$与$100x10^6$之间的总活细胞或者$12x10^6$与$43x10^6$之间的总活细胞;或者是为或约$10x10^6$个总活细胞、为或约$12x10^6$个总活细胞、$20x10^6$个总活细胞、$40x10^6$个总活细胞、$60x10^6$个总活细胞或$100x10^6$个总活细胞,或者任何前述值之间的任何值;和/或培养开始时肿瘤反应性T细胞的百分比在为或约1%与为或约90%、为或约1%与为或约75%、为或约1%与为或约50%、为或约1%与为或约25%或者为或约1%与为或约14%之间;和/或培养开始时对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的数量是为或约$0.7x10^6$与为或约$15x10^6$之间的T细胞、$1x10^6$与为或约$15x10^6$之间的T细胞或者为或约$0.7x10^6$与为或约$5.4x10^6$之间的T细胞;或者是为或约$0.7x10^6$个T细胞、$1x10^6$个T细胞、$5.4x10^6$个T细胞或$15x10^6$个T细胞,或者任何前述值之间的任何值。

[0261] 在一些实施方案中,可以基于与经激活的T细胞相关的标记物的表达使经选择的T细胞进一步富集肿瘤反应性T细胞。用于在选择或富集此类肿瘤反应性T细胞中使用的特定标记物描述于下文章节I.D.中。在其他情形中,在所述过程的一个或多个后续步骤中进行肿瘤反应性T细胞的选择或富集,如在与一种或多种经突变的肽(肽新表位)共培养之后。

2.刺激T细胞用于初始扩增

[0262] 在所提供的方法的方面,在一种或多种T细胞刺激剂的存在下在用于刺激T细胞的条件下孵育或培养来自生物样品的T细胞(输入或第一T细胞群,如存在于经切除的肿瘤碎片中)。在一些情形中,培养或孵育进一步在一种或多种T细胞调节剂或佐剂的存在下进行。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂和/或T细胞调节剂或佐剂进行孵育或培养导致经选择的T细胞或其所需子集或亚型或其活细胞的扩增或长出,用于在所提供的方法的后续步骤中使用。本文描述了一种或多种T细胞刺激剂和/或T细胞调节剂或佐剂以及用于孵育或培养的条件的非限制性例子。

[0263] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激性细胞因子,如IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子包括单独的或与来自IL-7、IL-15和/或IL-21的另一种细胞因子组合的IL-2。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子包括单独的或与来自IL-7、IL-2和/或IL-21的另一种细胞因子组合的IL-15。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子是IL-2。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子是IL-15。在一些实施方案中,T细胞刺激性细胞因子是IL-7和IL-15。在所提供的实施方案中,用来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-25的至少一种另外的调节细胞因子进行孵育,如章节II.A中所述。

[0264] 在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用接合CD3和共刺激分子(如CD28)的一种或多种药剂进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用抗CD3抗体(如OKT3)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细

胞刺激剂进行孵育不包括用由APC呈递、固定在固体表面(例如珠)上或作为可溶性抗体的抗CD3(例如OKT3)/抗CD28抗体进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用可溶性抗CD3(如OKT3)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用抗CD3/抗CD28(包括固定在珠上的此类试剂,例如如由Dynabead提供)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用APC(如经辐照的APC)进行孵育。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育不包括用非分裂的PBMC(如经辐照的PBMC)进行孵育。

[0265] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂选自启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂和启动经由共刺激受体的信号传导的药剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂是抗CD3抗体,如OKT3。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,启动经由共刺激受体的信号传导的药剂包含外周血单个核细胞(PBMC),任选地非分裂的或经辐照的PBMC。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,启动经由共刺激受体的信号传导的所述药剂是抗CD28抗体。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂是各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体。在特定实施方案中,在孵育期间,一种或多种重组细胞因子也作为另外的T细胞刺激剂而存在。在一些实施方案中,用一种或多种T细胞刺激剂进行孵育包括用至少一种T细胞刺激性重组细胞因子(例如重组IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)以及接合T细胞上的CD3和/或共刺激分子(例如CD28)的另外一种或多种T细胞刺激剂进行孵育。

[0266] 在所提供的任何方法的方面,在一种或多种T细胞刺激剂的存在下孵育T细胞群。在特定实施方案中,在所述一种或多种T细胞刺激剂激活或刺激细胞或者促进细胞扩增的条件下进行孵育。

[0267] 因此,所提供的方法包括培养用于制造肿瘤反应性T细胞的T细胞的方法,其中在T细胞刺激剂的存在下在扩增T细胞的条件下培养或孵育T细胞,如存在于共培养物中。在一些实施方案中,T细胞刺激剂是或包括抗CD3抗体和抗CD28抗体。

[0268] 在所提供的方法的实施方案中,刺激条件包括一种或多种药剂(例如,配体),所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联和/或T细胞中的共刺激信号。此类药剂可以包括抗体,如对TCR组分具有特异性的那些抗体,例如抗CD3和/或共刺激受体,例如抗CD28或抗4-1BB。在一些实施方案中,将此类药剂作为可溶性抗体添加至培养基中。在其他实施方案中,此类药剂结合至固体支持物,如珠。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3/CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0269] 抗CD3抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD3受体(通常是人T细胞上的人CD3)的任何抗体。抗CD3抗体包括OKT3,也称为莫罗单抗(muromonab)。抗CD3抗体还包括UHCTI克隆,也称为T3和CD3E。其他抗CD3抗体包括例如奥昔组单抗(otelixizumab)、替利组单抗(teplizumab)和维西珠单抗(visilizumab)。抗CD3抗体可以作为可溶性试剂来添加或结合至珠。在特定实施方案中,抗CD3抗体是可溶的。

[0270] 在特定实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3抗体,其在孵育期间被添加至细胞培养基中。在一些实施方案中,以范围如下的浓度添加抗CD3抗体:在为或约0.1ng/mL与50ng/mL之间,如在为或约0.5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL

与为或约30ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或50ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或约30ng/mL之间或者在为或约30ng/mL与为或约50ng/mL之间,每个都包含端值。

[0271] 在特定实施方案中,抗CD3抗体是OKT3。在一个实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间以及在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT3抗体。

[0272] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括用抗CD3抗体进行孵育以及用另一药剂进行孵育,所述另一药剂与CD28特异性结合或者刺激或诱导细胞中CD28介导的信号。在一些实施方案中,CD28介导的信号可以由抗CD28抗体或其抗原结合片段启动或提供。在一些实施方案中,CD28介导的信号可以由抗原呈递饲养细胞(APC)(如外周血单个核细胞(PBMC))提供。

[0273] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向T细胞群中添加饲养细胞,如非分裂的外周血单个核细胞(PBMC)。在一些方面,非分裂的饲养细胞可以包括γ-辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,将PBMC用范围为约3000至3600拉德的γ射线辐照,以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞添加至培养基中。在一些实施方案中,对于待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多个PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,T细胞与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率是约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比375、约1比400或约1比500。

[0274] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向细胞群中添加抗CD28抗体或其抗原结合片段。抗CD28抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD28受体的任何抗体。抗CD28抗体的非限制性例子包括NA/LE(例如BD Pharmingen)、IM1376(例如Beckman Coulter)或15E8(例如Miltenyi Biotec)。抗CD28抗体可以作为可溶性试剂来添加或结合至珠。在特定实施方案中,抗CD3抗体是可溶的。在一些实施方案中,以范围如下的浓度添加抗CD28抗体:在为或约1ng/mL与1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0275] 在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括被添加至培养基中或对于培养基外源的一种或多种重组细胞因子。在一些实施方案中，细胞因子被添加至培养基中或者对于培养基是外源的。在一些实施方案中，重组细胞因子可以包括IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。在一些实施方案中，培养和孵育在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，培养在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，培养在IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，培养在IL-15和IL-7的存在下进行，在一些方面，其不另外包括IL-2。在一些实施方案中，在培养期间还包括一种或多种另外的重组细胞因子，如来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35中的一种或多种的调节细胞因子，例如如章节II.A中所述。在特定实施方案中，所述一种或多种重组细胞因子是人的。

[0276] 重组细胞因子通常是重组人蛋白。在特定实施方案中，重组细胞因子在孵育期间以如下浓度存在于细胞培养基中：至少或至少约或者为或约10IU/mL、至少或至少约或者为或约100IU/mL、至少或至少约或者为或约1000IU/mL、至少或至少约或者为或约1500IU/mL、至少或至少约或者为或约2000IU/mL、至少或至少约或者为或约2500IU/mL、至少或至少约或者为或约3000IU/mL、至少或至少约或者为或约3500IU/mL、至少或至少约或者为或约4000IU/mL、至少或至少约或者为或约4500IU/mL、至少或至少约或者为或约5000IU/mL、至少或至少约或者为或约5500IU/mL、至少或至少约或者为或约6000IU/mL、至少或至少约或者为或约6500IU/mL、至少或至少约或者为或约7000IU/mL、至少或至少约或者为或约7500IU/mL、或者至少或至少约或者为或约8000IU/mL。在一个实施方案中，细胞培养基包含在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000与为或约3000IU/mL之间、在为或约3000与为或约4000IU/mL之间、在为或约4000与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000与为或约7000IU/mL之间、在为或约7000与为或约8000IU/mL之间，每个都包含端值。

[0277] 在一些实施方案中，重组IL-2存在于细胞培养基中。在一些方面，IL-2是添加至培养物中的唯一重组细胞因子。在一些方面，将重组IL-2和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养物中。IL-2是支持T细胞回收和增殖的细胞因子。IL-2还支持T细胞的稳态，从而支持它们的表型、分化状态和免疫记忆。在一些情形中，在肿瘤微环境中诱导调节性T细胞可以导致IL-2的生物利用度低。重组IL-2已经经常用于在多种背景下T细胞的广泛扩增。重组IL-2是市售的。在特定实施方案中，重组IL-2是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-2,Miltenyi Biotec)。

[0278] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-2可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-2可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如以促进TIL长出并允许它们从实体瘤增殖。IL-2还可以被包括在如章节I.C中描述的抗原呈递细胞共培养中，如以允许在新抗原反应性T的分离或选择之前对其进行峰值激活。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-2还可以被包括在用于扩增肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述。

[0279] 在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中：在为或约10IU/mL与为或约1000IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约

1000IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间或者在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2以在50与400IU/mL之间的量存在。

[0280] 在一些实施方案中，第一次扩增在以在200IU/mL与为或约1000IU/mL之间的浓度添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中：为或约200IU/mL、为或约300IU/mL、为或约400IU/mL、为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约300IU/mL的浓度添加至培养基中。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约600IU/mL的浓度添加至培养基中。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0281] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-2进行孵育。

[0282] 在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中：在为或约1000IU/mL与为或约8000IU/mL之间，如在为或约1000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在2000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在4000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约7000IU/mL之间或者在为或约7000IU/mL与为或约8000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2以为或为约6000IU/mL的量存在。

[0283] 在一些实施方案中，重组IL-15存在于细胞培养基中。在一些方面，IL-15是添加至培养物中的唯一重组细胞因子。在一些方面，将重组IL-15与IL-2或IL-7中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15和重组IL-7添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15(单独或与IL-2和IL-7中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。IL-15是参与记忆T细胞稳态和激活的细胞因子。在一些情形中，IL-15可以在不存在抗原的情况下促进经历过抗原的T细胞的效应子功能，并且防止其分化为耗竭表型。IL-15还在T细胞增殖中起作用。重组IL-15是市售的。在特定实施方案中，重组IL-15是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-15,Miltenyi Biotec)。

[0284] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-15可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-15可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如以促进TIL扩增，以促进其长出并允许其增殖和/或稳定来自实体瘤的表型。重组IL-15还可以被包括在如章节I.C中描述的抗原呈递细胞共培养中，如以允许在新抗原反应性T的分离或选择之前对其进行峰值激活。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-15还可以被包括在用于扩增肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述。在一些情形中，可以将重组IL-15与重组IL-7组合以在所提供的方法中提供肿瘤反应性T细胞的激活、存活和/或扩增。在一些此类实施方案中，重组IL-7和IL-15的组合是在培养中使用重组IL-2的替代方案，并且培养基不另外含有重组IL-2。

[0285] 在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至培养基中：在为或约10IU/mL与500IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约30IU/mL之间、在为或约30IU/mL与500IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约300IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间或者在为或约400IU/mL与为或约500IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-15以在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-15以为或约180IU/mL添加至培养基中。

[0286] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-15进行孵育。

[0287] 在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至培养基中：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或

约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至细胞培养基中：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将IL-15以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。

[0288] 在一些实施方案中，第一次扩增在以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，第一次扩增在以为或约1000IU/mL的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0289] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0290] 在一些实施方案中，将重组IL-7添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7与IL-2或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-15添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7(例如与IL-2和IL-15中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。IL-7是参与促进T细胞维持和稳态的细胞因子。在一些情形中，IL-7可以加强记忆T细胞存活和增殖，特别是中枢记忆区室。重组IL-7是市售的。在特定实施方案中，重组IL-7是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-7，Miltenyi Biotec)。

[0291] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-7可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-7可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如以促进TIL扩增，以促进其长出并允许其增殖和/或稳定来自实体瘤的表型。IL-7还可以被包括在如章节I.C中描述的抗原呈递细胞共培养中，如以允许在新抗原反应性T的分离或选择之前对其进行峰值激活。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-7还可以被包括在用于扩增肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述。在过程中包括重组IL-7可以维持或支持所述过程中记忆T细胞子集的扩增。在一些情形中，可以将重组IL-7与重组IL-15组合以在所提供的方法中提供肿瘤反应性T细胞的激活、存活和/或扩增。在一些此类实施方案中，重组IL-7和IL-15的组合是在培养中使用重组IL-2的替代方案，并且培养基不另外含有重组IL-2。

[0292] 在一些实施方案中，将重组IL-7以如下浓度添加至培养基中：在为或约100IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或

约1500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-7以在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-7以为或约600IU/mL添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-7以为或约1000IU/mL添加至培养基中。

[0293] 在一些实施方案中，将重组IL-7和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加重组IL-7，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，第一次扩增在以600IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0294] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-7添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加重组IL-7。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以1000IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以600IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0295] 在一些实施方案中，将重组IL-21添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21与IL-2、IL-7或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-15添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21(例如与IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。IL-21是在不增加调节性T细胞信号传导的情况下支持广泛T细胞激活的细胞因子。在一些情形中，IL-21可以支持记忆细胞稳定、效应子功能以及经历过抗原的T细胞的增殖。IL-21可以诱导CD4和CD8两种T细胞中效应分子的上调。重组IL-21是市售的。在特定实施方案中，重组IL-21是GMP级(例如MACS GMP重组人IL-21，Miltenyi Biotec)。

[0296] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-21可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-21可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如以促进来自实体瘤的TIL长出，包括通过稳定记忆T细胞激活、功能和/或增殖。在一些方面，IL-21的存在允许改

进TIL的回收。重组IL-21还可以被包括在如章节I.C中描述的抗原呈递细胞共培养中，如由于刺激T细胞激活标记物表达(包括新抗原反应性TIL上激活标记物的表达)的能力。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-21还可以被包括在用于扩增肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述，如以支持记忆表型的增殖和稳定。

[0297] 在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约1IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约15IU/mL之间或者在为或约15IU/mL与为或约20IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-21以在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1IU/mL添加至培养基中。

[0298] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-21进行孵育。

[0299] 在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至培养基中：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至细胞培养基中：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。

[0300] 在一些实施方案中，将重组IL-21和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-21，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-21和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方

案中,将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0301] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2。在一些实施方案中,可以包括一种或多种其他刺激剂,如来自IL-7、IL-15、IL-21的一种或多种其他重组细胞因子,来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子,或者抗CD3抗体(例如OKT-3)。在抗CD3抗体(例如OKT-3)的一些情形中,所述一种或多种T细胞刺激剂还可以包括如通过抗原呈递饲养细胞(如PBMC)提供的共刺激剂或可溶性抗CD28抗体。

[0302] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0303] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗CD28抗体。.在一些实施方案中,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中,抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面,如珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28T细胞扩增器)。

[0304] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、重组IL-15、重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0305] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-2、重组IL-15、重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗CD28抗体。在一些实施方案中,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中,抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面,如珠(例如,DYNABEADS®M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0306] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15和重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)以及抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0307] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15和重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)以及抗CD28抗体。在一些实施方案中,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中,抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面,如珠(例如,DYNABEADS® M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0308] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15和重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)以及抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0309] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15和重组IL-7、抗CD3抗体(例如OKT-3)以及抗CD28抗体。在一些实施方案中,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中,抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面,如珠(例如,DYNABEADS® M-450CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0310] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激剂含有重组IL-15、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗原呈递饲养细胞(如PBMC)。

[0311] 在特定实施方案中,在如用于扩增细胞的孵育期间存在的一种或多种T细胞刺激

剂含有重组IL-15、抗CD3抗体(例如OKT-3)和抗CD28抗体。在一些实施方案中,抗CD3抗体和/或抗CD28抗体是可溶的。在一些实施方案中,抗CD3抗体和抗CD28抗体中的一种或两种结合至固体表面,如珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28T细胞扩增器)。

[0312] 在一些实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂进行的孵育在用于来自生物样品的T细胞的初始扩增的条件下进行。在一些实施方案中,在约37℃下用约5%CO_2培养细胞。含有所述一种或多种T细胞刺激剂的培养基可以是无血清培养基。

[0313] 在一些实施方案中,用所述一种或多种T细胞刺激剂进行的孵育进行为或约1天,如通常是为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或任何前述时间之间的任何时间范围。在一些实施方案中,孵育进行7-10天。在一些实施方案中,孵育持续为或约7天。在一些实施方案中,孵育持续为或约8天。在一些实施方案中,孵育持续为或约9天。在一些实施方案中,孵育持续为或约10天。

[0314] 如用于生物样品中T细胞的初始扩增的孵育可以在GMP条件下进行。在一些实施方案中,孵育是在封闭系统中,在一些方面,所述封闭系统可以是封闭的自动化系统。

在一些实施方案中,含有所述一种或多种T细胞刺激剂的培养基可以是无血清培养基。在一些实施方案中,孵育在封闭的自动化系统中且用无血清培养基进行。

[0315] 在一些实施方案中,在所述一种或多种刺激条件下对细胞的初始扩增是在适合于细胞扩增的培养器皿中。在一些实施方案中,培养器皿是透气性培养器皿,如G-Rex系统(例如G-Rex10、G-Rex10M、G-Rex100M/100M-CS或G-Rex500M/500M-CS)。在一些实施方案中,培养器皿是微量板、烧瓶、棒或适合于在封闭系统中扩增细胞的其他培养器皿。在一些实施方案中,扩增可以在生物反应器中进行。在一些实施方案中,初始扩增可以使用细胞扩增系统通过将细胞转移至透气性袋中来进行,如与生物反应器(例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare))结合。在一个实施方案中,细胞扩增系统包括培养器皿,如袋,例如透气性细胞袋,其体积为约50mL、约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L,或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中,过程是自动化的或半自动化的。用于自动化灌注扩增的合适生物反应器的例子包括但不限于GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统和Pall XRS生物反应器系统或Miltenyi Prodigy。在一些方面,扩增培养在静态条件下进行。在一些实施方案中,扩增培养在摇摆条件下进行。培养基可以以推注来添加或者可以按灌注时间表来添加。在一些实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将CO2水平维持在为或接近5%,且将稳定气流维持在为、为约或至少0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min或2.0L/min或大于2.0L/min。在某些实施方案中,培养的至少一部分用灌注进行,如速率为290ml/天、580ml/天和/或1160ml/天。

[0316] 在一些实施方案中,将细胞以0.5x10^6个细胞/mL至1.5x10^6个细胞/mL的密度接种于适当培养器皿(例如透气性袋)中。在一些实施方案中,密度是为或约0.5x10^6个细胞/mL、0.75x10^6个细胞/mL、1x10^6个细胞/mL、1.25x10^6个细胞/mL或1.5x10^6个细胞/mL,或者任何前述值之间的任何值。

[0317] 在一些方面,在灌注启用的自动化封闭扩增系统中扩增细胞。灌注可以将培养基连续添加至细胞中,以确保实现最佳生长速率。

[0318] 扩增方法可以在GMP条件下进行,包括在封闭的自动化系统中且使用无血清培养基。在一些实施方案中,所述方法的任何一个或多个步骤可以在封闭系统中或者在GMP条件下进行。在某些实施方案中,所有过程操作都在GMP套件中进行。在一些实施方案中,使用封闭系统进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中,一个或多个或者所有处理步骤(例如,分离、选择和/或富集、处理、培养步骤,包括与细胞扩增结合的孵育)以及配制步骤使用集成式或自容式系统中的系统、装置或设备,和/或以自动化或可编程方式来进行。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0319] 在一些实施方案中,在孵育后,可以立即收集经刺激的细胞用于随后与APC共培养,如根据下文章节I.C中描述的方法。

[0320] 在一些实施方案中,收集并低温冷冻经刺激的细胞。在初始扩增期后通过冷冻保存提供中间保持步骤可以用于使时机与新表位鉴定和肽产生(如章节I.A中所述)和/或APC的初始产生(如章节I.C中所述)相配合。在一些实施方案中,对于冷冻保存,将经刺激的细胞用冷冻保护剂配制为组合物。在一些实施方案中,冷冻保护剂是或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中,可以将配制用于冷冻保存的组合物储存在低温(如超低温)下,例如储存温度的范围为-40℃至-150℃,如为或约80℃±6.0℃。

[0321] 在一些实施方案中,将经冷冻保存的细胞通过解冻准备用于后续步骤。在一些情形中,可以在解冻后在一个或多个洗涤步骤后立即将细胞准备好用于随后与APC一起培养。

C.T细胞与APC的共培养

[0322] 在一些实施方案中,在富集或选择从供体受试者获得的T细胞群,如通过直接从生物样品(例如肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺或者其他组织或流体)选择T细胞;并且在第一次扩增中用一种或多种T细胞刺激剂刺激群体以初始扩增细胞之后,所提供的方法包括在呈递一种或多种MHC相关非天然肽的抗原呈递细胞(APC)的存在下共培养含有经初始扩增的T细胞的群体。所述方法可以包括诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)呈递经突变的氨基酸序列。可以如章节I.A中所述鉴定和产生新抗原肽或新表位。

[0323] 在特定实施方案中,一旦合成编码蛋白质的新表位,则在于MHC分子的背景下呈递肽的条件下使多种合成肽与抗原呈递细胞接触,并且与识别在APC上呈递的肽的来自T细胞群的T细胞一起孵育。在一些实施方案中,将合成肽脉冲至自体或同种异体APC中,然后将所述APC与患者T细胞一起培养。使用抗原呈递细胞来呈递这些肽。然后可以分离识别APC表面上的这些肽的T细胞,如通过下文所述的方法。可以在富集并扩增培养物中的肿瘤反应性T细胞的条件下培养经孵育的细胞,所述肿瘤反应性T细胞即含有对APC上呈递的肽具有反应性的内源TCR的T细胞。在一些实施方案中,所述方法包括在用于扩增的条件下培养T细胞,直至获得阈值量的T细胞和/或直至在孵育开始后至多20天。在所提供的方法的一些实施方案中,所述方法可以包括在几小时至几天的过程中将T细胞与APC共培养,然后从T细胞群分离抗原呈递细胞,以在富集或扩增肿瘤反应性T细胞的条件下扩增T细胞。在所提供的方法的一些实施方案中,所述方法可以包括在1-7天的过程中将T细胞与APC共培养,然后从T细胞群分离抗原呈递细胞,以在富集或扩增肿瘤反应性T细胞的条件下扩增T细胞。在一些实施方案中,分离可以包括基于T细胞上的一种或多种T细胞激活标记物从培养物中分离或选

择反应性T细胞。

[0324] 在一些实施方案中,用于富集或选择肿瘤反应性T细胞的方法通过使APC与经突变的氨基酸序列(如如上所述的新表位肽)接触而启动。APC可以包括在其细胞表面呈递与主要组织相容性复合物(MHC)分子相关的蛋白质肽片段的任何细胞。MHC分子可以是患者表达的任何MHC分子,包括但不限于MHC I类、MHC II类、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR分子。APC可以包括例如巨噬细胞、DC、朗格汉斯细胞、B淋巴细胞和T细胞中的任何一种或多种。在特定实施方案中,APC是DC。在一些特定实施方案中,APC是B细胞。在一些实施方案中,APC是人工APC。在一些实施方案中,APC对于患者或受试者是自体的。通过使用来自患者的自体APC,所述方法可以鉴定对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞,所述经突变的氨基酸序列由在患者表达的MHC分子背景下呈递的癌症特有的突变编码。

[0325] 在特定实施方案中,APC包括能够呈递I类和II类限制性分子的细胞。例如,B细胞和DC两者都具有呈递MHC I类和MHC II类限制性分子的能力。在一些实施方案中,APC细胞样品包括B细胞和DC。在一些实施方案中,APC细胞样品富集B细胞,如通过从原代细胞样品选择或分离。在一些实施方案中,APC细胞样品富集DC,如通过从原代细胞样品选择或分离。

[0326] 在一些实施方案中,APC表达具有匹配的HLA的MHC I类和/或MHC II类分子,T细胞来源已经从所述HLA获得。在特定实施方案中,APC和T细胞两者已经都从同一受试者分离,即对于癌症患者是自体的。在一些实施方案中,所述方法可以包括诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)呈递经突变的氨基酸序列。通过使用来自患者的自体APC,所述方法可以鉴定对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞,所述经突变的氨基酸序列由在患者表达的MHC分子背景下呈递的癌症特有的突变编码。

[0327] 在一些实施方案中,APC是来自受试者(如患者)的血液或单采术样品的细胞。在一些实施方案中,APC包括存在于外周血单个核细胞(PBMC)样品中的细胞。通常,PBMC培养物中的APC功能主要涉及单核细胞和B细胞。在一些实施方案中,经分离的PBMC的群体可以在所提供的方法中用作APC。PBMC可以使用标准方法获得,所述标准方法如Ficoll-Paque梯度分离。在一些情形中,APC是或包括从血液或单采术样品或者从PBMC样品分离的B细胞。在其他情形中,APC是或包括从血液或单采术样品或者从PBMC样品分离的单核细胞。在一些方面,单核细胞可以用作制备单核细胞源DC(以用作APC)的来源。在一些实施方案中,单核细胞源DC(例如$CD11c^{高}MHCII^{高}CD14^{低}$细胞)的来源可以通过如下方式从经分离的单核细胞离体产生:用GM-CSF和IL-4培养4至6天以产生单核细胞源树突细胞。在特定实施方案中,如通过CD14选择从PBMC分离单核细胞,然后将其用GM-CSF和IL-4培养4至6天。

[0328] 在一些实施方案中,APC是具有复制能力的原代细胞(例如B细胞或单核细胞源DC),例如,细胞未经受辐照、热处理或会导致其失活的其他方法。在特定实施方案中,所提供的方法不使用经辐照的APC。在一些实施方案中,APC是从受试者获得的刚分离的原代细胞,或者源自从受试者获得的原代细胞。在一些实施方案中,在根据所提供的方法与经刺激的T细胞共培养之前,已经将APC冷冻保存并且随后解冻。

[0329] 在一些特定实施方案中,B细胞被用作APC的来源并且产生自患者单采术,如对于获得肿瘤碎片和/或T细胞的受试者是自体的单采术。在其他特定实施方案中,单核细胞源树突细胞被用作APC的来源并且产生自来自患者单采术的单核细胞,所述单采术如对于获

得肿瘤碎片和/或T细胞的受试者是自体的单采术。

[0330] 在一些实施方案中，收集并低温冷冻经分离的或所产生的APC。在分离或产生APC后通过冷冻保存提供中间保持步骤可以用于使时机与新表位鉴定和肽产生(如章节I.A中所述)和/或T细胞的初始扩增(如章节I.B中所述)相配合。在一些实施方案中，对于冷冻保存，将经分离或所产生的APC用冷冻保护剂配制为组合物。在一些实施方案中，冷冻保护剂是或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中，可以将配制用于冷冻保存的组合物储存在低温(如超低温)下，例如储存温度的范围为-40℃至-150℃，如为或约80℃±6.0℃。

[0331] 在一些实施方案中，将经冷冻保存的细胞通过解冻准备用于后续步骤。在一些情形中，可以在解冻后在一个或多个洗涤步骤后立即将细胞准备好用于随后与T细胞和肽一起培养。

[0332] 在特定实施方案中，通过使PBMC与经突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将PBMC/肽与经刺激的T细胞一起培养。PBMC和T细胞可以从同一受试者获得。

[0333] 在特定实施方案中，通过使B细胞与经突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将B细胞/肽与经刺激的T细胞一起培养。B细胞和T细胞可以从同一受试者获得。

[0334] 在特定实施方案中，通过使单核细胞源DC与经突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将单核细胞源DC/肽与经刺激的T细胞一起培养。单核细胞源DC和T细胞可以获自或源自同一受试者。

[0335] 在一些实施方案中，APC是人工抗原呈递细胞(aAPC)。通常，aAPC包括天然APC的特征，包括MHC分子、一种或多种刺激和共刺激分子、Fc受体、一种或多种粘附分子的表达和/或产生或分泌细胞因子(例如IL-2)的能力。通常，aAPC是缺乏上述中的一种或多种的表达的细胞系，并且通过引入(例如通过转染或转导)来自MHC分子、低亲和力Fc受体(CD32)、高亲和力Fc受体(CD64)、以下中的一种或多种的缺失元件中的一种或多种而产生：共刺激信号(例如CD7、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、ICOS-L、ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、ILT3、ILT4、3/TR6或B7-H3配体；或者与CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、Toll配体受体或CD83配体特异性结合的抗体)、细胞粘附分子(例如ICAM-1或LFA-3)和/或细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素-α(IFNα)、干扰素-β(IFNβ)、干扰素-γ(IFNγ)、肿瘤坏死因子-α(TNFα)、肿瘤坏死因子-β(TNFβ)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(GCSF))。在一些情形中，aAPC通常不表达MHC分子，但是可以被工程化以表达MHC分子，或者在一些情形中，被诱导或可以被诱导以表达MHC分子，如通过用细胞因子刺激。在一些情形中，aAPC还可以加载有刺激或共刺激配体，所述配体可以包括例如抗CD3抗体、抗CD28抗体或抗CD2抗体。可以用作用于产生aAPC的骨架的细胞系的例子是K562细胞系或成纤维细胞系。各种aAPC是本领域已知的，参见例如美国专利号8,722,400，公开的申请号US2014/0212446；Butler和Hirano(2014)Immunol Rev.,257(1):10.1111/imr.12129；Suhoshki等人(2007)Mol.Ther.,15:981-988。在特定实施方案中，通过使aAPC与经突变的氨基酸序列(如一种或多种(如多种)新表位肽)

接触来启动用于富集或选择肿瘤反应性细胞的方法。然后可以将aAPC/肽与经刺激的T细胞一起培养。

[0336] 诱导APC(例如B细胞或单核细胞源DC)呈递经突变的氨基酸序列可以使用各种合适的方法来进行。在一个实施方案中,诱导APC呈递经突变的氨基酸序列(例如肽新表位)包括用包含经突变的氨基酸序列的合成肽或肽池(所述池中的每种肽包含不同的经突变的氨基酸序列)脉冲APC。在一些情形中,使用电穿孔将APC用肽脉冲至抗原呈递细胞中。然后可以通过待由CD8细胞(MHC I类)或CD4细胞(MHC II类)识别的抗原呈递细胞来呈递合成肽。在某些特定实施方案中,产生合成肽以适合于由MHC I类限制性分子表达,以便由CD8细胞识别。在其他特定实施方案中,产生合成肽以适合于由MHC II类限制性分子表达,以便由CD4细胞识别。

[0337] 在一些实施方案中,使APC(例如B细胞或单核细胞源DC)与单一肽或肽池接触。肽池可以代表许多不同的经突变的氨基酸序列,如5、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900或100种肽,或者任何前述值之间的任何值。

[0338] 如通过肽脉冲,以适合于其在主要组织相容性复合物(MHC)的表面上呈递的浓度,将肽或肽池加载至抗原呈递细胞(例如树突细胞)上。

[0339] 在一些实施方案中,代表单独或单一肽的肽浓度的范围可以在为或约0.000001μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中,代表单独或单一肽的肽浓度的范围可以在为或约0.00001μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.001μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.0001μg/mL、为或约0.0001μg/mL与10μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.001μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中,代表单独或单一肽的浓度可以是为或约0.000001μg/mL、为或约0.00001μg/mL、为或约0.0001μg/mL、为或约0.001μg/mL、为或约0.01μg/mL、为或约0.1μg/mL、为或约1μg/mL或者任何前述值之间的任何值。

[0340] 在一些实施方案中,肽是代表许多不同的经突变的氨基酸序列的肽池,并且所述池中单独或单一肽的平均浓度的范围可以在为或约0.000001μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中,肽是代表许多不同的经突变的氨基酸序列的肽池,并且所述池中单独或单一肽的平均浓度的范围可以在为或约0.00001μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.001μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.0001μg/mL、为或约0.0001μg/mL与10μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.001μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.01μg/mL、

为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间。在一些实施方案中，所述池中单独或单一肽的平均浓度可以是为或约0.000001μg/mL、为或约0.00001μg/mL、为或约0.0001μg/mL、为或约0.001μg/mL、为或约0.01μg/mL、为或约0.1μg/mL、为或约1μg/mL或者任何前述值之间的任何值。

[0341] 在一些实施方案中，所述一种或多种非天然肽中单独肽的浓度平均低于0.02μg/mL。在一些实施方案中，所述一种或多种非天然肽中单独肽的浓度平均是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL，如为或约0.00001μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.0001μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.00005μg/mL、为或约0.00001μg/mL至为或约0.00002μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.0001μg/mL、为或约0.00002μg/mL至为或约0.00005μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.00005μg/mL至为或约0.0001μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.0005μg/mL、为或约0.0001μg/mL至为或约0.0002μg/mL、为或约0.0005μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.0005μg/mL至为或约0.002μg/mL、为或约0.0005μg/mL至为或约0.001μg/mL、为或约0.001μg/mL至为或约0.005μg/mL、为或约0.001μg/mL至为或约0.002μg/mL或者为或约0.002μg/mL至为或约0.005μg/mL。

[0342] 在一些实施方案中，代表单一肽或肽池的肽浓度的范围可以在为或约0.0001μg/mL与为或约40μg/mL之间。代表单一肽或肽池的肽浓度的范围可以在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.5μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约40μg/mL之间。在一些实施方案中，代表单一肽或肽池的肽浓度的范围可以是为或约0.0001μg/mL、为或约0.001μg/mL、为或约0.01μg/mL、为或约0.1μg/mL、为或约1μg/mL、为或约10μg/mL、为或约20μg/mL、为或约30μg/mL或者为或约40μg/mL，或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中，肽浓度是肽池的浓度。在一些实施方案中，肽浓度是单一或单独肽的浓度。

[0343] 代表单一肽或肽池的肽浓度的范围可以在为或约0.01μg/mL与为或约40μg/mL，如为或约0.01μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约0.5μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约0.05μg/mL、0.05μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.05μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.05μg/mL与为或约10μg/mL、

为或约0.05μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.05μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.05μg/mL与为或约0.5μg/mL、为或约0.05μg/mL与为或约0.1μg/mL、0.1μg/mL与为或约40μg/mL、如为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL、0.5μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL、1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL、5μg/mL与为或约40μg/mL、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL、10μg/mL与为或约40μg/mL、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL或者为或约25μg/mL与为或约40μg/mL之间。

[0344] 在一些实施方案中，对于肽脉冲，用肽孵育APC(例如B细胞或单核细胞源DC)持续在为或约2小时与为或约48小时之间，如在为或约2小时与为或约36小时之间、在为或约2小时与为或约24小时之间、在为或约2小时与为或约24小时之间、在为或约2小时与为或约18小时之间、在为或约2小时与为或约12小时之间、在为或约2小时与为或约6小时之间、在为或约6小时与为或约48小时之间、在为或约6小时与为或约36小时之间、在为或约6小时与为或约24小时之间、在为或约6小时与为或约24小时之间、在为或约6小时与为或约18小时之间、在为或约6小时与为或约12小时之间、在为或约12小时与为或约48小时之间、在为或约12小时与为或约36小时之间、在为或约12小时与为或约24小时之间、在为或约12小时与为或约18小时之间、在为或约18小时与为或约48小时之间、在为或约18小时与为或约36小时之间、在为或约18小时与为或约24小时之间、在为或约24小时与为或约48小时之间、在为或约24小时与为或约36小时之间或者在为或约36小时与为或约48小时之间。在一些实施方案中，用肽孵育APC(例如B细胞或单核细胞源DC)持续为或约4小时、为或约6小时、为或约7小时、为或约8小时、为或约9小时、为或约10小时、为或约12小时、为或约14小时、为或约16小时、为或约18小时、为或约20小时、为或约22小时、为或约24小时或者任何前述值之间的任何值。在特定实施方案中，用肽孵育APC(例如PBMC、B细胞或单核细胞源DC)过夜，如在为或约8至12小时之间。在一些实施方案中，共培养孵育持续为或约6小时。

[0345] 在一个实施方案中，诱导APC(例如B细胞或单核细胞源DC)呈递经突变的氨基酸序列包括将编码经突变的氨基酸序列的核苷酸序列引入APC中。将核苷酸序列引入APC中，使得APC在细胞膜上表达和展示结合至MHC分子的经突变的氨基酸序列。编码经突变的氨基酸的核苷酸序列可以是RNA或DNA。可以以多种不同方式中的任何一种将核苷酸序列引入APC中。可用于将核苷酸序列引入APC中的技术的非限制性例子包括转化、转导、转染和电穿孔。

[0346] 在一些情形中，用于结合MHC II类限制性分子的肽作为编码突变DNA的基因来呈递，并且被电穿孔至抗原呈递细胞中。然后，此DNA将在体外被转录成编码表面上的用于由CD4+细胞识别的肽的RNA。在一些情形中，串联小基因(Tandem Mini Gene)方法可以用于对MHC II类限制性分子执行此操作，参见例如公开的PCT专利申请号WO2016/053338和Parkhurst等人(2016)Clin Cancer Res.,23:2491-505。在鉴定多于一种基因的实施方案中，所述方法可以包括制备多于一种核苷酸序列(每种核苷酸序列编码由不同基因编码的经突变的氨基酸序列)，并且将每种核苷酸序列引入不同的APC群体中。在这方面，可以获得多个APC群体，每个群体表达和展示不同的经突变的氨基酸序列。例如，在使用串联小基因

的情形中，将APC(例如B细胞或单核细胞源DC)用编码不同的经突变的氨基酸序列的DNA(多种DNA)的混合物电穿孔，所述DNA然后将在体外被转录成编码用于由CD4+T细胞表面识别的肽的RNA。在一些实施方案中，使用Lonza 4DNucleofector连续电穿孔系统对APC(例如B细胞或单核细胞源DC)电穿孔。

[0347] 一旦合成这些长肽和DNA并将其脉冲至自体或同种异体抗原呈递细胞中，则将所述细胞与患者T细胞一起培养。使用抗原呈递细胞来呈递这些肽。然后可以分离识别APC表面上的这些肽的T细胞，如通过下文所述的方法。所述方法包括在培养呈递肽的APC的情况下添加T细胞(例如来自患有肿瘤的患者)，以及将APC和T细胞共培养持续允许通过群体中的一种或多种T细胞在APC的表面上呈递和识别肽的时间段。在所提供的实施方案中，T细胞包括经刺激的T细胞的群体。

[0348] T细胞(例如经刺激的T细胞)和APC(例如B细胞或单核细胞源DC)可以以T细胞与APC的如下比率存在于培养物中：1:100至100:1，如1:50至50:1、1:25至25:1、1:10至10:1或1:5至5:1。在一些实施方案中，T细胞(例如经刺激的T细胞)与APC的比率是为或约1:100、为或约1:50、为或约1:25、为或约1:10、为或约1:5、为或约1:2.5、为或约1:1、为或约2:5:1、为或约5:1、为或约10:1、为或约25:1、为或约50:1或者为或约100:1，或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中，T细胞(例如经刺激的T细胞)与APC的比率在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间或在2.5:1与1:1之间。在一些实施方案中，T细胞(例如经刺激的T细胞)与APC的比率在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或在1:2.5与1:1之间。在特定实施方案中，将通过以大约3:1比率混合T细胞(例如经刺激的T细胞的群体)和APC(例如B细胞或单核细胞源DC)来进行共培养。在一些实施方案中，将通过以大约1:1比率混合T细胞(例如经刺激的T细胞的群体)和APC(例如B细胞或单核细胞源DC)来进行共培养。

[0349] 在一些实施方案中，将用于维持T细胞的一种或多种重组细胞因子添加至共培养物中。在一些实施方案中，重组细胞因子可以包括IL-2、IL-7、IL-15或IL-21中的一种或多种。在一些实施方案中，共培养在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，共培养在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，共培养在IL-15和IL-7的存在下进行，在一些方面，其不另外包括IL-2。在一些实施方案中，在培养期间还包括一种或多种另外的重组细胞因子，如来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35中的一种或多种的调节细胞因子，例如如章节II.A中所述。在特定实施方案中，所述一种或多种重组细胞因子是人的。

[0350] 重组细胞因子通常是重组人蛋白。在特定实施方案中，重组细胞因子在共培养期间以如下浓度存在于细胞培养基中：至少或至少约或者为或约10IU/mL、至少或至少约或者为或约100IU/mL、至少或至少约或者为或约1000IU/mL、至少或至少约或者为或约1500IU/mL、至少或至少约或者为或约2000IU/mL、至少或至少约或者为或约2500IU/mL、至少或至少约或者为或约3000IU/mL、至少或至少约或者为或约3500IU/mL、至少或至少约或者为或约4000IU/mL、至少或至少约或者为或约4500IU/mL、至少或至少约或者为或约5000IU/mL、至少或至少约或者为或约5500IU/mL、至少或至少约或者为或约6000IU/mL、至少或至少约或者为或约6500IU/mL、至少或至少约或者为或约7000IU/mL、至少或至少约或者为或约7500IU/mL、或者至少或至少约或者为或约8000IU/mL。在一个实施方案中，细胞培养基包含

在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000与为或约3000IU/mL之间、在为或约3000与为或约4000IU/mL之间、在为或约4000与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000与为或约7000IU/mL之间、在为或约7000与为或约8000IU/mL之间，每个都包含端值。

[0351] 在一些实施方案中，重组IL-2存在于细胞培养基中。在一些方面，IL-2是添加至共培养物中的唯一重组细胞因子。在一些方面，将重组IL-2和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至共培养物中。在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中：在为或约10IU/mL与为或约1000IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间或者在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2以在50与400IU/mL之间的量存在。

[0352] 在一些实施方案中，共培养在以在200IU/mL与为或约1000IU/mL之间的浓度添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至共培养基中：为或约200IU/mL、为或约300IU/mL、为或约400IU/mL、为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约300IU/mL的浓度添加至共培养基中。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约600IU/mL的浓度添加至共培养基中。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约1000IU/mL的浓度添加至共培养基中。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至共培养基中。

[0353] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-2进行孵育。在一些方面，IL-2是添加至培养物中的唯一重组细胞因子。在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中：在为或约1000IU/mL与为或约8000IU/mL之间，如在为或约1000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在2000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在4000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约6000IU/

mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约7000IU/mL之间或者在为或约7000IU/mL与为或约8000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2以为或为约6000IU/mL的量存在。

[0354] 在一些实施方案中，重组IL-15存在于细胞培养基中。在一些方面，IL-15是添加至培养物中的唯一重组细胞因子。在一些方面，将重组IL-15与IL-2或IL-7中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15和重组IL-7添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15(单独或与IL-2和IL-7中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0355] 在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至培养基中：在为或约10IU/mL与500IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约30IU/mL之间、在为或约30IU/mL与500IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约300IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间或者在为或约400IU/mL与为或约500IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-15以在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-15以为或约180IU/mL添加至培养基中。

[0356] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-15进行孵育。

[0357] 在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至培养基中：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或

约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至细胞培养基中：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将IL-15以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。

[0358] 在一些实施方案中，共培养在以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，共培养在以为或约1000IU/mL的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0359] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，共培养在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0360] 在一些实施方案中，将重组IL-7添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7与IL-2或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-15添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7(例如与IL-2和IL-15中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0361] 在一些实施方案中，将重组IL-7以如下浓度添加至培养基中：在为或约100IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-7以在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，

将IL-7以为或约600IU/mL添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-7以为或约1000IU/mL添加至培养基中。

[0362] 在一些实施方案中，将重组IL-7和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加重组IL-7，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，共培养在以1000IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，共培养在以600IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0363] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-7添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加重组IL-7。在一些实施方案中，共培养在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以1000IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，第一次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以600IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0364] 在一些实施方案中，将重组IL-21添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21与IL-2、IL-7或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-15添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21(例如与IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0365] 在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约1IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约15IU/mL之间或者在为或约15IU/mL与为或约20IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-21以在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1IU/mL添加至培养基中。

[0366] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-21进行孵育。

[0367] 在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至培养基中：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL

与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至细胞培养基中：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。

[0368] 在一些实施方案中，将重组IL-21和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-21，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，共培养在以1000IU/mL添加的重组IL-21和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0369] 在所提供的实施方案中，T细胞与APC/肽的共培养还可以用T细胞佐剂(如章节II中描述的任何一种)来进行。在一些方面，T细胞佐剂是免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO)。在一些方面，T细胞佐剂是共刺激激动剂，如肿瘤坏死因子超家族受体(TNFSR)激动剂，包括但不限于OX40和41BB的激动剂。在一些实施方案中，T细胞佐剂是细胞凋亡抑制剂，包括但不限于胱天蛋白酶抑制剂或Fas/Fas配体轴的抑制剂。

[0370] 可以在适合于呈递MHC上的肽和激活培养物中的T细胞的温度(例如，至少约25摄氏度，通常是至少约30度，并且通常是为或约37摄氏度)下孵育APC和T细胞的共培养物。在一些实施方案中，孵育进行长达96小时。孵育可以进行24小时至96小时，如为或约24小时、为或约36小时、为或约48小时、为或约60小时、为或约72小时、为或约84小时或者为或约96小时，或者任何前述时间之间的时间。在特定实施方案中，将共培养物孵育24至48小时。

[0371] 在一些实施方案中，在共培养结束时，将肿瘤反应性T细胞与存在于共培养物中的APC分离。在一些实施方案中，分离可以包括选除或去除APC的方法。在一些实施方案中，分离可以包括阳性选择或保留存在于共培养物中的T细胞的方法。在一些实施方案中，可以选择共培养物中的总T细胞。在特定实施方案中，可以选择肿瘤反应性T细胞或表达与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种激活标记物的T细胞。

D.肿瘤反应性T细胞的选择

[0372] 在所提供的方法的实施方案中，所述方法涉及通过选择或分离对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞来富集或选择肿瘤反应性T细胞或者可能或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞。在一些实施方案中，从已经从生物样品分离或选择的T细胞群进一步选择或富集对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞，如章

节I.B.1中所述。在一些实施方案中，从经刺激的T细胞的群体进一步选择或富集对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞，如第I.B.2节中所述。在一些实施方案中，在将T细胞与APC共培养后，从所述T细胞的群体进一步选择或富集对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞，如章节I.C中所述。在一些实施方案中，所述方法可以包括用于获得或富集肿瘤反应性T细胞或者可能或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞的上述任何选择的组合。在一些实施方案中，根据所提供的任何方法的一个或多个步骤，将经富集的细胞群用于后续处理步骤中，所述后续处理步骤如涉及孵育、刺激或激活和/或扩增的后续处理步骤。

[0373] 在一些实施方案中，在进一步扩增来自共培养物的T细胞之前，所提供的方法进一步涉及富集或选择肿瘤反应性T细胞或者可能或怀疑是肿瘤反应性T细胞的T细胞。在一些实施方案中，此种富集包括从共培养物选择或分离对于与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。在一些实施方案中，从共培养物选择的T细胞产生富集CD3+T细胞或CD4+细胞和CD8+细胞的T细胞群，所述细胞进一步对此类T细胞激活标记物中的一种或多种呈阳性。在一些实施方案中，此类细胞包括或富集肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。例如，可以通过针对如下标记物的阳性或阴性选择将此类CD3+T细胞或$CD4^+$和/或$CD8^+$群体进一步分选为子群体，所述标记物在肿瘤反应性T细胞上或在具有与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞激活标记物的表达的T细胞上表达或以相对较高的程度表达。在特定实施方案中，在用于扩增的条件下培养经富集的细胞群，如章节I.E中所述。

[0374] 在一些方面，从共培养样品选择或富集肿瘤反应性T细胞或表达与肿瘤反应性T细胞相关的某些激活标记物的T细胞。在一些方面，对一种或多种T细胞激活标记物(在本文中也称为“上调标记物”)进行阳性选择。当T细胞被靶标或突变型肽激活时，它开始表达上调标记物，如但不限于CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134(OX40)、CD258、CD256、PD-1、TIM-3和/或LAG-3。然后这些标记物可以用于选择反应性细胞。在一些实施方案中，上调标记物是CD107、CD107a、CD39、CD137、CD59、CD90、CD38或CD103中的一种或多种。特别地，T细胞激活标记物包括在抗原刺激T细胞后上调和/或其表达被特异性地检测到的那些标记物，使得抗原特异性效应物可以被鉴定为正在激活或刺激细胞的抗原的替代物。例如，在抗原诱导的刺激后，人T细胞经历动态的功能和表型变化，包括经上调的多种激活相关分子(如CD25、CD69、CD38等)的表面表达。表面分子的上调为鉴定和分离抗原特异性T细胞(如肿瘤反应性T细胞)提供了机会，所述鉴定和分离是通过经上调的决定簇的抗体结合以及随后通过流式细胞术(包括通过涉及磁性分离和荧光激活的细胞分选(FACS))富集。

[0375] 在一些实施方案中，T细胞激活标记物选自以下中的任何一种或多种：CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258、CD256、PD-1、TIM-3和/或LAG-3。在一些实施方案中，T细胞激活标记物选自以下中的任何一种或多种：CD107、CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258和/或CD256。在一些实施方案中，T细胞激活标记物选自以下中的任何一种或多种：CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和/或CD38。

[0376] 在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD107a。CD107a是一种溶酶体相关蛋白，其通常发现于T细胞表面上。在TCR触发后，CD8 T细胞可以迅速发生脱颗粒，并且

CD107和其他溶酶体蛋白可以被转运到细胞膜上，以促进穿孔素和颗粒酶的释放。例如，在一些情形中，可以在抗原特异性CD8 T细胞上检测到CD107表达，如早在刺激后30分钟。(Betts等人(2003)J.Immunol.Methods 281:6578)。

[0377] 在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD39。在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD103。在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD59。在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD90。在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD38。

[0378] 在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD137(41BB)。在一些实施方案中，T细胞激活标记物是或包括CD134(OX40)。

[0379] 在一些实施方案中，基于至少两种或更多种T细胞激活标记物(如至少3、4、5或6种T细胞激活标记物)的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中，基于以下中的两种或更多种的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞：PD-1、TIM-3、LAG-3、CD137、CD107、CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258和/或CD256。在一些实施方案中，基于PD-1、TIM-2、LAG-3和/或CD137以及至少一种其他T细胞激活标记物的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。

[0380] 在一些实施方案中，基于CD137和至少一种其他T细胞激活标记物的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中，所述至少一种其他T细胞激活标记物选自以下中的一种或多种：PD-1、TIM-3、LAG-3、CD107、CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258和CD256。在一些实施方案中，所述至少一种其他T细胞激活标记物选自以下中的一种或多种：CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和CD38。在一些实施方案中，基于CD107a和CD137、CD38和CD137、CD103和CD137、CD59和CD137、CD90和CD137以及CD38和CD137的阳性表面表达来选择、富集或分离肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。

[0381] 在一些实施方案中，所述至少两种T细胞激活标记物选自CD107a和CD39、CD107a和CD103、CD107a和CD59、CD107a和CD90、CD107a和CD38、CD39和CD103、CD39和CD59、CD39和CD90、CD39和CD38、CD103和CD59、CD103和CD90、CD103和CD38、CD59和CD90、CD59和CD38以及CD90和CD38。

[0382] 在一些实施方案中，T细胞激活标记物包括CD137(41BB)和CD134(OX40)。

[0383] 在一些实施方案中，使用结合至突变相关肽或肿瘤相关肽的MHC四聚体来选择肿瘤反应性T细胞。在一些实施方案中，使用MHC I类或MHC II类算法制备四聚体。在一些实施方案中，四聚体被可检测地标记，如荧光标记。在一些实施方案中，四聚体与获得生物细胞来源的受试者是HLA匹配的。在一些实施方案中，使用MHC四聚体选择细胞是直接从来自受试者的样品的细胞来源(例如外周血)进行。在一些实施方案中，使用MHC四聚体选择细胞是在选择或富集对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞之后。

[0384] 分离、选择和/或富集细胞的方法可以通过多种方法中的任何一种，如通过基于阳性或阴性选择的方法，如通过使用如上文章节I.B中所述的任何方法。在一些实施方案中，方法可以包括基于免疫亲和力的选择。在一些实施方案中，可以通过多种方式富集或分选T

细胞,所述方式包括但不限于磁珠分离、荧光细胞分选和基于一次性封闭盒的细胞分选仪。在特定方面,一种或多种T细胞激活标记物可以用于通过使用(但不限于)细胞选择设备(但不限于CliniMACS、Sony FX500或Tyto细胞分选系统(Miltenyi))上的荧光抗体、纳米颗粒或珠来选择反应性细胞。

[0385] 在一些实施方案中,选择产生经富集的细胞群,如富集CD3+T细胞或CD4+细胞和CD8+细胞的细胞群,所述细胞进一步对一种或多种此类T细胞激活标记物呈阳性。在一些实施方案中,此类细胞包括或富集肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中,根据所提供的任何方法的一个或多个步骤,将经富集的细胞群用于后续处理步骤中,所述后续处理步骤如涉及孵育、刺激或激活和/或扩增的后续处理步骤。

[0386] 在一些实施方案中,从共培养物选择的T细胞产生富集CD3+T细胞或CD4+细胞和CD8+细胞的T细胞群,所述细胞进一步对此类T细胞激活标记物中的一种或多种呈阳性。在一些实施方案中,此类细胞包括或富集肿瘤反应性T细胞或与肿瘤反应性T细胞相关的T细胞。在一些实施方案中,根据所提供的任何方法的一个或多个步骤,将经富集的细胞群用于后续处理步骤中,所述后续处理步骤如涉及孵育、刺激或激活和/或扩增的后续处理步骤。

[0387] 在一些实施方案中,经富集的细胞群是从如上所述的起始样品富集的细胞,其中特定表型的细胞(例如肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞)在经富集的细胞群中的百分比增加比此类细胞在起始样品中的百分比大至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、500%、1000%、5000%或更多。在一些实施方案中,肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞在经富集的组合物中的纯度(即对所选细胞表面标记物呈阳性的细胞相比于经富集的细胞群中总细胞的百分比)是至少90%、91%、92%、93%、94%,并且通常是至少95%、96%、97%、98%、99%或更大。

E.进一步扩增和收获

[0388] 在一些实施方案中,将来自共培养物的T细胞或从中选择的T细胞在共培养后在离体扩增细胞的条件下进一步孵育。在所提供的方法的方面,此第二次扩增是为了进一步扩增经富集的肿瘤反应性T细胞。孵育在一种或多种T细胞刺激剂的存在下在用于刺激T细胞(如用于扩增T细胞)的条件下进行。所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括如上文章节B.2中描述的任何一种。通常,培养和孵育可以在重组细胞因子(例如IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21)的存在下进行。在特定实施方案中,扩增至少在重组IL-2的存在下进行。在所提供的实施方案中,在扩增期间可以存在来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35的一种或多种另外的调节细胞因子。在一些实施方案中,扩增可以另外包括一种或多种其他T细胞佐剂,如免疫抑制阻断剂(例如针对TGFβ或IDO);共刺激激动剂,如肿瘤坏死因子超家族受体(TNFSR)激动剂,包括但不包括限于OX40和41BB的激动剂;以及免疫检查点抑制剂;和/或细胞凋亡抑制剂,包括但不限于胱天蛋白酶抑制剂或Fas/Fas配体轴的抑制剂。在所提供的实施方案中,此扩增可以在7-20天的过程中发生。扩增方法可以在GMP条件下进行,包括在封闭的自动化系统中且使用无血清培养基。在扩增后在达到治疗剂量后,可以将产物浓缩并在冷冻保存介质中冷冻。本文还提供了通过本文所述的方法产生的T细胞群及其药物组合物。

[0389] 在一些实施方案中,T细胞的扩增是通过用一种或多种T细胞刺激剂进行培养,所

述T细胞刺激剂包括重组T细胞刺激性细胞因子，如IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21。在一些实施方案中，T细胞刺激性细胞因子包括单独的或与来自IL-7、IL-15和/或IL-21的另一种细胞因子组合的IL-2。在一些实施方案中，培养和孵育在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，培养在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，培养在IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，培养在IL-15和IL-7的存在下进行，在一些方面，其不另外包括IL-2。在所提供的实施方案中，用来自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-25的至少一种另外的调节细胞因子进行扩增培养，如章节II.A中所述。

[0390] 在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用接合CD3和共刺激分子(如CD28)的一种或多种药剂进行孵育。在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用抗CD3抗体(如OKT3)进行孵育。在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用由APC呈递、固定在固体表面(例如珠)上或作为可溶性抗体的抗CD3(例如OKT3)/抗CD28抗体进行孵育。在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用可溶性抗CD3(如OKT3)进行孵育。在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用抗CD3/抗CD28(包括固定在珠上的此类试剂，例如如由Dynabead提供)进行孵育。在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用APC(如经辐照的APC)进行孵育。在一些实施方案中，用一种或多种T细胞刺激剂进行扩增培养不包括用非分裂的PBMC(如经辐照的PBMC)进行孵育。

[0391] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂选自启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂和/或启动经由共刺激受体的信号传导的药剂。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂是抗CD3抗体，如OKT3。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，启动经由共刺激受体的信号传导的药剂包含外周血单个核细胞(PBMC)，任选地非分裂的或经辐照的PBMC。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，启动经由共刺激受体的信号传导的所述药剂是抗CD28抗体。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂是各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体。

[0392] 在所提供的方法的实施方案中，刺激条件包括一种或多种药剂(例如，配体)，所述药剂开启或启动T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联和/或T细胞中的共刺激信号。此类药剂可以包括抗体，如对TCR组分具有特异性的那些抗体，例如抗CD3和/或共刺激受体，例如抗CD28或抗4-1BB。在一些实施方案中，将此类药剂作为可溶性抗体添加至培养基中。在其他实施方案中，此类药剂结合至固体支持物，如珠。在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3/CD28缀合的磁珠(例如，DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T细胞扩增器)。

[0393] 抗CD3抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD3受体(通常是人T细胞上的人CD3)的任何抗体。抗CD3抗体包括OKT3，也称为莫罗单抗。抗CD3抗体还包括UHCTI克隆，也称为T3和CD3E。其他抗CD3抗体包括例如奥昔组单抗、替利组单抗和维西珠单抗。抗CD3抗体可以作为可溶性试剂来添加或结合至珠。在特定实施方案中，抗CD3抗体是可溶的。

[0394] 在特定实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括抗CD3抗体，其在孵育期间被添加至细胞培养基中。在一些实施方案中，以范围如下的浓度添加抗CD3抗体：在为或约0.1ng/mL与50ng/mL之间，如在为或约0.5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL

与为或约30ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.5ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约30ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约15ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或50ng/mL之间、在为或约15ng/mL与为或约30ng/mL之间或者在为或约30ng/mL与为或约50ng/mL之间,每个都包含端值。

[0395] 在特定实施方案中,抗CD3抗体是OKT3。在一个实施方案中,细胞培养基包含约0.1ng/mL、约0.5ng/mL、约1ng/mL、约2.5ng/mL、约5ng/mL、约7.5ng/mL、约10ng/mL、约15ng/mL、约20ng/mL、约25ng/mL、约30ng/mL、约35ng/mL、约40ng/mL、约50ng/mL、约60ng/mL、约70ng/mL、约80ng/mL、约90ng/mL、约100ng/mL、约200ng/mL、约500ng/mL和约1μg/mL的OKT3抗体。在一个实施方案中,细胞培养基包含在0.1ng/mL与1ng/mL之间、在1ng/mL与5ng/mL之间、在5ng/mL与10ng/mL之间、在10ng/mL与20ng/mL之间、在20ng/mL与30ng/mL之间、在30ng/mL与40ng/mL之间、在40ng/mL与50ng/mL之间以及在50ng/mL与100ng/mL之间的OKT3抗体。

[0396] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括用抗CD3抗体进行孵育以及用另一药剂进行孵育,所述另一药剂与CD28特异性结合或者刺激或诱导细胞中CD28介导的信号。在一些实施方案中,CD28介导的信号可以由抗CD28抗体或其抗原结合片段启动或提供。在一些实施方案中,CD28介导的信号可以由抗原呈递饲养细胞(APC)(如外周血单个核细胞(PBMC))提供。

[0397] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向T细胞群中添加饲养细胞,如非分裂的外周血单个核细胞(PBMC)。在一些方面,非分裂的饲养细胞可以包括γ-辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,将PBMC用范围为约3000至3600拉德的γ射线辐照,以防止细胞分裂。在一些方面,在添加T细胞群之前将饲养细胞添加至培养基中。在一些实施方案中,对于待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞,所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多个PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,T细胞与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率是约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比375、约1比400或约1比500。

[0398] 在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂可以包括向细胞群中添加抗CD28抗体或其抗原结合片段。抗CD28抗体可以包括针对或可以特异性结合T细胞表面上的CD28受体的任何抗体。抗CD28抗体的非限制性例子包括NA/LE(例如BD Pharmingen)、IM1376(例如Beckman Coulter)或15E8(例如Miltenyi Biotec)。抗CD28抗体可以作为可溶性试剂来添加或结合至珠。在特定实施方案中,抗CD3抗体是可溶的。在一些实施方案中,以范围如下的浓度添加抗CD28抗体:在为或约1ng/mL与1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0399] 通常,培养和孵育可以在重组细胞因子的存在下进行。在一些实施方案中,细胞因子被添加至培养基中或者对于培养基是外源的。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中,培养在选自以下的重组细胞因子的存在下进行:IL-2、IL-15、IL-7和IL-21。在一些实施方案中,培养和孵育在重组IL-2、IL-15和IL-7的存在下进行。在一些实施方案中,培养在IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,培养在IL-15的存在下进行。在一些实施方案中,培养在IL-15和IL-7的存在下进行,在一些方面,其不另外包括IL-2。

[0400] 重组细胞因子通常是重组人蛋白。在特定实施方案中,重组细胞因子在孵育期间以如下浓度存在于细胞培养基中:至少或至少约0.5IU/mL、至少或至少约1.0IU/mL、至少或至少约5IU/mL、至少或至少约或者为或约10IU/mL、至少或至少约或者为或约100IU/mL、至少或至少约或者为或约1000IU/mL、至少或至少约或者为或约1500IU/mL、至少或至少约或者为或约2000IU/mL、至少或至少约或者为或约2500IU/mL、至少或至少约或者为或约3000IU/mL、至少或至少约或者为或约3500IU/mL、至少或至少约或者为或约4000IU/mL、至少或至少约或者为或约4500IU/mL、至少或至少约或者为或约5000IU/mL、至少或至少约或者为或约5500IU/mL、至少或至少约或者为或约6000IU/mL、至少或至少约或者为或约6500IU/mL、至少或至少约或者为或约7000IU/mL、至少或至少约或者为或约7500IU/mL、或者至少或至少约或者为或约8000IU/mL。在一个实施方案中,细胞培养基包含在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000与为或约3000IU/mL之间、在为或约3000与为或约4000IU/mL之间、在为或约4000与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000与为或约7000IU/mL之间、在为或约7000与为或约8000IU/mL之间,每个都包含端值。

[0401] 在一些实施方案中,重组IL-2存在于细胞培养基中。在一些方面,将重组IL-2和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养物中。

[0402] 在一些实施方案中,将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中:在为或约10IU/mL与为或约1000IU/mL之间,如在为或约10IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间或者在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间。在一些实施方案中,重组IL-2以在50与400IU/mL之间的量存在。

[0403] 在一些实施方案中,第二次扩增在以在200IU/mL与为或约1000IU/mL之间的浓度添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中,将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中:为或约200IU/mL、为或约300IU/mL、为或约400IU/mL、为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL或者任何前述浓

度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约300IU/mL的浓度添加至培养基中。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约600IU/mL的浓度添加至培养基中。在一些实施方案中，将重组IL-2以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0404] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-2进行孵育。在一些方面，IL-2是添加至培养物中的唯一重组细胞因子。在一些实施方案中，将重组IL-2以如下浓度添加至培养基中：在为或约1000IU/mL与为或约8000IU/mL之间，如在为或约1000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在2000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在4000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约7000IU/mL之间、在为或约5000IU/mL与为或约6000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约8000IU/mL之间、在为或约6000IU/mL与为或约7000IU/mL之间或者在为或约7000IU/mL与为或约8000IU/mL之间。在一些实施方案中，重组IL-2以为或为约6000IU/mL的量存在。

[0405] 在一些实施方案中，重组IL-15存在于细胞培养基中。在一些方面，IL-15是添加至培养物中的唯一重组细胞因子。在一些方面，将重组IL-15与IL-2或IL-7中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15和重组IL-7添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-15(单独或与IL-2和IL-7中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0406] 在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至培养基中：在为或约10IU/mL与500IU/mL之间，如在为或约10IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约30IU/mL之间、在为或约30IU/mL与500IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约30IU/mL与为或约50IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约50IU/mL与为或约70IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约70IU/mL与为或约100IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或

约200IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约300IU/mL之间、在为或约300IU/mL与为或约500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间或者在为或约400IU/mL与为或约500IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-15以在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-15以为或约180IU/mL添加至培养基中。

[0407] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-15进行孵育。

[0408] 在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至培养基中：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-15以如下浓度添加至细胞培养基中：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将IL-15以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。

[0409] 在一些实施方案中，第二次扩增在以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增在以为或约1000IU/mL的浓度添加的重组IL-15的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0410] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，第二次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0411] 在一些实施方案中，将重组IL-7添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7与IL-2或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7和重组IL-15添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-7(例如与IL-2和IL-15中的一种或两种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0412] 在一些实施方案中，将重组IL-7以如下浓度添加至培养基中：在为或约100IU/mL

与为或约2000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约100IU/mL与为或约200IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约200IU/mL与为或约400IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约400IU/mL与为或约600IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约600IU/mL与为或约800IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约800IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-7以在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-7以为或约600IU/mL添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-7以为或约1000IU/mL添加至培养基中。

[0413] 在一些实施方案中，将重组IL-7和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加重组IL-7，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，第二次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增在以600IU/mL添加的重组IL-7和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0414] 在一些实施方案中，将重组IL-15和IL-7添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以400IU/mL至2000IU/mL(例如为或约600IU/mL或1000IU/mL)的浓度添加重组IL-7。在一些实施方案中，第二次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以1000IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-15和以600IU/mL添加的重组IL-7的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0415] 在一些实施方案中，将重组IL-21添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21与IL-2、IL-7或IL-15中的一种或两种一起添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-2添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21和重组IL-15添加至培养基中。在一些方面，将重组IL-21(例如与IL-2、IL-7和IL-15中的一种或多种组合)和来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0416] 在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约

2.5IU/mL之间、在为或约0.5IU/mL与为或约1IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约1IU/mL与为或约2.5IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约2.5IU/mL与为或约5IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约15IU/mL之间、在为或约5IU/mL与为或约10IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约20IU/mL之间、在为或约10IU/mL与为或约15IU/mL之间或者在为或约15IU/mL与为或约20IU/mL之间。在一些实施方案中，将IL-21以在为或约0.5IU/mL与为或约2.5IU/mL之间的量添加至培养基中。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1IU/mL添加至培养基中。

[0417] 在一些实施方案中，用更高剂量的IL-21进行孵育。

[0418] 在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至培养基中：在为或约500IU/mL与为或约5000IU/mL之间，如在为或约500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约500IU/mL与为或约750IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约750IU/mL与为或约1000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约1000IU/mL与为或约1500IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约5000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约4000IU/mL之间、在为或约1500IU/mL与为或约2000IU/mL之间、在为或约2000IU/mL与为或约5000IU/mL之间、如在为或约2000IU/mL与为或约4000IU/mL之间或者在为或约4000IU/mL与为或约5000IU/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-21以如下浓度添加至细胞培养基中：为或约500IU/mL、为或约600IU/mL、为或约700IU/mL、为或约800IU/mL、为或约900IU/mL、为或约1000IU/mL、为或约1100IU/mL、为或约1200IU/mL、为或约1300IU/mL、为或约1400IU/mL、为或约1500IU/mL、为或约1600IU/mL、为或约1700IU/mL、为或约1800IU/mL、为或约1900IU/mL或者为或约2000IU/mL，或者任何前述浓度之间的任何浓度。在一些实施方案中，将IL-21以为或约1000IU/mL的浓度添加至培养基中。

[0419] 在一些实施方案中，将重组IL-21和IL-2添加至培养基中。在一些实施方案中，以500IU/mL至2000IU/mL(例如为或约1000IU/mL)的浓度添加重组IL-21，并且以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2。在一些实施方案中，第二次扩增在以1000IU/mL添加的重组IL-21和以300IU/mL添加的重组IL-2的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0420] 在所提供的实施方案中，此扩增(例如第二次扩增)可以在T细胞佐剂(如章节II中所述的任何一种)的存在下进行。在一些方面，T细胞佐剂是共刺激激动剂，如肿瘤坏死因子超家族受体(TNFSR)激动剂，包括但不限于OX40和41BB的激动剂。在一些实施方案中，T细胞佐剂是细胞凋亡抑制剂，包括但不限于胱天蛋白酶抑制剂或Fas/Fas配体轴的抑制剂。这些可溶性激动剂和细胞凋亡抑制剂可以在培养中存在长达扩增步骤的最大培养时间或最少

24小时。

[0421] 在所提供的实施方案中,此扩增(例如第二次扩增)可以在一种或多种另外的外源T细胞调节细胞因子(如如章节II中所述的任何一种)的存在下进行。在一些方面,T细胞调节细胞因子是重组IL-23、重组IL-25或重组IL-27和重组IL-35。这些调节细胞因子可以在培养中存在长达扩增步骤的最大培养时间或最少24小时。

[0422] 在所提供的其他实施方案中,此扩增(例如第二次扩增)可以在一种或多种免疫抑制阻断剂(如如章节II中所述的任何一种)的存在下进行。在一些方面,所述药剂阻断或降低由TGFβ和/或IDO介导的活性。这些免疫抑制阻断剂可以在培养中存在长达扩增步骤的最大培养时间或最少24小时。

[0423] 在一些实施方案中,将经扩增的T细胞的组合物从封闭系统中取出并置于和/或连接至用于扩增的生物反应器。可以通过将细胞转移至如与生物反应器(例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare))相连的透气性袋使用细胞扩增系统来扩增经分选的或经选择的T细胞。在一个实施方案中,细胞扩增系统包括培养器皿,如袋,例如透气性细胞袋,其体积为约50mL、约100mL、约200mL、约300mL、约400mL、约500mL、约600mL、约700mL、约800mL、约900mL、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L,或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中,过程是自动化的或半自动化的。用于自动化灌注扩增的合适生物反应器的例子包括但不限于GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统、Pall XRS生物反应器系统或Miltenyi Prodigy。在一些方面,扩增培养在静态条件下进行。在一些实施方案中,扩增培养在摇摆条件下进行。培养基可以以推注来添加或者可以按灌注时间表来添加。在一些实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将CO2水平维持在为或接近5%,且将稳定气流维持在为、为约或至少0.01L/min、0.05L/min、0.1L/min、0.2L/min、0.3L/min、0.4L/min、0.5L/min、1.0L/min、1.5L/min或2.0L/min或大于2.0L/min。在某些实施方案中,培养的至少一部分用灌注进行,如速率为290ml/天、580ml/天和/或1160ml/天。

[0424] 在一些实施方案中,将细胞以$0.5x10^6$个细胞/mL至$1.5x10^6$个细胞/mL的密度接种于适当培养器皿(例如透气性袋)中。在一些实施方案中,密度是为或约$0.5x10^6$个细胞/mL、$0.75x10^6$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL、$1.25x10^6$个细胞/mL或$1.5x10^6$个细胞/mL,或者任何前述值之间的任何值。

[0425] 在一些方面,在灌注启用的自动化封闭扩增系统中扩增细胞。灌注可以将培养基连续添加至细胞中,以确保实现最佳生长速率。

[0426] 在一些实施方案中,使用Xuri细胞扩增系统生物反应器来进行扩增。可以以0.5-1.5百万个细胞/mL来接种细胞。可以在静态或摇摆条件下培养细胞。培养基可以以推注来添加或者按灌注时间表添加。在实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将CO2水平维持在为或接近5%。可以将培养物的体积维持在大约0.5L至1.0L。在一些实施方案中,扩增进行7-14天,如7-10天。在一些方面,扩增在扩增后产生1亿至500亿个细胞和/或导致10至1000倍扩增的倍数扩增。

[0427] 在一些实施方案中,使用Miltenyi Prodigy生物反应器进行扩增。可以以0.5-1.5百万个细胞/mL来接种细胞。可以在静态或振荡条件下培养细胞。培养基可以以推注来添加或者按灌注时间表添加。在实施方案中,生物反应器将温度维持在为或接近37℃,并且将

CO2水平维持在为或接近5％。可以将培养物的体积维持在大约70mL至400mL。在一些实施方案中，扩增进行7-14天，如7-10天。在一些方面，扩增在扩增后产生1亿至30亿个细胞和/或导致扩增10至1000倍。

[0428] 在一些实施方案中，使用透气性袋进行扩增。可以以0.5-1.5百万个细胞/mL来接种细胞。可以在静态条件下培养细胞。在实施方案中，生物反应器将温度维持在为或接近37℃，并且将CO2水平维持在为或接近5％。在此类方面，在细胞浓度超过2.0百万个细胞/mL时，可以添加培养基以使细胞浓度达到0.5与1.0百万个细胞/mL之间。如果体积达到袋的最大体积，则将细胞添加至更大的袋或多个袋中，用于在相同条件下培养。在一些实施方案中，扩增进行7-14天，如7-10天。

[0429] 扩增方法可以在GMP条件下进行，包括在封闭的自动化系统中且使用无血清培养基。在一些实施方案中，所述方法的任何一个或多个步骤可以在封闭系统中或者在GMP条件下进行。在某些实施方案中，所有过程操作都在GMP套件中进行。在一些实施方案中，使用封闭系统进行用于制造、生成或产生细胞疗法的方法的一个或多个其他处理步骤。在一些实施方案中，一个或多个或者所有处理步骤(例如，分离、选择和/或富集、处理、培养步骤，包括与细胞扩增结合的孵育)以及配制步骤使用集成式或自容式系统中的系统、装置或设备，和/或以自动化或可编程方式来进行。在一些方面，所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序，其允许用户对处理、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、结果评估和/或调整。

[0430] 在一些实施方案中，用所述一种或多种T细胞刺激剂进行孵育以扩增肿瘤反应性细胞进行为或约1天，如通常是为或约2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天或任何前述时间之间的任何时间范围。在一些实施方案中，用所述一种或多种T细胞刺激剂进行孵育以扩增肿瘤反应性细胞进行7-21天，如7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14,天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天，或者任何前述值之间的任何值。在一些实施方案中，孵育进行7-14天。在一些实施方案中，孵育进行7-10天。在一些实施方案中，孵育持续为或约7天。在一些实施方案中，孵育持续为或约8天。在一些实施方案中，孵育持续为或约9天。在一些实施方案中，孵育持续为或约10天。在一些情形中，在培养或孵育时间期间可以将培养基每天、每隔一天、每三天、每5天或每周更换一次。在一些实施方案中，在每次培养基更换时补充刺激剂(例如细胞因子、抗CD3)。

[0431] 在一些实施方案中，进行根据所提供的任何方法的用于扩增细胞的培养方法，直至获得阈值量的细胞(如肿瘤反应性细胞或对一种或多种T细胞激活标记物呈阳性的细胞)。在一些实施方案中，进行根据所提供的任何方法的用于扩增细胞的培养方法，直至从富集淋巴细胞的时间起至多30天。例如，在特定实施方案中，进行根据所提供的任何方法的用于扩增细胞的培养方法，直至从开始培养的时间起至多30天。在一些实施方案中，进行根据所提供的任何方法的用于扩增细胞的培养方法，直至在第一次扩增开始后至多20天。在一些实施方案中，进行根据所提供的任何方法的用于扩增细胞的培养方法，直至在共培养开始后至多20天。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，在培养和/或富集包含肿瘤反应性细胞的T细胞开始后20天内进行收获。在一些方面，在如下时间收获细胞：为或约7天、为或约8天、为或约9天、为或约10天、为或约11天、为或约12天、为或约13天、为或约14天、为或约15天、为或约16天、为或约17天、为或约18天、为或约19天、为或约20天、为或约21

天、为或约22天、为或约22天、为或约23天、为或约24天、为或约25天、为或约26天、为或约27天、为或约28天、为或约29天、为或约30天，或者任何前述值之间的任何值。在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，在培养开始后7至20天、7至14天、7至10天、10至20天、10至14天或14至20天收获细胞。应理解，提及天数是参考细胞存在于培养中的天数，并且不包括来自任何一个或多个步骤的细胞可以在用于冷冻保存的条件下储存的时间。

[0432] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，进行培养直至达到如下阈值细胞量：为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞或者为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间的总细胞或总活细胞，每个都包含端值。

[0433] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述方法导致T细胞的倍数扩增或导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增，所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或更多。

[0434] 在扩增后在达到治疗剂量后，可以将产物浓缩并在冷冻保存介质中冷冻。本文还提供了通过本文所述的方法产生的T细胞群及其药物组合物。

[0435] 在所提供的任何实施方案的一些实施方案中，所述方法进一步包括用冷冻保护剂配制经收获的细胞。在一些实施方案中，冷冻保护剂选自甘油、丙二醇、二甲亚砜(DMSO)或其组合。在一些实施方案中，冷冻保护剂包括DMSO。在一些实施方案中，冷冻保护剂是DMSO。

[0436] 在一些实施方案中，用含有1.0％至30％DMSO溶液(如5％至20％DMSO溶液或5％至10％DMSO溶液)的冷冻保存溶液配制细胞。在一些实施方案中，冷冻保存溶液是或包含例如含有20％DMSO和8％人血清白蛋白(HSA)的PBS，或其他合适的细胞冷冻培养基。在一些实施方案中，冷冻保存溶液是或含有例如至少或约7.5％DMSO。在一些实施方案中，处理步骤可以涉及洗涤经收获的细胞以替代冷冻保存溶液中的细胞。在一些实施方案中，将细胞冷冻(例如，冷冻保存或冷冻保护)在具有终浓度为或为约12.5％、12.0％、11.5％、11.0％、10.5％、10.0％、9.5％、9.0％、8.5％、8.0％、7.5％、7.0％、6.5％、6.0％、5.5％或5.0％的DMSO，或在1％与15％之间、在6％与12％之间、在5％与10％之间或在6％与8％之间的DMSO的培养基和/或溶液中。在特定实施方案中，将细胞冷冻(例如，冷冻保存或冷冻保护)在具有终浓度为或为约5.0％、4.5％、4.0％、3.5％、3.0％、2.5％、2.0％、1.5％、1.25％、1.0％、0.75％、0.5％或0.25％的HSA，或在0.1％与5％之间、在0.25％与4％之间、在0.5％与2％之间或在1％与2％之间的HSA的培养基和/或溶液中。

II.T细胞调节剂或佐剂

[0437] 在一些实施方案中，所述方法包括离体培养含有肿瘤反应性T细胞的T细胞群，其中培养的至少一部分包括用另外的调节剂进行孵育，所述另外的调节剂如一种或多种调节细胞因子、阻断免疫抑制因子(如生长因子、细胞因子或酶)的药剂、免疫检查点抑制剂或其他T细胞佐剂(包括药物激动剂)。将一种或多种调节剂或T细胞佐剂添加至T细胞的制造中可以增加T细胞的离体功能性以及用于在体内治疗方法中使用。在特定实施方案中，与非反应性T细胞相比，此类方法可以富集以供扩增反应性T细胞，并且促进其在离体培养中的存活和生长。预期所提供的方法可以比现有方法更大程度地增加扩增至治疗剂量和/或针对治疗效果增加T细胞疗法的功能性。

[0438] 在一些实施方案中，培养方法可以另外包括(1)使用一种或多种调节剂，例如另外的T细胞佐剂，如在一种或多种标准T细胞刺激剂(如抗CD3/抗CD28和/或重组细胞因子)之前或与其同时，和/或(2)进一步涉及富集或选择肿瘤反应性T细胞或对与肿瘤反应性T细胞相关的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。

[0439] 在特定实施方案中，调节剂或T细胞佐剂(如共刺激激动剂或细胞凋亡抑制剂)是可溶性蛋白，如不结合或附着至固体表面(例如珠或其他固体支持物)的蛋白质。调节剂或T细胞佐剂可以包括小分子、肽或蛋白质。此类T细胞佐剂包括可溶性配体、抗体或抗原结合片段或者其他结合剂。在一些实施方案中，共刺激激动剂可以包括与共刺激分子(如4-1BB或OX40)特异性结合的分子，以诱导或刺激细胞中的共刺激信号。在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂可以包括与介导或参与诱导细胞中的细胞凋亡的受体特异性结合的分子。在一些实施方案中，T细胞佐剂是检查点调节剂，如检查点抑制剂，包括但不限于PD-1的拮抗剂。在一些实施方案中，T细胞佐剂是或者可以包括热休克蛋白抑制剂，包括但不限于Hsp90蛋白的抑制剂。在一些实施方案中，调节剂是调节细胞因子，例如IL-23、IL-25、IL-27或IL-35。在一些实施方案中，调节剂是免疫抑制阻断剂。在一些实施方案中，这些分子可以在制造过程期间容易地去除，如通过结合细胞制造或在最终配制细胞以供施用之前洗涤细胞。

[0440] 在所提供的方法的方面，在所提供的方法的一个或多个或者所有步骤期间可以包括所述一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些实施方案中，在来自生物样品的T细胞的第一次或初始扩增期间包括所述一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些实施方案中，在从共

培养物富集肿瘤反应性T细胞后，在T细胞的第二次或最终扩增期间包括所述一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些实施方案中，在第一次扩增和第二次扩增两者期间包括所述一种或多种调节剂或T细胞佐剂。在一些情形中，在T细胞与APC/肽新表位的共培养期间包括所述一种或多种调节剂或T细胞佐剂。

[0441] 在所提供的任何方法的实施方案中，用所述至少一种调节剂或T细胞佐剂(如一种或多种调节细胞因子、免疫抑制阻断剂、共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、热休克蛋白抑制剂和/或细胞凋亡抑制剂)中的每一种进行的孵育在培养的整个过程期间或在所述培养的一部分期间独立地继续。在一些实施方案中，用所述至少一种调节剂或T细胞佐剂中的每一种进行的孵育持续不超过14天、不超过12天、不超过10天、不超过7天、不超过5天、不超过3天或不超过2天。在一些实施方案中，用所述至少一种调节剂或T细胞佐剂中的每一种进行的孵育独立地持续12小时至96小时，如24小时至48小时，并且通常是为或约48小时。

A.调节细胞因子

[0442] 在所提供的实施方案中，所述方法包括在调节T细胞活性的条件下用来自IL-23、IL-25、IL-27或IL-35中的一种或多种的一种或多种调节细胞因子离体培养或孵育含有T细胞群的细胞。

[0443] 在一些实施方案中，在被添加至培养基中或对于培养基外源的调节细胞因子的存在下孵育或培养T细胞群，如在第一次或第二次扩增期间，所述调节细胞因子是重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27和/或重组IL-35。在一些实施方案中，培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在重组IL-23的存在下进行。在一些实施方案中，培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在重组IL-25的存在下进行。在一些实施方案中，培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在重组IL-27的存在下进行。在一些实施方案中，培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在重组IL-35的存在下进行。在一些实施方案中，培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在重组IL-23和重组IL-25的存在下进行。

[0444] 在一些实施方案中，重组IL-23存在于细胞培养基中。IL-23是一种通过IL-23受体发信号的细胞因子，所述IL-23受体通常在经激活的记忆T细胞上上调。IL-23结合导致JAK/STAT途径(即JAK2和STAT3)的激活。JAK信号传导导致NF-kB p50/p65的激活，所述NF-kB p50/p65结合IL17启动子并上调其表达。STAT3激活导致IL-17启动子以及RORγT的直接结合。在一些方面，此双重机制导致有效且持续的IL-17产生，以维持Th17细胞子集。IL-23在炎症性T细胞反应中起作用，并且是许多自身免疫性疾病治疗干预的靶标。在一些方面，IL-23作为已知作用于记忆T细胞的促炎细胞因子的活性可以用于激活和扩增经历过抗原的T细胞。

[0445] IL-23含有两个通过二硫键连接的亚基，即P19(IL23a)亚基和P40(IL12b)亚基。人IL-23的示例性序列如下所示：

P19(UniProt Q9NPF7 20-189;SEQ ID NO:1)

RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDLREEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQGLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQPEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAVAARVFAHGAATLSP

P40(UniProt P29460 23-328;SEQ ID NO:2)

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCH

KGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGV TCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW ASVPCS

[0446] 在一些实施方案中，重组IL-23是异二聚体，其含有与SEQ ID NO:1所示的序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性并且与SEQ ID NO:2所示的序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中异二聚体的两个亚基通过二硫键连接，并且所述序列展现出重组IL-23的活性，如结合IL-23受体和介导经由IL-23受体的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-23具有通过二硫键连接的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-23的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:1和/或2所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-23是人序列。在特定实施方案中，IL-23是GMP级试剂。

[0447] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-23可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-23可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如在实体瘤培养物或者已知或预期含有肿瘤反应性T细胞或TIL的其他样品中，以促进经历过抗原的T细胞的优先激活和回收，导致从大量T细胞分离的新抗原反应性细胞的频率增加。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-23还可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述，这可以在扩增过程期间加强其持续活性和增殖。

[0448] 在一些实施方案中，将重组IL-23以如下浓度添加至培养基中：在为或约1nM与为或约500nM之间，如在为或约1nM与为或约400nM之间、在为或约1nM与为或约300nM之间、在为或约1nM与为或约200nM之间、在为或约1nM与为或约100nM之间、在为或约1nM与为或约50nM之间、在为或约1nM与为或约25nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约5nM与为或约500nM之间、在为或约5nM与为或约400nM之间、在为或约5nM与为或约300nM之间、在为或约5nM与为或约200nM之间、在为或约5nM与为或约100nM之间、在为或约5nM与为或约50nM之间、在为或约5nM与为或约25nM之间、在为或约5nM与为或约10nM之间、在为或约10nM与为或约500nM之间、在为或约10nM与为或约400nM之间、在为或约10nM与为或约300nM之间、在为或约10nM与为或约200nM之间、在为或约10nM与为或约100nM之间、在为或约10nM与为或约50nM之间、在为或约10nM与为或约25nM之间、在为或约25nM与为或约500nM之间、在为或约25nM与为或约400nM之间、在为或约25nM与为或约300nM之间、在为或约25nM与为或约200nM之间、在为或约25nM与为或约100nM之间、在为或约25nM与为或约50nM之间、在为或约50nM与为或约500nM之间、在为或约50nM与为或约400nM之间、在为或约50nM与为或约300nM之间、在为或约50nM与为或约200nM之间、在为或约50nM与为或约100nM之间、在为或约100nM与为或约500nM之间、在为或约100nM与为或约400nM之间、在为或约100nM与为或约300nM之间、在为或约100nM与为或约200nM之间、在为或约200nM与为或约500nM之间、在为或约200nM与为或约400nM之间、在为或约200nM与为或约300nM之间、在为或约300nM与为或约500nM之间、在为或约300nM与为或约400nM之间或者

在为或约400nM与为或约500nM之间。在一些实施方案中，将重组IL-23以如下浓度添加至培养基中：为或约5nM、为或约10nM、为或约20nM、为或约30nM、为或约40nM、为或约50nM、为或约60nM、为或约70nM、为或约80nM、为或约90nM或者为或约100nM，或者任何前述值之间的任何值。

[0449] 在一些实施方案中，将重组IL-23以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0450] 在一些实施方案中，将重组IL-23以如下浓度添加至培养基中：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0451] 在一些实施方案中，将重组IL-23以如下浓度添加至培养基中：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0452] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-23添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加重组IL-23。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-23的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-23的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/

mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间,如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-23的存在下进行。在一些实施方案中,将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-25、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0453] 在一些实施方案中,重组IL-25存在于细胞培养基中。IL-25属于IL-17家族,并且也称为IL-17E。IL-25结合由两个亚基IL-17RA和IL-17RB构成的异二聚体受体。IL-25是一种炎性细胞因子,其通常支持Th2细胞发育。已经证明IL-25可减少IFNγ产生,并且使免疫反应偏离Th1/Th17反应。还已经证明IL-25可刺激NFkB活性,这可以广泛地激活细胞。

[0454] 人IL-25的示例性序列如下所示:

(UniProt Q9H293 33-177;SEQ ID NO:3)

YSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISP

WRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRP

CHGEKGTHKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG

[0455] 在一些实施方案中,重组IL-25具有与SEQ ID NO:3所示的序列具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列,其中所述序列展现出重组IL-25的活性,如与其异二聚体受体的亚基结合以及介导经由IL-25(IL-17RA/IL-17RB)受体的信号传导的能力。在一些实施方案中,重组IL-25具有SEQ ID NO:3所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如,重组IL-25的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸,长或短如1-10个,例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中,重组IL-25是人序列。在特定实施方案中,IL-25是GMP级试剂。

[0456] 在所提供的过程的各个阶段期间,重组IL-25可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中,重组IL-25可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中,如在从实体组织分离和扩增TIL期间,以支持Th2 CD4 T细胞的保存和扩增。在一些情形中,在第二个扩增期期间,重组IL-25可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中,如章节I.E中所述。例如,在TIL扩增期间,IL-25可以被包括在第9-16天的培养基中,以促进CD4/CD8平衡和/或维持T细胞激活率。IL-25的使用可以有助于驱动T细胞增殖以及促进NFkB活性并增强T细胞扩增和激活。

[0457] 在一些实施方案中,将重组IL-25以在为或约0.001nM与为或约10nM之间的浓度,如以如下浓度添加至培养基中:在为或约0.001nM与为或约5nM之间、在为或约0.001nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.001nM与为或约1nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.01nM之间、在为或约0.001nM与为或约0.005nM之间、在为或约0.005nM与为或约10nM之间、在为或约0.005nM与为或约5nM之间、在为或约0.005nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.005nM与为或约1nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.005nM与为或约0.01nM之间、在为或约0.01nM与为或约10nM之间、在为或约0.01nM与为或

约5nM之间、在为或约0.01nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.01nM与为或约1nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.01nM与为或约0.05nM之间、在为或约0.05nM与为或约10nM之间、在为或约0.05nM与为或约5nM之间、在为或约0.05nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.05nM与为或约1nM之间、在为或约0.05nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.05nM与为或约0.1nM之间、在为或约0.1nM与为或约10nM之间、在为或约0.1nM与为或约5nM之间、在为或约0.1nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.1nM与为或约1nM之间、在为或约0.1nM与为或约0.5nM之间、在为或约0.5nM与为或约10nM之间、在为或约0.5nM与为或约5nM之间、在为或约0.5nM与为或约2.5nM之间、在为或约0.5nM与为或约1nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约1nM与为或约2.5nM之间、在为或约2.5nM与为或约10nM之间、在为或约2.5nM与为或约5nM之间或者在为或约5nM与为或约10nM之间。在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：为或约0.01nM、0.02nM、0.03nM、0.04nM、0.05nM、0.06nM、0.07nM、0.08nM、0.09nM或1nM、1.5nM或2nM或者任何前述值之间的任何值。

[0458] 在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.01ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约0.01ng/mL与为或约0.05ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约0.05ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约5ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约5ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约20ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约20ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间或者在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间。在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：为或约1ng/mL、为或约2ng/mL、为或约3ng/mL、为或约4ng/mL、为或约5ng/mL、为或约6ng/mL、为或约7ng/mL、为或约8ng/mL、为或约9ng/mL、为或约10ng/mL、为或约15ng/mL或者为或约20ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0459] 在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。

[0460] 在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：为或约1ng/mL、为或约5ng/mL、为或约10ng/mL、为或约20ng/mL、为或约30ng/mL、为或约40ng/mL、为或约50ng/mL、为或约60ng/mL、为或约70ng/mL、为或约80ng/mL、为或约90ng/mL或者为或约100ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0461] 在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0462] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-25添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加重组IL-25。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-25的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-25的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-25的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-27或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基

中。

[0463] 在一些实施方案中，重组IL-27存在于细胞培养基中。IL-27是一种细胞因子，其通过IL-27受体发信号，启动包括JAK-STAT和p38 MAPK在内的信号途径的激活。在一些情形中，IL-27可以诱导或抑制Treg，以及在一些情形中其他T细胞子集，如TH1细胞。IL-27可以调节Treg反应，并且将效应T细胞编程为干细胞样记忆效应细胞，这可以增强T细胞在肿瘤微环境中的存活。

[0464] IL-27是2条链IL27A(IL27p28)和IL27B(EBI3)的异二聚体。人IL-27的示例性序列如下所示：

P28:

FPRPPGRPQL SLQELRREFT VSLHLARKLL SEVRGQAHRF AESHLPGVNL YLLPLGEQLP DVSLTFQAWR RLSDPERLCF ISTTLQPFHA LLGGLGTQGR WTNMERMQLW AMRLDLRDLQ RHLRFQVLAA GFNLPEEEEE EEEEEEEERK GLLPGALGSA LQGPAQVSWP QLLSTYRLLH SLELVLSRAV RELLLLSKAG HSVWPLGFPT LSPQP（SEQ ID NO:4）

EB13

RKGPP AALTLPRVQC RASRYPIAVD CSWTLPPAPN STSPVSFIAT YRLGMAARGH SWPCLQQTPT STSCTITDVQ LFSMAPYVLN VTAVHPWGSS SSFVPFITEH IIKPDPPEGV RLSPLAERQL QVQWEPPGSW PFPEIFSLKY WIRYKRQGAA RFHRVGPIEA TSFILRAVRP RARYYVQVAA QDLTDYGELS DWSLPATATM SLGK（SEQ ID NO:5）

[0465] 在一些实施方案中，重组IL-27是异二聚体，其含有与SEQ ID NO:4所示的序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性并且与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中异二聚体展现出重组IL-27的活性，如结合IL-27受体和介导经由IL-27受体的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-27具有作为异二聚体连接的SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-27的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:4和/或5所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-27是人序列。在特定实施方案中，IL-27是GMP级试剂。

[0466] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-27可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-27可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如在实体瘤培养物或者已知或预期含有肿瘤反应性T细胞或TIL的其他样品中，以促进经历过抗原的T细胞的优先激活和回收，导致从大量T细胞分离的新抗原反应性细胞的频率增加。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-27还可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述，这可以在扩增过程期间加强其持续活性和增殖。

[0467] 在一些实施方案中，将重组IL-27以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为

或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，浓度在400ng/mL与500ng/mL之间。

[0468] 在一些实施方案中，将重组IL-27以如下浓度添加至培养基中：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0469] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-27添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加重组IL-27。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-27的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-27的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-27的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-25或IL-35的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0470] 在一些实施方案中，重组IL-35存在于细胞培养基中。IL-35是一种细胞因子，其在一些情形中可以抑制炎症反应。IL-35还对不同的T细胞子集具有选择性活性。在T细胞中，IL-35结合gp130和IL-12Rβ2，以通过gp130/IL-12Rβ2异二聚体或每个亚基的同二聚体发信号。IL-35对受体的接合引发STAT激活和信号传导，如经由JAK-STAT介导的途径。

[0471] IL-35是一种异二聚体蛋白，其含有来自IL-12的p35亚基(IL-12α)和来自IL-27的β亚基(EBI3)。

P35

RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS（SEQ ID NO:6）

EB13

RKGPP AALTLPRVQC RASRYPIAVD CSWTLPPAPN STSPVSFIAT YRLGMAARGH SWPCLQQTPT STSCTITDVQ LFSMAPYVLN VTAVHPWGSS SSFVPFITEH IIKPDPPEGV RLSPLAERQL QVQWEPPGSW PFPEIFSLKY WIRYKRQGAA RFHRVGPIEA TSFILRAVRP RARYYVQVAA QDLTDYGELS DWSLPATATM SLGK（SEQ ID NO:5）

[0472] 在一些实施方案中，重组IL-35是异二聚体，其含有与SEQ ID NO:6所示的序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性并且与SEQ ID NO:5所示的序列具有至少或至少约85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列，其中异二聚体展现出重组IL-35的活性，如结合IL-35受体和介导经由IL-35受体(例如gp130和IL-12Rβ2亚基)的信号传导的能力。在一些实施方案中，重组IL-35具有作为异二聚体连接的SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:5所示的序列。SEQ ID NO的示例不应解释为限制性的。例如，重组IL-35的特定序列或其单独亚基可以在N末端或C末端中的一个或两个处比相应SEQ ID NO:4和/或5所示的氨基酸序列长或短几个氨基酸，长或短如1-10个，例如1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。在一些实施方案中，重组IL-35是人序列。在特定实施方案中，IL-35是GMP级试剂。

[0473] 在所提供的过程的各个阶段期间，重组IL-35可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，重组IL-35可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如在实体瘤培养物或者已知或预期含有肿瘤反应性T细胞或TIL的其他样品中，以促进经历过抗原的T细胞的优先激活和回收，导致从大量T细胞分离的新抗原反应性细胞的频率增加。在一些情形中，在第二个扩增期期间，重组IL-35还可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述，这可以在扩增过程期间加强其持续活性和增殖。

[0474] 在一些实施方案中，将重组IL-35以如下浓度添加至培养基中：在为或约0.1ng/mL与为或约2000ng/mL之间，如在为或约0.1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约0.1ng/mL与为或约1ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约1ng/mL与为或约10ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约10ng/mL与为或约50ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约250ng/mL之间、在为或约50ng/mL与为或约100ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约500ng/mL之间、在为或约100ng/mL与为或约

250ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约1000ng/mL之间、在为或约250ng/mL与为或约500ng/mL之间或者在为或约500ng/mL与为或约1000ng/mL之间。在一些实施方案中，浓度在400ng/mL与500ng/mL之间。

[0475] 在一些实施方案中，将重组IL-25以如下浓度添加至培养基中：为或约200ng/mL、为或约300ng/mL、为或约400ng/mL、为或约500ng/mL、为或约600ng/mL、为或约700ng/mL、为或约800ng/mL、为或约900ng/mL、为或约1000ng/mL、为或约1200ng/mL、为或约1400ng/mL或者为或约1600ng/mL、为或约1800ng/mL或者为或约2000ng/mL，或者任何前述值之间的任何值。

[0476] 在一些实施方案中，将重组IL-2和重组IL-35添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以100ng/mL至2000ng/mL(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加重组IL-35。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-35的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-35的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以在100ng/mL与2000ng/mL之间(例如在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL)的浓度添加的重组IL-35的存在下进行。在一些实施方案中，将来自IL-7、IL-21、IL-15、IL-23、IL-25或IL-27的至少一种其他重组调节细胞因子添加至培养基中。

[0477] 在一些实施方案中，在用调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35)孵育之后或与其同时，还在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下使T细胞群与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3或抗CD28刺激剂)和/或重组T细胞刺激细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)接触。在一些实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂包括来自IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15的T细胞刺激细胞因子。在特定实施方案中，所述一种或多种T细胞刺激剂至少包括重组IL-2。在一些此类方面，如在从来自受试者的样品分离和刺激后和/或在培养期间在肿瘤反应性T细胞的富集和扩增期间，包括调节细胞因子(例如重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27、重组IL-35)改进潜在的目的肿瘤反应性T细胞(如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的离体回收和/或扩增。

B.免疫抑制阻断剂

[0478] 在所提供的实施方案中，所述方法包括在调节T细胞活性的条件下用能够减少或降低免疫抑制因子(例如细胞因子、生长因子或酶，如IL-27、IL-35、TGFβ或IDO中的一种或多种)的活性的一种或多种阻断剂离体孵育或培养含有T细胞群的细胞。

[0479] 在一些实施方案中，在阻断或降低IL-27活性的药剂的存在下，孵育或培养T细胞群，如在第一次或第二次扩增期间。在一些实施方案中，培养或孵育(如在第一次和/或第二

次扩增期间)在阻断或降低IL-35活性的阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中,培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在阻断或降低TGFβ活性的阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中,培养或孵育(如在第一次和/或第二次扩增期间)在阻断或降低IDO活性的阻断剂的存在下进行。在一些实施方案中,可以使用以上任何方法的组合。

[0480] 免疫抑制阻断剂或拮抗剂可以是与细胞因子或生长因子结合并抑制或降低其与其受体结合和/或介导经由其受体的信号传导的能力的任何分子。

[0481] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂可以是细胞因子或生长因子的天然受体的可溶形式。在一些情形中,同源受体的细胞外配体结合部分可以通过与免疫球蛋白Fc连接以产生可溶性拮抗剂试剂而作为融合蛋白产生。在一些实施方案中,Fc是IgG1 Fc,或者是其具有降低的Fc效应子功能(如降低的结合FcγR、C1q和/或介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力)的变体。免疫球蛋白IgG1 Fc中降低效应子功能的示例性突变包括但不限于L235E、G236A、N297A、L234A/L235A、E233P/L234V/L235A、C220S/C226S/C229S/P238S、C226S/C229S/E233P/L234V/L235A、M252Y/S254T/T256E、K326W。

[0482] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂或拮抗剂可以是与细胞因子或生长因子结合的抗体或抗原结合片段。例如,与细胞因子或生长因子的结合可以抑制或降低相应细胞因子或生长因子与其相应同源受体结合的能力。

[0483] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂减少或降低细胞因子或生长因子与它的同源受体或其亚基的结合。在一些实施方案中,结合减少大于或大于约50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂减少或降低通过免疫抑制细胞因子或生长因子的同源受体的信号传导,如将信号传导减少或降低大于或大于约50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0484] 在一些实施方案中,减少、降低或抑制IL-27活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。IL-27是一种异二聚体,其含有p28亚基和EB病毒诱导基因3(EBI3;也称为IL-27β)。IL-27是一种与IL-27受体(IL-27R)结合的细胞因子,所述受体由两个亚基IL-27α和gp130(也称为IL-27β)构成。IL-27与IL-27受体的结合诱导JAK-STAT和p38 MAPK信号传导。IL-27具有调节和促炎两种功能。已经证明IL-27可上调肿瘤细胞中的PD-L1和IDO,这在一些情形中导致强烈的免疫抑制环境。当仍然在实体瘤的存在下时,此活性可能导致TIL的抑制和耗竭增强。

[0485] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是IL-27受体的亚基的可溶形式。在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是IL-27Rα的可溶形式。例如,阻断剂可以是IL-27Ra Fc融合蛋白。在一些实施方案中,IL-27阻断剂可以包括与人IgG1的Fc(例如IgG1的残基Pro100-Lys330)连接的人IL-27Rα(例如UniProt登录号Q6UWB1)的残基Gly34-Lys516。用于在所提供的方法中使用的IL-27Ra Fc融合蛋白阻断剂是已知的和/或市售的,参见例如来自R&D Systems的目录号1479-TC-050。在一些实施方案中,阻断剂是IL-27Rα(sIL-27Rα)的天然可溶形式,参见例如Dietrich等人J Immunol.192:5382-5389。在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是gp130的可溶形式。例如,阻断剂可以是gp130 Fc融合蛋白。在一些实施方案中,IL-27阻断剂可以包括与人IgG1的Fc(例如IgG1的残基Pro100-Lys330)连接的人gp130(例如UniProt登录号P40189)的残基Glu23-Ile618。用于在所提供的方法中使用的gp130 Fc融合蛋白阻断剂是已知的和/或市售的,参见例如来自R&D Systems的目录号671-GP-100。

[0486] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-27的单克隆抗体,其阻断IL-27与IL-27R或其亚基结合的能力。各种单克隆抗体是已知的并且是可用的。在一些实施方案中,该抗体针对细胞因子的IL-27β(IL-27b)链,由于相应细胞因子的共享亚基,所述抗体也可以起到阻断IL-35活性的作用。针对IL-27b的各种单克隆抗体是已知的。示例性抗体包括但不限于抗体MAB6456(R&D Systems)或克隆V1.4H6.25。

[0487] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-27R或其亚基的单克隆抗体。

[0488] 在所提供的过程的各个阶段期间,IL-27阻断剂可以被包括在细胞培养基中。

在一些情形中,IL-27阻断剂可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中,如在从实体瘤分离和扩增TIL期间,这可以防止免疫抑制环境的产生和/或防止调节性T细胞的诱导。在一些情形中,在第二个扩增期期间,IL-27阻断剂可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中,如章节I.E中所述。例如,在扩增TIL和分离新抗原反应性T细胞后在培养中阻断IL-27可以为肿瘤反应性T细胞或TIL提供益处。IL-27信号传导可以促进抑制性、调节性表型,从而阻止新抗原特异性TIL的有效细胞溶解活性。在所提供的过程中使用IL-27阻断剂可以避免任何免疫抑制刺激,同时促进肿瘤反应性T细胞或TIL的活性。

[0489] 在一些实施方案中,减少、降低或抑制IL-35活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。IL-35是一种异二聚体,其由EB病毒诱导基因3(EBI3,也称为IL-17β)和p35亚基(被IL-12共享)构成。IL-35与IL-35受体结合,所述受体由IL-12Rβ2和gp130(也称为IL-27β)链构成。IL-35是一种免疫抑制细胞因子,其中与其受体的结合通过STAT1/STAT4发信号以诱导TGFβ和IL-35产生。IL-35抑制抗肿瘤T细胞,并且促进调节性T细胞反应和调节性T细胞的增殖。IL-35水平增加已经与肿瘤大小呈正相关,并且与无进展生存期呈负相关。IL-35产生和/或信号传导的阻断已经在癌症中显示出有益的结果,因为它们减少调节性T细胞的数量并限制肿瘤生长。IL-35的阻断还已经防止肿瘤特有的T细胞子集的耗竭。

[0490] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-35的单克隆抗体,其阻断IL-35与IL-35R或其亚基结合的能力。各种单克隆抗体是已知的并且是可用的。在某些实施方案中,抗体或抗原结合片段不结合至或识别IL-35的p35亚基,因为它被IL-12共享。在特定实施方案中,抗体针对IL-27β(EBI3)亚基。针对IL-27b的各种单克隆抗体是已知的。示例性抗体是抗EBI3抗体/IL-35克隆V1.4H6.25或MAB6456。

[0491] 在一些实施方案中,免疫抑制阻断剂是针对IL-35R或其亚基的单克隆抗体。

[0492] 在所提供的过程的各个阶段期间,IL-35阻断剂可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中,IL-35阻断剂可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中,如在从实体瘤分离和扩增TIL期间,这可以防止肿瘤微环境中的免疫抑制信号传导,从而导致TIL回收和增殖增加。在此类例子中,阻断剂(例如抗体)还可以防止调节性T细胞的长出并减少它们在经分离的TIL培养物中的存在。在一些情形中,在第二个扩增期期间,IL-35阻断剂可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中,如章节I.E中所述。

[0493] 在一些实施方案中,减少、降低或抑制TGFbeta(TGFβ)活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。TGFβ由调节性T细胞产生,并且是效应T细胞功能的有效抑制剂。TGFβ还由上皮或内皮细胞产生,并且有助于强烈的免疫抑制肿瘤微环境。在完全发展的肿瘤的背景下,TGFβ的上调可以导致细胞毒功能的下调并增加TIL的耗竭。总体而言,已经证明高水平的TGFβ可抑制抗肿瘤T细胞免疫并促进肿瘤存活。

[0494] 在一些实施方案中，免疫抑制阻断剂是针对TGFβ的单克隆抗体，其阻断TGFβ与其受体结合的能力。在一些实施方案中，抗体是非苏木单抗(GC1008)或其抗原结合片段。非苏木单抗是一种结合至并抑制TGF-β的所有亚型的抗体。其他免疫抑制阻断剂包括但不限于阻断TGFβ1基因转录的小分子化合物，如吡咯-咪唑聚酰胺药物；靶向TGFβ1或TGFβ2mRNA进行降解的反义RNA(例如ISTH0036或ISTH0047)；针对TGFβ配体的抗体(例如上述非苏木单抗；还有XPA681、XPA089、LY238770)或受体的抗体(例如LY3022859)；或者小分子ATP-模拟物TβRI激酶抑制剂(例如加尼舍替或TEW-7197)，参见例如Akhurst Cold Spring Harb Perspect Biol 2017,9:a022301。

[0495] 在所提供的过程的各个阶段期间，TGFβ阻断剂可以被包括在细胞培养基中。在一些情形中，TGFβ阻断剂可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如在从实体瘤分离和扩增TIL期间，这可以减少免疫抑制信号传导。例如，由于来自具有高肿瘤负荷的患者的实体瘤将具有高水平的TGFβ，因此潜在的免疫抑制信号传导可能阻止TIL回收和扩增。这还可以产生正反馈环，以增加调节性T细胞的长出并加强另外的TGFβ产生。用阻断剂(如抗TGFβ抗体)阻断此信号传导可以增强经激活的TIL的回收(即未耗竭)，促进TIL扩增，并且防止调节性T细胞的增加。在一些情形中，在第二个扩增期期间，TGFβ阻断剂可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述。

[0496] 在一些实施方案中，减少、降低或抑制吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶(IDO)活性的免疫抑制阻断剂存在于细胞培养基中。IDO是一种含血红素的酶，其在人中由IDO1基因编码。它是催化犬尿氨酸途径中的第一限速步骤L-色氨酸到N-甲酰基犬尿氨酸的O2依赖性氧化的三种酶之一，其他酶是IDO2和色氨酸2,3-双加氧酶(TDO)。IDO通过其限制T细胞功能和参与免疫耐受机制的能力已经与免疫调节有牵涉。新出现的证据表明，IDO在肿瘤发展期间被激活，帮助恶性细胞逃脱免疫系统的根除。IDO是一种免疫检查点分子，从某种意义上说，它是由一些可替代激活的巨噬细胞和其他免疫调节细胞产生的免疫调节酶(也被许多肿瘤和慢性感染性病毒用作免疫破坏策略)。已知IDO抑制T和NK细胞，产生和激活Treg和髓源性抑制细胞，并且促进新血细胞的生长以饲养肿瘤(血管生成)。

[0497] IDO的各种抑制剂是已知的。IDO抑制剂是IDO1酶活性的化学抑制剂，从而防止色氨酸耗尽并恢复T细胞的增殖能力。抑制剂的例子是PF-06840003(可从MedKoo Biosciences,Inc.获得)。其他IDO抑制剂包括但不限于艾卡哚司他(INCB24360)、INCB23843、纳沃昔莫德(GDC-0919)、BMS-986205、伊马替尼或1-甲基-色氨酸。

[0498] 在所提供的过程的各个阶段期间，IDO抑制剂在细胞培养基中可以用作阻断剂。在一些情形中，IDO抑制剂可以被包括在初始T细胞扩增(第一次扩增)中，如在从实体瘤分离和长出或扩增TIL期间，这可以防止免疫调节细胞功能和调节性T细胞长出。例如，由于存在于肿瘤微环境中的抗原呈递细胞和内皮细胞产生IDO作为免疫抑制机制，因此使用抑制剂可以抵消此作用，并且在初始TIL扩增实验中导致新抗原反应性TIL激活和增殖增强。在一些情形中，在第二个扩增期期间，IL-35阻断剂可以被包括在用于扩增所选肿瘤反应性T细胞的培养中，如章节I.E中所述。

[0499] 在所提供的任何方法的实施方案中，在孵育期间将所述一种或多种免疫抑制阻断剂添加至细胞培养基中。在一些实施方案中，以范围如下的浓度添加免疫抑制阻断剂：在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.1μg/mL与为

或约25μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL、0.5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL、1μg/mL至为或约100μg/mL、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。

[0500] 在所提供的任何方法的实施方案中,在孵育期间将所述一种或多种免疫抑制阻断剂添加至细胞培养基中。在一些实施方案中,以范围如下的浓度添加免疫抑制阻断剂:在为或约0.001μM与为或约10μM之间、在为或约0.001μM与为或约5μM之间、在为或约0.001μM与为或约1μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.05μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.01μM之间、在为或约0.001μM与为或约0.005μM之间、在为或约0.005μM与为或约10μM之间、在为或约0.005μM与为或约5μM之间、在为或约0.005μM与为或约1μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.05μM之间、在为或约0.005μM与为或约0.01μM之间、在为或约0.01μM与为或约10μM之间、在为或约0.01μM与为或约5μM之间、在为或约0.01μM与为或约1μM之间、在为或约0.01μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.01μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.01μM与为或约0.05μM之间、在为或约0.05μM与为或约10μM之间、在为或约0.05μM与为或约5μM之间、在为或约0.05μM与为或约1μM之间、在为或约0.05μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.05μM与为或约0.1μM之间、在为或约0.1μM与为或约10μM之间、在为或约0.1μM与为或约5μM之间、在为或约0.1μM与为或约1μM之间、在为或约0.1μM与为或约0.5μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间或者在为或约5μM与为或约10μM之间。在一些实施方案中,以如下浓度添加免疫抑制阻断剂:为或约0.001μM、为或约0.005μM、为或约0.01μM、为或约0.05μM、为或约0.1μM、为或约0.5μM、为或约1μM、为或约2μM、为或约3μM、为或约4μM、为或约5μM、为或约6μM、为或约7μM、为或约8μM、为或约9μM或者为或约10μM,或者任何前述值之间的任何值。

[0501] 在一些实施方案中,在用所述一种或多种免疫抑制阻断剂孵育之后或与其同时,还在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下使T细胞群与一种或多种T细胞刺激剂(如抗CD3或抗CD28刺激剂)和/或重组T细胞刺激细胞因子(如IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15)接触。在一些实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂包括来自IL-2、IL-7、IL-21和/或IL-15的T细胞刺激细胞因子。在特定实施方案中,所述一种或多种T细胞刺激剂至少包括重组IL-2。在一些此类方面,如在从来自受试者的样品分离和刺激后和/或在培养期间在肿瘤反应性T细胞的富集和扩增期间,包括免疫抑制阻断剂改进潜在的目的肿瘤反应性T细胞(如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的离体回收和/或扩增。

C.T细胞刺激激动剂

[0502] 在所提供的实施方案中，所述方法包括在刺激或激活由样品中的一种或多种T细胞表达的共刺激受体的条件下用共刺激激动剂离体孵育富集T细胞群的细胞。在特定实施方案中，共刺激激动剂是4-1BB激动剂。在其他特定实施方案中，共刺激激动剂是OX40激动剂。在一些实施方案中，在用共刺激剂孵育之后或与其同时，还在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下使T细胞群与一种或多种T细胞刺激剂(如T细胞刺激细胞因子和/或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如如抗CD3/抗CD28珠))接触。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子包括来自重组IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的一种或多种重组细胞因子，其可以在孵育期间被包括以初始扩增在来自受试者的细胞群中的T细胞。在一些此类方面，共刺激激动剂(如4-1BB激动剂或OX40激动剂)提供初始刺激以增强或加强群体中T细胞的增殖能力和/或功能活性。

[0503] 在所提供的任何方法的方面，在一种或多种共刺激激动剂的存在下孵育T细胞群。在特定实施方案中，共刺激激动剂是与T细胞表面上的共刺激分子特异性结合以刺激细胞中的一种或多种细胞内信号和/或刺激T细胞的一种或多种功能或生物活性的分子。在一些实施方案中，激动剂促进T细胞的存活和活性。在一些实施方案中，共刺激分子是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFSR)的成员。示例性共刺激分子包括但不限于4-1BB、OX40、GITR和CD27。在一些实施方案中，共刺激激动剂是4-1BB激动剂、OX40激动剂、GITR激动剂或CD27激动剂。

[0504] 在一些实施方案中，共刺激激动剂是或包括与共刺激受体特异性结合的抗体或抗原结合片段。

[0505] 在一些实施方案中，共刺激激动剂是或包括共刺激受体的配体的细胞外结合结构域或其特异性结合部分。在一些情形中，细胞外结合结构域或其特异性结合片段是作为与另一种多肽的融合蛋白来提供，如以增加激动剂的结合亲合力。例如，在一些情形中，多肽是多聚化结构域，其可以促进分子的二聚化、三聚化、四聚化或五聚化。在特定实施方案中，融合蛋白是二聚体。在一些实施方案中，多聚化结构域包括如下任何氨基酸序列，所述氨基酸序列可以与互补多聚化结构域相互作用以形成稳定的蛋白质-蛋白质相互作用，以产生多肽分子与另一种多肽分子的多聚体。例如，多聚化结构域可以是能够与互补分子形成二硫键的分子。示例性多聚化结构域包括免疫球蛋白序列或其部分、亮氨酸拉链、疏水区、亲水区和相容的蛋白质-蛋白质相互作用结构域。例如，多聚化结构域可以是免疫球蛋白恒定区或结构域，如例如来自IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA、IgE、IgD和IgM及其修饰形式的Fc结构域或其部分。在一些实施方案中，共刺激激动剂是Fc融合蛋白。

[0506] 在一些实施方案中，共刺激激动剂是OX40(CD134)激动剂。OX40是一种细胞表面糖蛋白并且是肿瘤坏死因子受体家族(TNFRSF)的成员，其在T淋巴细胞上表达并且提供用于经激活的T细胞的增殖和存活的共刺激信号。与CD28不同，OX40通常不在静息幼稚T细胞上组成型表达。OX40是一种次级共刺激免疫检查点分子，其在一些方面在激活后24至72小时后表达；其配体OX40L也不在静息抗原呈递细胞上表达，但是在其激活后表达。OX40的表达依赖于T细胞的完全激活；在一些情形中，如在没有CD28刺激的情况下，OX40的表达被延迟并且其表达更低。在激活(例如用抗CD3(如OKT3)/抗CD28)后或在被诱导以呈递肿瘤抗原靶标的APC的离体共培养后，OX40可以在体内的T细胞上表达(与肿瘤共培养)。OX40与OX40L的结合触发OX40途径的激活。在一些实施方案中，此途径的激活导致其他途径的上调，从而导

致增加的激活、存活、记忆反应以及免疫抑制活性的降低。

[0507] 在一些实施方案中，OX40激动剂可以是能够与人或哺乳动物OX40结合的抗体或抗原结合片段或融合蛋白。在一些实施方案中，OX40激动剂结合至人OX40，如在T细胞表面上表达的人OX40。在一些实施方案中，OX40激动剂与OX40特异性结合，并且消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)，例如NK细胞的细胞毒性。在一些实施方案中，OX40激动剂消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。在一些实施方案中，OX40激动剂消除补体依赖性细胞毒性(CDC)。在一些方面，在OX40激动剂与OX40蛋白受体结合时，其触发与增加的T细胞和炎性细胞因子产生相关的共刺激信号。用于在所提供的方法中使用的OX40激动剂包括熟练技术人员已知的任何一种。

[0508] 在一些实施方案中，OX40激动剂是融合蛋白。OX40融合蛋白包括包含与OX40L的一部分融合的Fc结构域的那些融合蛋白，参见例如Sadun等人，(2009)J.Immunother.，182:1481-89。在一些实施方案中，可以使用多聚OX40激动剂，如三聚或六聚OX40激动剂(具有三个或六个配体结合结构域)。含有三个TNFRSF结合结构域并且作为与Fc的融合物的三聚(三价)或六聚(或六价)或更大融合蛋白是已知的并且可以使用，参见例如Gieffers等人(2013)Cancer Therapeutics，12:2735-47。

[0509] 在一些实施方案中，OX40激动剂是融合蛋白，其中OX40L的一个或多个结构域与一个或多个另外的蛋白质结构域共价连接。可以用作OX40激动剂的示例性OX40L融合蛋白描述于美国专利号6,312,700；7,622,444；国际专利申请公开号WO 2011109789；以及WO 2010105068中。在一些实施方案中，OX40激动剂包括自组装为多聚(例如，三聚或六聚)OX40L融合蛋白的OX40L融合多肽。此类融合蛋白描述于例如Morris等人(2007)Mol Immunol.44(12):3112-3121，美国专利号7,959,925中。可以根据本文所提供的一些实施方案使用的特定融合蛋白是MEDI6383(由AZY/Medlmmune生产)，其为一种人OX40配体融合蛋白，参见例如美国专利号6,312,700。

[0510] 在一些实施方案中，OX40激动剂是特异性结合OX40的抗体或抗原结合片段。用于在所提供的方法中使用的示例性OX40激动剂包括但不限于他佛利珠单抗(也称为MEDI0562或MEDI-0562)、11D4(参见美国专利号7,960,515；8,236,930；9,028,824)、18D8(参见例如美国专利号7,960,515；8,236,930；9,028,824)；Hu119-122(参见例如美国专利号9,006,399和9,163,085，以及国际专利公开号WO 2012/027328)；Hu106-222(参见例如美国专利号9,006,399和9,163,085，以及国际专利公开号WO2012/027328)；MEDI6469(也称为9B12；参见例如Weinberg等人(2006)J.Immunother.，29:575-585)；泊加珠单抗(也称为MOXR0916和RG7888；Genentech，Inc.)；GSK3174998(GlaxoSmithKline)，或PF-04518600(PF-8600；Hamid等人(2016)Journal of Clinical Immunology，34:3079)；BMS 986178；或者前述任一种的抗原结合片段。OX40激动剂还包括含有如在他佛利珠单抗(tavolizizumab)、11D4、18D8、Hu119-122、Hu106-22、MED16469、泊加珠单抗、GSK3174998、PF-04518600或BMS 986178中所含的六个CDR的任何结合分子，如任何抗体或抗原结合片段。

[0511] 在一些实施方案中，OX40激动剂是以下任何专利中所述的OX40激动剂：国际专利申请公开号WO 95/12673、WO 95/21925、WO 2006/121810、WO 2012/027328、WO 2013/028231、WO 2013/038191和WO 2014/148895；欧洲专利申请EP 0672141；美国专利申请公开号US 2010/136030、US 2014/377284、US 2015/190506和US 2015/132288(包括克隆20E5和

12H3)；以及美国专利号7,504,101、7,550,140、7,622,444、7,696,175、7,960,515、7,961,515、8,133,983、9,006,399和9,163,085。OX40激动剂还可以包括市售抗体，如L106BD(Pharmingen Product#340420)；ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目录号20073)；或者可从InVivoMAb(BioXcell Inc，新罕布什尔州西黎巴嫩)购得的抗mCD134/mOX40(克隆OX86)。

[0512] 可以根据所提供的任何实施方案使用的其他OX40激动剂包括核苷酸、表达载体和肽，如例如Linch等人(2015)Front Oncol.5:34，美国专利号6,312,700和美国申请公开号20140271677中所披露。

[0513] 在一些实施方案中，共刺激激动剂是4-1BB(CD137)激动剂。在一些实施方案中，4-1BB激动剂可以是能够与人或哺乳动物4-1BB结合的抗体或抗原结合片段或融合蛋白。在一些实施方案中，4-1BB激动剂结合至人4-1BB，如在T细胞表面上表达的人4-1BB。4-1BB(CD137，肿瘤坏死因子受体超家族9)是一种在经激活的T细胞和自然杀伤(NK)细胞上表达的诱导型共刺激受体。T细胞上的4-1BB连接触发信号传导级联，从而导致抗细胞凋亡分子的上调、细胞因子分泌和增强的效应子功能。在具有降低的细胞毒性能力的功能失调的T细胞中，4-1BB连接展示出恢复效应子功能的有效能力。在NK细胞上，4-1BB信号传导可以增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。已经开发出靶向4-1BB的激动性单克隆抗体以利用4-1BB信号传导用于癌症免疫疗法。多种经诱导的和自发的肿瘤模型中的临床前结果表明，用激动剂抗体靶向4-1BB可以导致肿瘤清除和持久的抗肿瘤免疫。

[0514] 在一些实施方案中，4-1BB激动剂以足以降低毒性的方式与4-1BB特异性结合。在一些实施方案中，4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中，4-1BB激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中，4-1BB激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性4-1BB单克隆抗体或融合蛋白。

[0515] 在一些实施方案中，4-1BB激动剂是融合蛋白。4-1BB融合蛋白包括包含与4-1BBL融合的Fc结构域的那些融合蛋白。在一些实施方案中，融合蛋白是包含用于结合与Fc融合的4-1BB的两个或更多个(如三个、四个或更多个)4-1BBL结构域的二聚(二价)、三聚(三价)或六聚(六价)或更大融合物。

[0516] 在一个实施方案中，4-1BB激动剂是国际专利申请公开号WO 2008/025516 A1、WO 2009/007120 A1、WO 2010/003766 A1、WO 2010/010051 A1和WO 2010/078966 A1；美国专利申请公开号US 2011/0027218 A1、US 2015/0126709 A1、US 2011/0111494 A1、US 2015/0110734 A1和US 2015/0126710 A1；以及美国专利号9,359,420、9,340,599、8,921,519和8,450,460中描述的4-1BB激动性融合蛋白。

[0517] 在一些实施方案中，4-1BB激动剂是特异性结合4-1BB的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中，4-1BB激动剂是EU-101(Eutilex Co.Ltd.)、乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗或其抗原结合片段。在一些实施方案中，4-1BB激动剂是乌托鲁单抗(也称为PF-05082566、PF-2566或MOR-7480)。乌托鲁单抗及其变体和片段的制备和特性描述于美国专利号8,821,867；8,337,850；和9,468,678，以及国际专利申请公开号WO 2012/032433A1中。在一些实施方案中，4-1BB激动剂是乌瑞鲁单抗(也称为BMS-663513或20H4,9.h4a)。乌瑞鲁单抗及其变体和片段的制备和特性描述于美国专利号7,288,638和8,962,804中。OX40激动剂还包括含

有如在乌托鲁单抗或乌瑞鲁单抗中所含的六个CDR的任何结合分子,如任何抗体或抗原结合片段。

[0518] 在一个实施方案中,4-1BB激动剂选自1D8,3Elor,4B4(BioLegend 309809),H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532),BBK2(Thermo Fisher MS621PABX),145501(Leinco Technologies B591),由保藏为ATCC编号HB-11248的细胞系产生并在美国专利号6,974,863中披露的抗体,5F4(BioLegend 31 1503),C65-485(BD Pharmingen 559446),在美国专利申请公开号US 2005/0095244中披露的抗体,在美国专利号7,288,638中披露的抗体(如20H4.9-IgG1(BMS-663031)),在美国专利号6,887,673中披露的抗体(如4E9或BMS-554271),在美国专利号7,214,493中披露的抗体,在美国专利号6,303,121中披露的抗体,在美国专利号6,569,997中披露的抗体,在美国专利号6,905,685中披露的抗体(如4E9或BMS-554271),在美国专利号6,362,325中披露的抗体(如1D8或BMS-469492;3H3或BMS-469497;或者3E1),在美国专利号6,974,863中披露的抗体(如53A2);在美国专利号6,210,669中披露的抗体(如1D8、3B8或3E1),在美国专利号5,928,893中描述的抗体,在美国专利号6,303,121中披露的抗体,在美国专利号6,569,997中披露的抗体,在国际专利申请公开号WO 2012/177788、WO 2015/119923和WO 2010/042433中披露的抗体,及其片段、衍生物、缀合物、变体或生物仿制药。

[0519] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是CD27激动剂。在一些实施方案中,CD27激动剂以足以降低毒性的方式与CD27特异性结合。在一些实施方案中,CD27激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性CD27单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,CD27激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性CD27单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,CD27激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性CD27单克隆抗体或融合蛋白。

[0520] 在一些实施方案中,CD27激动剂是特异性结合CD27的抗体或抗原结合片段。在一个特定实施方案中,CD27激动剂是单克隆抗体伐立鲁单抗(也称为CDX-1127或IFS),是其抗原结合片段。伐立鲁单抗的制备和特性描述于国际专利申请公开号WO 2016/145085 A2以及美国专利申请公开号US 2011/0274685 A1和US 2012/0213771 A1中。

[0521] 在一些实施方案中,CD27激动剂是融合蛋白。CD27融合蛋白包括包含与CD27(CD70)的配体融合的Fc结构域的那些融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白是包含用于结合与Fc融合的CD27的两个或更多个(如三个、四个或更多个)CD70结构域的二聚(二价)、三聚(三价)或六聚(六价)或更大融合物。

[0522] 在一个实施方案中,CD27激动剂是美国专利申请公开号US 2014/0112942 A1、US 2011/0274685 A1或US 2012/0213771 A1,或者国际专利申请公开号WO 2012/004367 A1中描述的CD27激动剂。

[0523] 在一些实施方案中,共刺激激动剂是GITR激动剂。在一些实施方案中,GITR激动剂以足以降低毒性的方式与GITR特异性结合。在一些实施方案中,GITR激动剂是消除抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(例如NK细胞的细胞毒性)的激动性GITR单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,GITR激动剂是消除抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的激动性GITR单克隆抗体或融合蛋白。在一些实施方案中,GITR激动剂是消除补体依赖性细胞毒性(CDC)的激动性GITR单克隆抗体或融合蛋白。

[0524] 在一些实施方案中,GITR激动剂是特异性结合GITR的抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中,GITR激动剂是激动性抗GITR单克隆抗体TRX518(TolerRx,Inc.),也称为6C8和Ch-6C8-Agly。6C8和2F8抗体及其变体的制备、特性和使用描述于美国专利号7,812,135;8,388,967;和9,028,823中。

[0525] 在一些实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体1D7或其抗原结合片段。1D7的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体33C9或其抗原结合片段。33C9的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体33F6,或者是其抗原结合片段。33F6的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体34G4,或者是其抗原结合片段。34G4的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体35B10,或者是其抗原结合片段。35B10的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体41E11,或者是其抗原结合片段。41E11的制备和特性描述于美国专利申请公开号US2015/0064204A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体41GS,或者是其抗原结合片段。41G5的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体42A11,或者是其抗原结合片段。42A11的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体44C1,或者是其抗原结合片段。44C1的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体45A8,或者是其抗原结合片段。45A8的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体46E11,或者是其抗原结合片段。46E11的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体48H12,或者是其抗原结合片段。48H12的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体48H7,或者是其抗原结合片段。48H7的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体49D9,或者是其抗原结合片段。49D9的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体49E2,或者是其抗原结合片段。49E2的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体48A9,或者是其抗原结合片段。48A9的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体5H7,或者是其抗原结合片段。5H7的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体7A10,或者是其抗原结合片段。7A10的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。在一个实施方案中,GITR激动剂是单克隆抗体9H6,或者是其抗原结合片段。9H6的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2015/0064204 A1中。

[0526] 在一个实施方案中,GITR激动剂是美国专利号8,709,424;美国专利申请公开号US 2012/0189639 A1和US 2014/0348841 A1,以及国际专利申请公开号WO 2011/028683A1中描述的激动性抗GITR单克隆抗体(Merck Sharp&Dohme Corp.)。在一个实施方案中,GITR激

动剂是选自以下的激动性抗GITR单克隆抗体:36E5、3D6、61G6、6H6、61F6、1D8、17F10、35D8、49A1、9E5和31H6,及其抗原结合片段。这些抗体的结构、特性和制备描述于美国专利号8,709,424;美国专利申请公开号US 2012/0189639 A1和US2014/0348841A1中。

[0527] 在一个实施方案中,GITR激动剂是国际专利申请公开号WO 2013/039954 A1和WO 2011/028683 A1;美国专利申请公开号US 2013/0108641 A1、US 2012/0189639 A1和US 2014/0348841 A1;以及美国专利号7,812,135;8,388,967;和9,028,823中描述的GITR激动剂。

[0528] 在所提供的任何方法的实施方案中,在扩增方法中T细胞(例如肿瘤反应性T细胞)与共刺激激动剂的比率(细胞比摩尔)是约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比500、约1比1000或约1比10000。

[0529] 在所提供的任何方法的实施方案中,在孵育期间将所述一种或多种共刺激激动剂添加至细胞培养基中。在一些实施方案中,以范围如下的浓度独立地添加所述一种或多种共刺激激动剂中的每一种:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL,如为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL、0.5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL、1μg/mL至为或约100μg/mL、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,以如下浓度添加共刺激激动剂:为或约1μg/mL、为或约5μg/mL、为或约10μg/mL、为或约20μg/mL、为或约30μg/mL、为或约40μg/mL、为或约50μg/mL或者任何前述值之间的任何值。

[0530] 在一些实施方案中,将共刺激激动剂与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中,以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2,并且以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加共刺激激动剂。在一些实施方案中,第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的共刺激激动剂的存在下进行。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的共刺激激动剂的存在下进行。在一些实施方案中,第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的共刺激激动剂的存在下进行。

[0531] 在一些实施方案中，在分离或选择T细胞以供进行用于扩增的培养方法之前，将共刺激激动剂施用至受试者。在此类实施方案中，预期在根据所提供的方法离体分离、选择和/或富集培养细胞之前，使肿瘤反应性T细胞或对如所述的一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞在体内恢复活力。在一些此类实施方案中，通过输注选自以下的剂量将共刺激激动剂施用至受试者：约5mg、约8mg、约10mg、约20mg、约25mg、约50mg、约75mg、100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg、约1800mg、约1900mg和约2000mg，或者任何前述值之间的值。在一些实施方案中，本文公开的共刺激激动剂的有效剂量在如下范围内：约1mg至约500mg、约10mg至约300mg、约20mg至约250mg、约25mg至约200mg、约1mg至约50mg、约5mg至约45mg、约10mg至约40mg、约15mg至约35mg、约20mg至约30mg、约23mg至约28mg、约50mg至约150mg、约60mg至约140mg、约70mg至约130mg、约80mg至约120mg、约90mg至约110mg、或约95mg至约105mg、约98mg至约102mg、约150mg至约250mg、约160mg至约240mg、约170mg至约230mg、约180mg至约220mg、约190mg至约210mg、约195mg至约205mg或约198至约207mg。

[0532] 在一个实施方案中，每周施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，每两周施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，每三周施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，每月施用共刺激激动剂。在一个实施方案中，以每三周给予8mg的剂量静脉内施用共刺激激动剂，在12周的时间内施用4次剂量。在一个实施方案中，以较低的初始剂量施用共刺激激动剂，所述初始剂量在以每个月施用的后续间隔施用时逐步升高。例如，第一次输注可以递送300mg共刺激激动剂，并且后续每周剂量可以递送2,000mg共刺激激动剂持续八周，之后是2,000mg每月剂量的共刺激激动剂。

D.免疫检查点抑制剂

[0533] 在一些实施方案中，T细胞调节剂是抑制免疫检查点途径的免疫检查点抑制剂。免疫系统具有参与维持自身耐受性和用于调节免疫反应的多种抑制途径。已知肿瘤可以使用某些免疫检查点途径作为免疫抗性的主要机制，特别是针对对于肿瘤抗原具有特异性的T细胞(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。因为许多此类免疫检查点是通过配体-受体相互作用而启动的，所以它们可以容易地被针对配体和/或其受体的抗体阻断。

[0534] 因此，用阻断免疫检查点途径的拮抗性分子(如小分子、核酸抑制剂(例如，RNAi)或抗体分子)的疗法正在成为针对癌症和其他疾病的免疫疗法的有前途的途径。

[0535] 如本文所用，术语“免疫检查点抑制剂”是指完全或部分降低、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。检查点蛋白调节T细胞激活或功能。这些蛋白质负责T细胞反应的共刺激或抑制相互作用。免疫检查点蛋白调节并维持自身耐受性以及生理免疫反应的持续时间和幅度。

[0536] 免疫检查点抑制剂包括以统计学上显著的方式阻断或抑制免疫系统的抑制途径的任何药剂。此类抑制剂可以包括小分子抑制剂或者可以包括结合至并阻断或抑制免疫检查点受体配体的抗体或其抗原结合片段。可以被靶向以供阻断或抑制的说明性免疫检查点分子包括但不限于PD1(CD279)、PDL1(CD274、B7-H1)、PDL2(CD273、B7-DC)、CTLA-4、LAG3(CD223)、TIM3、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、GITR(TNFRSF18、AITR)、CD40、OX40(CD134、

TNFRSF4)、CXCR2、肿瘤相关抗原(TAA)、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4(属于CD2分子家族并且在所有NK、γδ和记忆CD8+(αβ)T细胞上表达)、CD160(也称为BY55)和CGEN-15049。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗体。免疫检查点抑制剂包括与以下中的一种或多种结合并阻断或抑制其活性的抗体或其抗原结合片段或其他结合蛋白:PD1、PDL1、PDL2、CTLA-4、LAG3、TIM3、4-1BB、4-1BBL、GITR、CD40、OX40、CXCR2、TAA、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160和CGEN-15049。说明性免疫检查点抑制剂包括伊匹单抗(抗CTLA4)、派姆单抗(抗PD1)、曲美木单抗(CTLA-4阻断抗体)、抗OX40L(例如奥塞芦单抗)和PD-L1单克隆抗体(抗B7-H1;MEDI4736)。

[0537] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制PD1的活性。程序性细胞死亡蛋白1(PD1)是一种在B细胞、NK细胞和T细胞中表达的免疫检查点蛋白(Shinohara等人,1995,Genomics 23:704-6;Blank等人,2007,Cancer Immunol Immunother 56:739-45;Finger等人,1997,Gene 197:177-87;Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1的主要作用是在响应于感染的炎症期间限制外周组织中T细胞的活性,以及限制自身免疫(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。PD1表达在经激活的T细胞中被诱导,并且PD1与其内源配体之一的结合起到通过抑制刺激激酶以及还起作用以抑制TCR“终止信号”来抑制T细胞激活的作用(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer12:252-264)。PD1在调节性T细胞上高度表达,并且可以在配体的存在下增加所述调节性T细胞的增殖(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。抗PD1抗体已经用于治疗黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、前列腺癌、结直肠癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、白血病、淋巴瘤和肾细胞癌(Topalian等人,2012,N Engl J Med 366:2443-54;Lipson等人,2013,Clin Cancer Res 19:462-8;Berger等人,2008,Clin Cancer Res 14:3044-51;Gildener-Leapman等人,2013,Oral Oncol 49:1089-96;Menzies和Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85)。示例性抗PD1抗体包括纳武单抗(BMS的Opdivo©)、派姆单抗(Merck的Keytruda©)、匹地利珠单抗(pidilizumab)(Cure Tech的CT-011)、兰博利珠单抗(lambrolizumab)(Merck的MK-3475)和AMP-224(Merck)。

[0538] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制PD-L1的活性。PD-L1(也称为CD274和B7-H1)和PD-L2(也称为CD273和B7-DC)是PD1的配体,其发现于经激活的T细胞、B细胞、髓系细胞、巨噬细胞和一些类型的肿瘤细胞上。PD1和PD-L1的复合物抑制CD8+T细胞的增殖并减少免疫反应(Topalian等人,2012,N Engl J Med 366:2443-54;Brahmer等人,2012,N Eng J Med 366:2455-65)。抗PD-L1抗体已经用于治疗非小细胞肺癌、黑色素瘤、结直肠癌、肾细胞癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌和血液恶性肿瘤(Brahmer等人,N Eng J Med 366:2455-65;Ott等人,2013,Clin Cancer Res 19:5300-9;Radvanyi等人,2013,Clin Cancer Res 19:5541;Menzies和Long,2013,Ther Adv Med Oncol 5:278-85;Berger等人,2008,Clin Cancer Res 14:13044-51)。示例性抗PD-L1抗体包括MDX-1105(Medarex)、MEDI4736(Medimmune)、MPDL3280A(Genentech)、BMS-935559(Bristol-Myers Squibb)和MSB0010718C。

[0539] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制CTLA-4的活性。细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA-4)(也称为CD152)是一种发挥调节T细胞激活功能的共抑制分子。CTLA-4是仅在T细胞上表达的免疫球蛋白超家族成员。CTLA-4起到抑制T细胞激活的作用并且被报道抑制

辅助T细胞活性并增强调节性T细胞免疫抑制活性(Pardoll,2012,Nature Reviews Cancer 12:252-264)。抗CTLA-4抗体已经用于治疗黑色素瘤、前列腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌的临床试验中(Robert和Ghiringhelli,2009,Oncologist 14:848-61;Ott等人,2013,Clin Cancer Res 19:5300;Weber,2007,Oncologist 12:864-72;Wada等人,2013,JTransl Med 11:89)。示例性抗CTLA-4抗体包括伊匹单抗(Bristol-Myers Squibb)和曲美木单抗(Pfizer)。伊匹单抗已经获得FDA批准用于治疗转移性黑色素瘤(Wada等人,2013,J Transl Med 11:89)。

[0540] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制LAG-3的活性。淋巴细胞激活基因-3(LAG-3)(也称为CD223)是另一种免疫检查点蛋白。LAG-3已经与对淋巴细胞活性的抑制,以及在一些情形中对淋巴细胞无反应性的诱导相关。LAG-3在免疫系统中的多种细胞上表达,所述细胞包括B细胞、NK细胞和树突细胞。LAG-3是MHC II类受体的天然配体,所述MHC II类受体基本上在黑色素瘤浸润T细胞(包括被赋予有效免疫抑制活性的那些T细胞)上表达(Goldberg等人,Curr Top Microbiol Immunol(344)269-278,2011)。示例性抗LAG-3抗体包括BMS-986016,也称为瑞拉利单抗(relatlimab)。IMP321是免疫检查点分子LAG-3的可溶形式,其激活树突细胞,增加抗原呈递。

[0541] 在一些实施方案中,检查点抑制剂抑制TIM-3的活性。T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域-3(TIM-3)(也称为CD366)最初在经激活的Th1细胞上鉴定出,并且已经显示是免疫反应的负调节剂。TIM-3的阻断促进T细胞介导的抗肿瘤免疫,并且在一系列小鼠肿瘤模型中具有抗肿瘤活性。TIM-3阻断与其他免疫治疗剂(如抗PDL1抗体等)的组合在增加抗肿瘤作用方面可以是加和的或协同的。TIM-3表达已经与多种不同的肿瘤类型(包括黑色素瘤、NSCLC和肾癌)相关,并且另外,已经证明肿瘤内TIM-3的表达可与一系列肿瘤类型(包括NSCLC、宫颈癌和胃癌)的不良预后相关联。示例性抗TIM3抗体包括TSR-022和LY3321367。

[0542] 在所提供的任何方法的实施方案中,在孵育期间将所述一种或多种免疫检查点抑制剂添加至细胞培养基中。在一些实施方案中,以范围如下的浓度独立地添加所述一种或多种免疫检查点抑制剂中的每一种:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL,如为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL、0.5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL、1μg/mL至为或约100μg/mL、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,以如下浓度添加免疫检查点抑制剂:为或约1μg/mL、为或约5μg/mL、为或约10μg/mL、为或约20μg/mL、为或约30μg/mL、为或约40μg/mL、为或约50μg/mL或者任何前述值之间的任何值。

[0543] 在一些实施方案中,在用共刺激剂孵育之后或与其同时,还在诱导或介导群体中

的T细胞增殖的条件下使T细胞群与一种或多种T细胞刺激剂(如T细胞刺激细胞因子和/或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如如抗CD3/抗CD28珠))接触。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子包括来自重组IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的一种或多种重组细胞因子,其可以在孵育期间被包括以初始扩增在来自受试者的细胞群中的T细胞。

[0544] 在一些实施方案中,将免疫检查点抑制剂与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中,以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2,并且以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的免疫检查点抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的免疫检查点抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的免疫检查点抑制剂的存在下进行。

[0545] 在一些实施方案中,将免疫检查点抑制剂与重组IL-15一起添加至培养基中。在一些实施方案中,以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加重组IL-15,并且以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的免疫检查点抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.C中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的免疫检查点抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,第二次扩增(例如章节I.E)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.1μg/mL至为或约100μg/mL(例如1μg/mL至50μg/mL,如为或约12.5μg/mL或50μg/mL)的浓度添加的免疫检查点抑制剂的存在下进行。

E.细胞凋亡抑制剂

[0546] 在所提供的任何方法的方面,在细胞中的细胞凋亡或细胞凋亡信号传导途径的一种或多种抑制剂(在下文中,“细胞凋亡抑制剂”)的存在下孵育T细胞群。在所提供的实施方案中,所述方法包括在减少或防止样品中T细胞的细胞凋亡的条件下用细胞凋亡抑制剂离体孵育富集T细胞群的细胞。在特定实施方案中,细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是胱天蛋白酶的抑制剂,所述两者都参与诱导特别是经激活的T细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中,在T细胞疗法的离体制造过程期间包括细胞凋亡抑制剂导致在扩增过程期间目的T细胞的产量改进。在特定方面,此类方法结合肿瘤反应性T细胞的离体制造来使用,所述肿瘤反应性T细胞代表罕见且稀有的内源细胞群。即使在通过所述共培养方法离体

富集此类细胞时，它们仍然可能在扩增细胞的过程期间易于发生细胞凋亡。所提供的方法通过在防止或减少细胞凋亡的同时增加增殖并支持其激活和扩增来恢复此类细胞的活力。

[0547] 在一些实施方案中，在用细胞凋亡抑制剂孵育之后或与其同时，还在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下使T细胞群与一种或多种T细胞刺激剂(如T细胞刺激细胞因子和/或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如如抗CD3/抗CD28珠))接触。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子是来自重组IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21的一种或多种重组细胞因子，其可以在孵育期间被包括以初始扩增在来自受试者的细胞群中的T细胞。在一些此类方面，细胞凋亡抑制剂保护T细胞免于发生细胞凋亡，从而恢复群体中的T细胞增殖和扩增的潜力。

[0548] 在一些方面，指示不存在细胞凋亡的一种或多种表型在通过所提供的方法产生的细胞中减少。细胞凋亡是程序性细胞死亡的过程，所述过程包括导致特征性细胞变化和死亡的一系列定型的形态学和生物化学事件。这些变化包括起泡、细胞皱缩、核碎裂、染色质凝聚、染色体DNA断裂和全面mRNA降解。细胞凋亡是一种充分表征的过程，并且与各个阶段相关的特定分子是本领域熟知的。在细胞凋亡的早期阶段，细胞和线粒体膜的变化变得明显。在细胞的细胞质和细胞核中生物化学变化也很明显。例如，细胞凋亡的早期阶段可以通过某些胱天蛋白酶(例如，2、8、9和10)的激活来指示。细胞凋亡的中期至晚期阶段的特征在于膜完整性的进一步丧失、染色质凝聚和DNA断裂，包括生物化学事件如胱天蛋白酶3、6和7的激活。

[0549] 在某些实施方案中，通过所提供的方法产生的细胞或本文所提供的治疗性T细胞组合物具有降低的对细胞凋亡标记物呈阳性的细胞的百分比或频率。各种细胞凋亡标记物是本领域普通技术人员已知的，并且包括但不限于一种或多种胱天蛋白酶活性的增加(即经激活的胱天蛋白酶)、PARP切割的增加、Bcl-2家族蛋白(细胞死亡途径的成员(例如，Fas和FADD))的激活和/或转位、核皱缩的存在(例如，通过显微镜监测)和染色体DNA断裂的存在(例如，染色体DNA梯的存在)或用包括TUNEL染色和膜联蛋白V染色的细胞凋亡测定。膜联蛋白V是一种以高亲和力优先结合磷脂酰丝氨酸(PS)的蛋白质，所述磷脂酰丝氨酸是一种在细胞凋亡期间从质膜的内小叶易位至外小叶的脂质。在一些实施方案中，通过所提供的方法产生的细胞或本文所提供的治疗性T细胞组合物具有降低的对与细胞凋亡相关的一种或多种因子的表达呈阳性的细胞的百分比或频率，所述因子包括已知启动细胞凋亡的促细胞凋亡因子，例如死亡受体途径的成员、经激活的线粒体(内在)途径的成员(如Bcl-2家族成员，例如Bax、Bad和Bid)以及胱天蛋白酶。在某些实施方案中，通过所提供的方法产生的细胞或本文所提供的治疗性T细胞组合物具有降低的对用指示剂(例如膜联蛋白V分子)染色呈阳性的细胞的百分比或频率，所述指示剂将在与细胞组合物一起孵育或接触时优先与正在经历细胞凋亡的细胞结合。在任何此类实施方案中，此类细胞的降低的频率或百分比与通过类似过程产生的治疗性T细胞组合物相比是降低的，但是其中此个过程不包括用细胞凋亡抑制剂进行孵育。在一些实施方案中，细胞凋亡降低大于或大于约1.5倍、大于或大于约2倍、大于或大于约3倍、大于或大于约5倍、大于或大于约10倍或更多。

[0550] 在特定实施方案中，细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是胱天蛋白酶的抑制剂，所述两者都参与诱导特别是经激活的T细胞的细胞凋亡。在所提供的方法的方面，细胞凋亡抑制剂可以降低或破坏由Fas/Fas配体轴介导的和/或由胱天蛋白酶介导的信号传导。

[0551] 在特定实施方案中，细胞凋亡抑制剂是Fas/Fas配体轴的抑制剂或者是胱天蛋白酶的抑制剂，所述两者都参与诱导特别是经激活的T细胞的细胞凋亡。在一些实施方案中，在用细胞凋亡抑制剂孵育之后或与其同时，还在诱导或介导群体中的T细胞增殖的条件下使T细胞群与一种或多种T细胞刺激剂(如T细胞刺激细胞因子(例如IL-2)和/或抗CD3/抗CD28刺激剂(例如如抗CD3/抗CD28珠))接触。在一些此类方面，细胞凋亡抑制剂保护T细胞免于发生细胞凋亡，从而恢复群体中的T细胞增殖和扩增的潜力。

[0552] 在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂通过破坏Fas/Fas配体轴(CD95/CD95L轴)来抑制细胞凋亡。在一些方面，细胞凋亡抑制剂抑制由CD95诱导或介导的细胞凋亡。Fas配体(FasL或CD95L)是一种属于肿瘤坏死因子(TNF)家族的II类跨膜蛋白。它与其受体的结合诱导细胞凋亡。Fas配体/受体相互作用在免疫系统的调节和癌症的进展中起重要作用。T细胞的激活导致其Fas配体的表达。T细胞最初在克隆扩增期间对Fas介导的细胞凋亡有抗性，但是随着它们被激活的时间延长而变得逐渐更敏感，最终导致激活诱导的细胞死亡(AICD)。在一些方面，此过程在体内是必需的，以防止过度免疫反应并消除自身反应性T细胞。具有Fas或Fas配体的有害突变的人和小鼠出现异常T细胞的积累，导致淋巴结病、脾肿大和红斑狼疮。

[0553] 在所提供的方法的方面，用破坏或阻断Fas与Fas配体之间的相互作用的细胞凋亡抑制剂孵育或接触T细胞群(如含有肿瘤反应性T细胞的群体)，其中此种孵育与通过抗原和/或通过激活或刺激群体中的T细胞的一种或多种T细胞刺激剂激活T细胞同时进行或在所述激活之后进行。在一些实施方案中，T细胞的激活可以上调Fas配体的表达，其中Fas配体可以与也在细胞表面上表达的Fas相互作用，从而接合Fas并引起细胞凋亡。在一些实施方案中，阻断此相互作用的细胞凋亡抑制剂可以是与Fas或Fas配体特异性结合以阻断其相互作用，从而至少部分减少或阻断细胞中的Fas信号传导途径和/或细胞凋亡的结合分子。用于确定和/或评估Fas信号途径活性的方法是本领域技术人员已知的，并且例如描述于Lavrik等人(2012)Cell Death Differ.,19(1):36-41中。

[0554] 根据本公开文本的抑制剂可以在蛋白质水平和/或核酸水平上起作用。在蛋白质水平上起作用的抑制剂可以选自抗体、蛋白质和/或小分子。在核酸水平上起作用的抑制剂是例如反义分子、RNAi分子和/或核酶。抑制剂与Fas(CD95)和/或Fas配体(CD95L)结合。在另一实施方案中，可以抑制Fas/Fas配体相互作用。

[0555] 在一些实施方案中，抑制剂是抗体或其功能片段。在一些方面，作为抗体的抑制剂可以与Fas(CD95)结合。在一些实施方案中，作为抗体的抑制剂可以与CD95L结合。结合CD95L的抗体的例子是Nok-1或其抗原结合片段(参见例如目录号16-9919-81，ThermoFisher Scientific，马萨诸塞州沃尔瑟姆)。

[0556] 在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂是可以与Fas配体特异性结合的可溶性蛋白。在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂是可溶性CD95受体分子，其含有CD95的细胞外部分但不含跨膜结构域。可溶性CD95受体分子描述于EP-A-0595659或EP-A-0965637中。在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂是或包括CD95受体肽，如WO 99/65935中所述。

[0557] 在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂是与Fas配体结合的融合蛋白。在一个特定实施方案中，细胞凋亡抑制剂含有Fas(CD95)的细胞外结构域或其与Fas配体结合的特异性结合蛋白，其中细胞外结构域或特异性结合部分与异源多肽(如Fc免疫球蛋白分子)融合。在

一些实施方案中,可溶性Fas分子是如WO 99/144330或WO 99/50413中描述的任何一种。在一些实施方案中,可溶性Fas分子是称为FLINT或DCR3的分子或其片段。

[0558] 在特定实施方案中,细胞凋亡抑制剂与Fas配体(CD95配体)结合,并且是含有细胞外Fas(CD95)结构域和Fc结构域(特别是人Fc结构域)的融合蛋白。在一个实施方案中,细胞凋亡抑制剂包括Fas的细胞外结构域,如包括示为CD95的氨基酸26-173的成熟CD95的全部或连续的细胞外结构域(参见例如UniProt登录号P25445;美国专利号5,891,434)。在一些实施方案中,CD95是人CD95并且含有具有以下序列(人CD95的氨基酸26-173)的细胞外结构域:

QVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCHKPCPPGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTD KAHFSSKCRRCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSTVCEHCDPCTKCEHGIIKECTLTSNTKCKEEG SRSN(SEQ ID NO:7)

[0559] 在一些实施方案中,Fas(CD95)-Fc融合蛋白包括如WO 2014/013039或WO2014/013037中描述的任何一种。在一些实施方案中,融合蛋白的细胞外Fas(CD95)结构域包含直至人CD95的氨基酸170、171、172或173的氨基酸序列。在特定实施方案中,融合蛋白含有人CD95的氨基酸26-172。在一些实施方案中,Fc结构域或其功能片段包含免疫球蛋白的CH2和/或CH3结构域,以及任选地铰链区结构域的至少一部分或源自其的经修饰的免疫球蛋白结构域。免疫球蛋白结构域可以是IgG、IgM、IgD或IgE免疫球蛋白结构域或源自其的经修饰的免疫球蛋白结构域。在一些实施方案中,Fc结构域是IgG的Fc,其含有恒定IgG免疫球蛋白结构域的至少一部分。IgG免疫球蛋白结构域可以选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4结构域或选自来自其的经修饰的结构域。在一些实施方案中,Fc是人Fc结构域,如IgG Fc结构域,例如人IgG1 Fc结构域。在特定实施方案中,Fas的细胞外结构域或其特异性结合片段与例如来自人IgG1分子的包括铰链区的Fc免疫球蛋白分子融合。包含细胞外CD95结构域和人Fc结构域的融合蛋白描述于WO 95/27735或WO2004/085478中。

[0560] 在一些实施方案中,Fas(CD95)-Fc融合蛋白是APG101(阿舒那西普(asunercept))或者是其功能片段。

[0561] 在一些实施方案中,Fas(CD95)-Fc融合蛋白是CAN008或者是其功能片段。

[0562] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂抑制由胱天蛋白酶诱导或介导的细胞凋亡。胱天蛋白酶是作为细胞功能(包括导致细胞凋亡和炎症的功能)的调节剂起重要作用的相关酶的家族。胱天蛋白酶激活和调节通过多种机制受到密切控制。所有胱天蛋白酶都作为酶促无活性形式(称为胱天蛋白酶原)表达,所述酶促无活性形式可以在多种细胞损伤或刺激后被激活。上述七种胱天蛋白酶明确参与细胞凋亡过程。

[0563] 经由胱天蛋白酶激活的细胞凋亡可以以多种重叠方式启动,包括经由线粒体途径、经由死亡受体途径(即,Fas/FasL、TNF/TNF受体)、经由内质网应激途径以及经由诱导细胞凋亡的蛋白酶颗粒酶B。

[0564] 在特定实施方案中,作为胱天蛋白酶抑制剂的细胞凋亡抑制剂导致群体细胞中胱天蛋白酶的激活降低。在某些实施方案中,可以通过普通技术人员已知的方法来检测胱天蛋白酶激活。在一些实施方案中,与经激活的胱天蛋白酶特异性结合(即,与经切割的多肽特异性结合)的抗体可以用于检测胱天蛋白酶激活。在另一个例子中,胱天蛋白酶活性的荧光染料抑制剂(FLICA)测定可以用于通过检测胱天蛋白酶-3对乙酰基Asp-Glu-Val-Asp 7-

酰胺基-4-甲基香豆素(Ac-DEVD-AMC)的水解(即检测发荧光的7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)的释放)来检测胱天蛋白酶-3激活。FLICA测定可以用于通过检测通过多种胱天蛋白酶处理的底物的产物来确定胱天蛋白酶激活(例如,FAM-VAD-FMK FLICA)。其他技术包括使用发光的胱天蛋白酶-8四肽底物(Z-LETD-氨基萤光素)、胱天蛋白酶-9四肽底物(Z-LEHD-氨基萤光素)、胱天蛋白酶-3/7底物(Z-DEVD-氨基萤光素)、胱天蛋白酶-6底物(Z-VEID-氨基萤光素)或胱天蛋白酶-2底物(Z-VDVAD-氨基萤光素)的CASPASE-GLO®胱天蛋白酶测定(PROMEGA)。

[0565] 细胞凋亡抑制剂的例子包括泛胱天蛋白酶抑制剂和胱天蛋白酶特异性抑制剂两者。细胞凋亡抑制剂的例子包括胱天蛋白酶抑制剂,如恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390)、NAIP(神经元凋亡抑制蛋白;BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2;分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP;BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon;BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP;BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK及其中的任何氟甲基酮变体(即,Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK、Z-VDVAD-FMK等)。在一些实施方案中,胱天蛋白酶抑制剂是胱天蛋白酶特异性抑制剂。在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是泛胱天蛋白酶抑制剂。

[0566] 在特定实施方案中,胱天蛋白酶抑制剂是XIAP。在一些方面,XIAP能够终止通过胱天蛋白酶过量产生诱导的细胞凋亡性细胞死亡,如经由其结合至并抑制胱天蛋白酶3、7和9的能力。XIAP的BIR2结构域抑制胱天蛋白酶3和7,而BIR3结合至并抑制胱天蛋白酶9。

[0567] 在特定实施方案中,胱天蛋白酶抑制剂是Z-VAD-FMK(苄氧羰基-缬氨酰-丙氨酰-天冬氨酰-[O-甲基]-氟甲基酮)。在一些方面,Z-VAD-FMK能够终止通过胱天蛋白酶诱导的细胞凋亡性细胞死亡,如经由其结合几种胱天蛋白酶的活性位点的能力。

[0568] 在所提供的任何方法的实施方案中,在扩增方法中T细胞(例如肿瘤反应性T细胞)与细胞凋亡抑制剂的比率(细胞比摩尔)是约1比25、约1比50、约1比100、约1比125、约1比150、约1比175、约1比200、约1比225、约1比250、约1比275、约1比300、约1比325、约1比350、约1比500、约1比1000或约1比10000。

[0569] 在所提供的任何方法的实施方案中,在孵育期间将一种或多种细胞凋亡抑制剂添加至细胞培养基。在一些实施方案中,以范围如下的浓度独立地添加所述一种或多种细胞凋亡抑制剂中的每一种:在为或约0.1μg/mL至为或约100μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约0.5μg/mL、0.5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL、为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL、1μg/mL至为或约100μg/mL、为或约1μg/mL与为或约50μg/mL、为或约1μg/mL与为或约25μg/mL、为或约1μg/mL与为或约10μg/mL、为或约1μg/mL与为或约5μg/mL、为或约5μg/mL至为或约100μg/mL、为或约5μg/mL与为或约50μg/mL、为或约5μg/mL与为或约25μg/mL、为或约5μg/mL与为或约10μg/mL、为或约10μg/mL至为或约100μg/mL、为或约10μg/mL与为或约50μg/mL、为或约10μg/mL与为或约25μg/mL、为或约25μg/mL至为或约100μg/mL、为或约25μg/mL与为或约50μg/mL或者为或约50μg/mL与为或约100μg/mL之间,每个都包含端值。

[0570] 在一些实施方案中，以范围在0.5μM与100μM之间的浓度，如如下浓度独立地添加所述一种或多种细胞凋亡抑制剂中的每一种：在为或约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间，每个都包含端值。

[0571] 在一些实施方案中，将细胞凋亡抑制剂与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加细胞凋亡抑制剂。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

[0572] 在一些实施方案中，细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK。在一些实施方案中，将Z-VAD-FMK与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加Z-VAD-FMK。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的Z-VAD-FMK的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的Z-VAD-FMK的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的Z-VAD-FMK的存在下进行。

[0573] 在一些实施方案中，将细胞凋亡抑制剂与重组IL-15一起添加至培养基中。在一些实施方案中，以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加细胞凋亡抑制剂。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM，如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以

0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中,第二次扩增(例如章节I.E)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

[0574] 在一些实施方案中,细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK。在一些实施方案中,将Z-VAD-FMK与重组IL-15一起添加至培养基中。在一些实施方案中,以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加重组IL-15,并且以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加Z-VAD-FMK。在一些实施方案中,第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的Z-VAD-FMK的存在下进行。在一些实施方案中,共培养(例如章节I.C中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的Z-VAD-FMK的存在下进行。在一些实施方案中,第二次扩增(例如章节I.E)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约180IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以0.5μM至100μM(例如1μM至50μM,如为或约12.5μM或50μM)的浓度添加的Z-VAD-FMK的存在下进行。

[0575] 在特定实施方案中,T细胞调节剂是热休克蛋白的抑制剂。热休克蛋白(Hsp)是一组多样化的蛋白质,其包括可以由细胞响应于应激产生的分子伴侣。应激源可以包括但不限于热、氧化应激、感染、缺血、暴露于重金属以及营养缺乏。一些Hsp具有可证明的抗细胞凋亡作用,例如Hsp70被描述为经由抑制Bax蛋白的线粒体易位来减弱细胞凋亡。其他Hsp参与可以促进细胞凋亡反应的信号传导级联,如Hsp10参与激活胱天蛋白酶原3(Ikwegbue等人,Pharmaceuticals 11(1):2,2018)。

[0576] 在某些实施方案中,Hsp抑制剂是Hsp90的抑制剂。Hsp90是一种ATP依赖性伴侣蛋白,其消极地抑制Hsp70,但是Hsp90和Hsp70合作防止蛋白质响应于应激经由热休克因子1而发生危险的聚集。已经观察到Hsp90的过表达导致蛋白质稳定、细胞增殖、血管生成以及增加的癌细胞存活。还已经证明Hsp90稳定参与致癌信号传导途径的几种受体,包括EGFR(Chatterjee等人,Int J Mol Sci(18)9,2017)。出于这些原因等,已经在癌症的临床前模型以及多项I期和II期研究中评价作为单一药剂以及与其他药剂组合的Hsp90抑制剂(Spreafico等人,Brit J of Cancer(112)650-659,2015)。

[0577] hsp抑制剂的例子包括但不限于MKT-077、二氢嘧啶(即,SW02、MAL2-IIB、MAL3-101、NSC630668等)、类黄酮(即,表没食子儿茶素、杨梅黄酮等)、15-DSG、Apoptozole、VER-155008、适配体A17、适配体A8、cmHSP70.1。hsp90抑制剂的例子包括但不限于17-AAg、17-DMAG、IPI-504、NVP-AUY922、AT13387、Ganetespib、KW-2478、CNF-2024(BIIB021)、Debio 0932、PU-H71、MPC-310、SNX-5422、Ds-2248、XL-888、TAS-116和NVP-HSP990。

[0578] 在特定实施方案中,hsp抑制剂是NVP-HSP990。

[0579] 在一些实施方案中,以范围在1nM与为或约500nM之间的浓度,如如下浓度独立地添加所述一种或多种hsp抑制剂中的每一种:在为或约1nM与为或约250nM之间、在为或约1nM与为或约100nM之间、在为或约1nM与为或约50nM之间、在为或约1nM与为或约25nM之间、在为或约1nM与为或约10nM之间、在为或约1nM与为或约5nM之间、在为或约5nM与为或约500nM之间、在5nM与为或约250nM之间、在为或约5nM与为或约100nM之间、在为或约5nM与为

或约50nM之间、在为或约5nM与为或约25nM之间、在为或约5nM与为或约10nM之间、在为或约10nM与为或约500nM之间、在10nM与为或约250nM之间、在为或约10nM与为或约100nM之间、在为或约10nM与为或约50nM之间、在为或约10nM与为或约25nM之间、在为或约25nM与为或约500nM之间、在25nM与为或约250nM之间、在为或约25nM与为或约100nM之间、在为或约25nM与为或约50nM之间、在为或约50nM与为或约500nM之间、在50nM与为或约250nM之间、在为或约50nM与为或约100nM之间、在为或约100nM与为或约500nM之间、在100nM与为或约250nM之间或者在为或约250nM与为或约500nM之间，每个都包含端值。

[0580] 在一些实施方案中，以范围在500nM与为或约1000nM之间的浓度独立地添加hsp抑制剂。在一些实施方案中，以如下浓度添加hsp抑制剂：为或约500nM、为或约600nM、为或约700nM、为或约800nM、为或约900nM或者为或约1000nM。

[0581] 在一些实施方案中，将hsp抑制剂与重组IL-2一起添加至培养基中。在一些实施方案中，以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加重组IL-2，并且以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加hsp抑制剂。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加的hsp抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加的hsp抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以200IU/mL至1000IU/mL(例如为或约300IU/mL)的浓度添加的重组IL-2和以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加的hsp抑制剂的存在下进行。

[0582] 在一些实施方案中，将hsp抑制剂与重组IL-15一起添加至培养基中。在一些实施方案中，以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加重组IL-15，并且以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加hsp抑制剂。在一些实施方案中，第一次扩增(例如章节I.B中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加的hsp抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，共培养(例如章节I.C中所述)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加的hsp抑制剂的存在下进行。在一些实施方案中，第二次扩增(例如章节I.E)在以10IU/mL至500IU/mL(例如为或约1800IU/mL)的浓度添加的重组IL-15和以1nM至1000nM(例如为或约1000nM)的浓度添加的hsp抑制剂的存在下进行。

III.组合物和药物配制品

[0583] 本文提供了含有如通过所提供的任何方法产生的经扩增的T细胞的组合物。在一些实施方案中，组合物含有肿瘤反应性T细胞或含有对肿瘤相关抗原(例如新抗原)具有特异性的内源TCR的T细胞。特别地，所提供的组合物包括富集肿瘤反应性T细胞或含有对肿瘤相关抗原(例如新抗原)具有特异性的内源TCR的T细胞的细胞组合物。

[0584] 在一些实施方案中，组合物包含约5％-99％肿瘤反应性T细胞或对所述一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞，或者在5％与99％之间(包含端值)的任何百分比的此类细胞。在一些实施方案中，与分离出细胞的受试者或生物样品中天然存在的肿瘤反应性CD3+T细胞或对所述一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞相对于总

CD3+T细胞或总细胞的百分比相比，组合物可以包括增加的或更高的在组合物中此类肿瘤反应性CD3+T细胞或对所述一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞相对于总CD3+T细胞或总细胞的百分比。在一些实施方案中，百分比增加至少或至少约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、150倍、200倍或更多。在此类实施方案中，所述一种或多种T细胞激活标记物可以是如所述的任何一种，如CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和/或CD38中的任何一种或多种。

[0585] 在一些实施方案中，组合物可以包括至少或至少约20％、至少或至少约30％、至少或至少约40％、至少或至少约50％、至少或至少约60％、至少或至少约65％、至少或至少约70％、至少或至少约75％、至少或至少约80％、至少或至少约81％、至少或至少约82％、至少或至少约83％、至少或至少约84％、至少或至少约85％、至少或至少约86％、至少或至少约87％、至少或至少约88％、至少或至少约89％、至少或至少约90％、至少或至少约91％、至少或至少约92％、至少或至少约93％、至少或至少约94％、至少或至少约95％、至少或至少约96％、至少或至少约97％、至少或至少约98％、至少或至少约99％或基本上100％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过30％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过40％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过50％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过60％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过70％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过80％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含超过90％的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在此类实施方案中，所述一种或多种T细胞激活标记物可以是如所述的任何一种，如CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和/或CD38中的任何一种或多种。

[0586] 在一些实施方案中，肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞可以以治疗有效量存在于组合物中。细胞的有效量可以根据患者以及疾病的类型、严重程度和范围而变化。因此，医师可以在考虑受试者的健康、疾病的范围和严重程度以及其他变量后确定有效量。

[0587] 在某些实施方案中，组合物中此类细胞的数量是治疗有效量。在一些实施方案中，所述量是降低动物中与癌症、病毒感染、微生物感染或脓毒性休克相关的严重程度、持续时间和/或症状的量。在一些实施方案中，治疗有效量是细胞的如下剂量，所述剂量导致相对于未施用本文所述的组合物的患者(或动物)或一组患者(或动物)中癌症的生长或扩散，施用所述组合物的患者或动物中癌症的生长或扩散减少至少2.5％、至少5％、至少10％、至少15％、至少25％、至少35％、至少45％、至少50％、至少75％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％。在一些实施方案中，治疗有效量是导致细胞毒性活性从而导致抑制或减少癌症、病毒和微生物细胞生长的活性的量。

[0588] 在一些实施方案中，组合物包含如下量的肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞：为或约10^5个至为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或

对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^5个至为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^6个至为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^8个至为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^9个至为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，组合物包含大于或大于为或约10^5个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^6个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^7个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^9个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞或者为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，可以将此种量施用至患有疾病或病症的受试者，如施用至癌症患者。在此类实施方案中，所述一种或多种T细胞激活标记物可以是如所述的任何一种，如CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和/或CD38中的任何一种或多种。

[0589] 在一些实施方案中，组合物以占群体中总细胞的如下百分比包含CD3+T细胞：大于或大于约60％、大于或大于约70％、大于或大于约80％、大于或大于约90％或者大于或大于约95％。在一些实施方案中，组合物以占群体中总细胞的如下百分比含有CD4+T细胞和CD8+T细胞：大于或大于约60％、大于或大于约70％、大于或大于约80％、大于或大于约90％或者大于或大于约95％。在特定实施方案中，组合物含有如下比率的CD8+T细胞与CD4+T细胞：在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

[0590] 在一些实施方案中，组合物的体积是至少或至少约10mL、50mL、100mL、200mL、300mL、400mL或500mL，如从或从约10mL至500mL、10mL至200mL、10mL至100mL、10mL至50mL、50mL至500mL、50mL至200mL、50mL至100mL、100mL至500mL、100mL至200mL或200mL至500mL，每个都包含端值。在一些实施方案中，组合物的细胞密度是至少或至少约$1x10^5$个细胞/mL、$5x10^5$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL、$5x10^6$个细胞/mL、$1x10^7$个细胞/mL、$5x10^7$个细胞/mL或$1x10^8$个细胞/mL。在一些实施方案中，组合物的细胞密度在或在约$1x10^5$个细胞/mL至$1x10^8$个细胞/mL、$1x10^5$个细胞/mL至$1x10^7$个细胞/mL、$1x10^5$个细胞/mL至$1x10^6$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL至$1x10^7$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL至$1x10^8$个细胞/mL、$1x10^6$个细胞/mL至$1x10^7$个细胞/mL或$1x10^7$个细胞/mL至$1x10^8$个细胞/mL之间，每个都包含端值。

[0591] 组合物包括用于施用(如用于过继细胞疗法)的药物组合物和配制品。在一些实施方案中，用药学上可接受的载体配制工程化细胞。

[0592] 药学上可接受的载体可以包括与药物施用相容的所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等(Gennaro,2000,Remington:The science and practice of pharmacy,Lippincott,Williams&Wilkins,宾夕法尼亚州费城)。此类载体或

稀释剂的例子包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和5％人血清白蛋白。还可以使用脂质体和非水性媒介物，如不挥发性油。还可以将补充性活性化合物掺入组合物中。药学载体应当是适合于NK细胞的载体，如盐水溶液、右旋糖溶液或包含人血清白蛋白的溶液。

[0593] 在一些实施方案中，用于此类组合物的药学上可接受的载体或媒介物是任何无毒的水溶液，在其中NK细胞可以在足以允许施用活NK细胞的时间内维持或保持存活。例如，药学上可接受的载体或媒介物可以是盐水溶液或缓冲盐水溶液。药学上可接受的载体或媒介物还可以包括可以增加NK细胞的效率的各种生物材料。细胞媒介物和载体可以例如包括多糖如甲基纤维素(M.C.Tate,D.A.Shear,S.W.Hoffman,D.G.Stein,M.C.LaPlaca,Biomaterials 22,1113,2001，将其通过引用以其整体并入本文)、壳聚糖(Suh JK F,Matthew H W T.Biomaterials,21,2589,2000;Lahiji A,Sohrabi A,Hungerford D S等人,J Biomed Mater Res,51,586,2000，将其中的每一个通过引用以其整体并入本文)、N-异丙基丙烯酰胺共聚物P(NIPAM-共-AA)(Y.H.Bae,B.Vernon,C.K.Han,S.W.Kim,J.Control.Release 53,249,1998;H.Gappa,M.Baudys,J.J.Koh,S.W.Kim,Y.H.Bae,Tissue Eng.7,35,2001，将其中的每一个通过引用以其整体并入本文)以及聚(氧乙烯)/聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(B.Jeong,K.M.Lee,A.Gutowska,Y.H.An,Biomacromolecules 3,865,2002，将其通过引用以其整体并入本文)、P(PF-共-EG)(Suggs L J,Mikos A G.Cell Trans,8,345,1999，将其通过引用以其整体并入本文)、PEO/PEG(Mann B K,Gobin A S,Tsai A T,Schmedlen R H,West J L.,Biomaterials,22,3045,2001;Bryant S J,Anseth K S.Biomaterials,22,619,2001，将其中的每一个通过引用以其整体并入本文)、PVA(Chih-Ta Lee,Po-Han Kung和Yu-Der Lee,Carbohydrate Polymers,61,348,2005，将其通过引用以其整体并入本文)、胶原(Lee C R,Grodzinsky A J,Spector M.,Biomaterials 22,3145,2001，将其通过引用以其整体并入本文)、海藻酸盐(Bouhadir K H,Lee K Y,Alsberg E,Damm K L,Anderson K W,Mooney D J.Biotech Prog 17,945,2001;Smidsrd O,Skjak-Braek G.,Trends Biotech,8,71,1990，将其中的每一个通过引用以其整体并入本文)。

[0594] 在一些实施方案中，组合物(包括药物组合物)是无菌的。在一些实施方案中，细胞的分离或富集在封闭或无菌环境中进行，例如以使误差、用户操作和/或污染最小化。在一些实施方案中，可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌性。

[0595] 本文还提供了适合于冷冻保存所提供的T细胞的组合物，所述T细胞包括肿瘤反应性T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞。在一些实施方案中，组合物包含冷冻保护剂。在一些实施方案中，冷冻保护剂是或包括DMSO和/或甘油。在一些实施方案中，可以将配制用于冷冻保存的组合物储存在低温(如超低温)下，例如储存温度的范围为-40℃至-150℃，如为或约80℃±6.0℃。

[0596] 在一些实施方案中，用含有1.0％至30％DMSO溶液(如5％至20％DMSO溶液或5％至10％DMSO溶液)的冷冻保存溶液配制细胞。在一些实施方案中，冷冻保存溶液是或包含例如含有20％DMSO和8％人血清白蛋白(HSA)的PBS，或其他合适的细胞冷冻培养基。在一些实施方案中，冷冻保存溶液是或含有例如至少或约7.5％DMSO。在一些实施方案中，将细胞冷冻(例如，冷冻保存或冷冻保护)在具有终浓度为或为约12.5％、12.0％、11.5％、11.0％、10.5％、10.0％、9.5％、9.0％、8.5％、8.0％、7.5％、7.0％、6.5％、6.0％、5.5％或5.0％的DMSO，或在1％与15％之间、在6％与12％之间、在5％与10％之间或在6％与8％之间的DMSO

的培养基和/或溶液中。在特定实施方案中，将细胞冷冻(例如，冷冻保存或冷冻保护)在具有终浓度为或为约5.0％、4.5％、4.0％、3.5％、3.0％、2.5％、2.0％、1.5％、1.25％、1.0％、0.75％、0.5％或0.25％的HSA，或在0.1％与5％之间、在0.25％与4％之间、在0.5％与2％之间或在1％与2％之间的HSA的培养基和/或溶液中。

[0597] 在一些实施方案中，将经冷冻保存的细胞通过解冻准备用于施用。在一些情形中，可以在解冻后立即将细胞施用至受试者。在此个实施方案中，组合物无需任何进一步处理即随时可用。在其他情形中，将细胞在解冻后进一步处理，如通过用药学上可接受的载体重悬，用激活剂或刺激剂进行孵育，或者在施用至受试者之前激活、洗涤并重悬于药学上可接受的缓冲液中。

IV.治疗方法和治疗应用

[0598] 本文提供了与本文所述的所提供的治疗性细胞组合物相关的组合物和方法，用于在治疗受试者的疾病或病症(如癌症)中使用。此类方法和用途包括例如涉及将治疗性细胞或含有所述治疗性细胞的组合物施用至患有疾病、病症或障碍的受试者的治疗方法和用途。在一些情形中，疾病或障碍是肿瘤或癌症。在一些实施方案中，以有效量施用细胞或其药物组合物以实现对疾病或障碍的治疗。用途包括细胞或其药物组合物在此类方法和治疗中，以及在用于进行此类治疗方法的药物的制备中的用途。在一些实施方案中，所述方法由此治疗受试者的疾病或病症或障碍。

[0599] 在一些实施方案中，治疗方法包括施用有效量的含有肿瘤反应性CD3+T细胞或可以包括对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞的CD3+T细胞的组合物。此类组合物可以包括如本文所述的任何一种，包括通过所提供的方法产生的组合物。

[0600] 在一些实施方案中，向受试者(例如自体)施用为或约10^5个至为或约10^{12}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^5个至为或约10^8个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^6个至为或约10^{12}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^8个至为或约10^{11}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、或者为或约10^9个至为或约10^{10}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞。在一些实施方案中，用于施用的治疗有效量包含大于或大于为或约10^5个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、为或约10^6个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、为或约10^7个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、为或约10^8个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、为或约10^9个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、为或约10^{10}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞、为或约10^{11}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞或者为或约10^{12}个通过所提供的任何方法产生的CD3+T细胞。在一些实施方案中，可以将此种量施用至患有疾病或病症的受试者，如施用至癌症患者。在一些实施方案中，所施用数量的T细胞是活T细胞。

[0601] 在一些实施方案中，治疗方法包括施用有效量的含有肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞的组合物。此类组合物可以包括如本文所述的任何一种，包括通过所提供的方法产生的组合物。在一些实施方案中，将为或约10^5个至为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物(如如所述的任何一种)呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^5个至为或约10^8个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^6个至为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^8个至为或

约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、或者为或约10^{9}个至为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞施用至个体。在一些实施方案中，用于施用的治疗有效量包含大于或大于为或约10^{5}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{6}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{7}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{8}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{9}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{10}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞、为或约10^{11}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞或者为或约10^{12}个肿瘤反应性CD3+T细胞或对一种或多种激活标记物呈表面阳性的CD3+T细胞。在一些实施方案中，可以将此种量施用至患有疾病或病症的受试者，如施用至癌症患者。在一些实施方案中，所施用数量的T细胞是活T细胞。在此类实施方案中，所述一种或多种T细胞激活标记物可以是如所述的任何一种，如CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和/或CD38中的任何一种或多种。

[0602] 在一些实施方案中，所述量是作为平剂量来施用。在其他实施方案中，所述量是按每公斤受试者体重来施用。

[0603] 在一些实施方案中，在根据所提供的方法扩增后不久，将如通过所提供的任何方法产生的或含有肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的组合物施用至个体。在其他实施方案中，在如通过上述方法施用前冷冻保存经扩增的T细胞，如经扩增的肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。例如，T细胞(如肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞)可以在施用至个体之前储存超过6、12、18或24个月。此类经冷冻保存的细胞可以在施用前解冻。

[0604] 在一些实施方案中，可以通过任何便捷的途径将如通过所提供的任何方法提供的或含有肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的所提供的组合物施用至受试者，所述途径包括肠胃外途径，如皮下、肌内、静脉内和/或硬膜外施用途径。

[0605] 在一些实施方案中，可以以单剂量施用如通过所提供的任何方法提供的或含有肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的组合物。此种施用可以通过注射，例如静脉内注射。在一些实施方案中，可以以多剂量施用肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。给药可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或超过六次。给药可以是一个月一次、每两周一次、一周一次或每隔一天一次。只要需要，此类组合物和细胞的施用便可以继续。

[0606] 在一些实施方案中，在施用所述剂量的来自如通过所提供的任何方法产生的或含有肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的所提供的组合物的细胞之前，向受试者施用淋巴细胞清除疗法。淋巴细胞清除疗法可以包括施用氟达拉滨和/或环磷酰胺(其活性形式称为马磷酰胺)及其组合。此类方法描述于Gassner等人Cancer Immunol Immunother.2011,60(l):75-85,Muranski等人,Nat Clin Pract Oncol,20063(12):668-681,Dudley等人,J Clin Oncol 2008,26:5233-5239和Dudley等人,J Clin Oncol.2005,23(10):2346-2357,将其全部通过引用以其整体并入本文。在一些实施方案中，以如下剂量

施用氟达拉滨:10mg/kg/天、15mg/kg/天、20mg/kg/天、25mg/kg/天、30mg/kg/天、35mg/kg/天、40mg/kg/天或45mg/kg/天,或者任何前述剂量的范围之间的剂量量。在一些实施方案中,氟达拉滨持续2-7天,如持续3-5天,如为或约3天、为或约4天或者为或约5天。在一些实施方案中,以如下剂量施用环磷酰胺:100mg/m2/天、150mg/m2/天、175mg/m2/天、200mg/m2/天、225mg/m2/天、250mg/m2/天、275mg/m2/天或300mg/m2/天。在一些实施方案中,静脉内(即,i.v.)施用环磷酰胺。在一些实施方案中,环磷酰胺治疗持续2-7天,如3-5天、为或约3天、为或约4天或者为或约5天。在所提供的细胞组合物前施用淋巴细胞清除疗法。在一些实施方案中,在施用所提供的细胞组合物一周内(如在施用所述剂量的细胞之前5-7天)进行淋巴细胞清除疗法。

[0607] 本文所述的组合物可以用于治疗过度增殖性障碍的方法中。在一个优选实施方案中,它们用于在治疗癌症中使用。在一些方面,癌症可以是黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、肾细胞癌、急性髓性白血病、结直肠癌和肉瘤。

在一些实施方案中,癌症是具有高突变负荷的癌症。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

[0608] 在一些实施方案中,癌症是上皮癌。在一些实施方案中,癌症选自非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌。

在一些实施方案中,乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌。在一些实施方案中,乳腺癌是三阴性乳腺癌(TNBC)。在一些实施方案中,乳腺癌是HER2+乳腺癌。

[0609] 在一些实施方案中,受试者患有癌症,所述癌症是血液肿瘤。血液肿瘤的非限制性例子包括白血病(包括急性白血病(如l lq23阳性急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓细胞性白血病以及成髓细胞白血病、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病)、慢性白血病(如慢性粒细胞(myelocytic/granulocytic)白血病、慢性髓细胞性白血病和慢性淋巴细胞白血病))、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高分级形式)、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0610] 在一些实施方案中,受试者患有实体瘤癌症。实体瘤(如肉瘤和癌)的非限制性例子包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌(包括基底乳腺癌、导管癌和小叶乳腺癌)、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、肾母细胞瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌和CNS肿瘤(如神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)。在几个例子中,肿瘤是黑色素瘤、肺癌、淋巴瘤、乳腺癌或结肠癌。

[0611] 在一些实施方案中,癌症是皮肤癌。在特定实施方案中,癌症是黑色素瘤,如皮肤黑色素瘤。在一些实施方案中,癌症是梅克尔细胞癌或转移性皮肤鳞状细胞癌(CSCC)。

[0612] 在一些实施方案中,肿瘤是如下癌,所述癌是从上皮细胞发展的癌症或者是上皮

起源的癌症。在一些实施方案中，癌症源自上皮细胞，其包括但不限于乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌和皮肤癌(如鳞状细胞癌和基底细胞癌)、前列腺癌、肾细胞癌以及影响全身上皮细胞的其他已知癌症。

[0613] 在一些实施方案中，受试者患有癌症，所述癌症是涉及胃肠道(GI道)癌症的胃肠癌，包括上消化道或下消化道或附属消化器官(如食道、胃、胆管系统、胰腺、小肠、大肠、直肠或肛门)的癌症。在一些实施方案中，癌症是食道癌、胃(stomach/gastric)癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌、粘膜相关淋巴组织的癌症(MALT淋巴瘤)、胆管树的癌症、结直肠癌(包括结肠癌、直肠癌或两者)、肛门癌或胃肠类癌瘤。在特定实施方案中，癌症是结直肠癌。

[0614] 在一些实施方案中，癌症是结直肠癌。结直肠癌(CRC)是一种发病率逐渐增加的常见肿瘤，其在许多情形中对检查点抑制或其他免疫疗法没有反应。即使此类癌症具有与反应相关的特性(例如适当的高突变率和充分确立的预后与T细胞浸润水平的关联)也是如此。

[0615] 在一些实施方案中，癌症是卵巢癌。在一些实施方案中，癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)。

[0616] 在一些实施方案中，癌症是肺癌。在一些实施方案中，癌症是乳腺癌。在一些实施方案中，癌症是结直肠癌。在一些实施方案中，癌症是胰腺癌。在一些实施方案中，癌症是梅克尔细胞癌。在一些实施方案中，癌症是转移性皮肤鳞状细胞癌(CSCC)。在一些实施方案中，癌症是黑色素瘤。

[0617] 在一些实施方案中，受试者是如下受试者，所述受试者的癌症是检查点阻断(如抗PD1或抗PD-L1疗法)难治的，和或所述受试者在用所述检查点阻断治疗后复发。

[0618] 在一些实施方案中，受试者是获得生物样品用于产生治疗性细胞组合物的同一受试者。在一些此类实施方案中，所提供的治疗方法是用含有对于受试者是自体的T细胞的治疗性组合物的过继细胞疗法。

[0619] 在一些实施方案中，本文所提供的细胞组合物对于待治疗的受试者是自体的。在此类实施方案中，直接从如本文所述的来自受试者的生物样品分离用于扩增的起始细胞，在一些情形中包括进行富集对如所述的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞，并且在如本文所提供的用于扩增的条件下进行培养。在一些实施方案中，培养包括用一种或多种T细胞佐剂(如共刺激激动剂和/或细胞凋亡抑制剂)进行孵育以及用如所述的一种或多种T细胞刺激剂进行孵育。在一些方面，来自受试者的生物样品是或包括肿瘤或淋巴结样品，并且如通过切除或活检(例如芯针活检或细针抽吸)获得此种样品肿瘤和一定量的此种组织。在一些实施方案中，来自受试者的生物样品是或包括外周血样品，如单采术样品。在一些实施方案中，在用于扩增的条件下培养后，配制细胞并将其任选地冷冻保存以供随后施用至同一受试者用于治疗癌症。

[0620] 在一些实施方案中，本文所提供的细胞组合物对于待治疗的受试者是同种异体的。在一些方面，衍生出或分离出细胞的受试者是健康受试者，或者不知道患有疾病或病症，如癌症。在此类实施方案中，直接从如本文所述的来自此名受试者的生物样品分离用于扩增的起始细胞，在一些情形中包括进行富集对如所述的一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞，并且在如本文所提供的用于扩增的条件下进行培养。在一些实施方案

中,培养包括用一种或多种T细胞佐剂(如共刺激激动剂和/或细胞凋亡抑制剂)进行孵育以及用如所述的一种或多种T细胞刺激剂进行孵育。在一些方面,来自受试者的生物样品是或包括肿瘤或淋巴结样品,并且如通过切除或活检(例如芯针活检或细针抽吸)获得此种样品肿瘤和一定量的此种组织。在一些实施方案中,来自受试者的生物样品是或包括外周血样品,如单采术样品。在一些实施方案中,在用于扩增的条件下培养后,配制细胞并将其任选地冷冻保存以供随后施用至不同受试者用于治疗此名不同受试者的癌症。

[0621] 在一些实施方案中,所提供的方法可以与一种或多种其他免疫疗法一起进行。在一些实施方案中,免疫疗法是免疫调节剂,所述免疫调节剂是免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂特异性结合选自以下的分子:CD25、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、4-1BB、GITR、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CXCR2、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、CD28、TIGIT和VISTA。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂是抗体或抗原结合片段、小分子或多肽。在一些实施方案中,免疫检查点抑制剂选自纳武单抗、派姆单抗、匹地利珠单抗、MK-3475、BMS-936559、MPDL3280A、伊匹单抗、曲美木单抗、IMP31、BMS-986016、乌瑞鲁单抗、TRX518、达西珠单抗(dacetuzumab)、卢卡木单抗(lucatumumab)、SEQ-CD40、CP-870、CP-893、MED16469、MEDI4736、MOXR0916、AMP-224和MSB001078C,或者是其抗原结合片段。

[0622] 在一些实施方案中,所提供的方法包括如所述的细胞疗法和PD-1或PD-L1抑制剂的组合疗法。PD-1或PD-L1抑制剂可以包括结合抗体、拮抗剂或抑制剂(即,阻断剂)。

[0623] 在一个实施方案中,PD-I抑制剂是纳武单抗(可作为OPDIVO从Bristol-Myers Squibb Co.购得)或其生物仿制药、抗原结合片段、缀合物或变体。纳武单抗是一种阻断PD-I受体的全人IgG4抗体。在一个实施方案中,抗PD-I抗体是免疫球蛋白G4κ抗(人CD274)抗体。纳武单抗被分配化学文摘社(CAS)登记号946414-94-4,并且也称为5C4、BMS-936558、l\tIDX-1106和ONO-4538。纳武单抗的制备和特性描述于美国专利号8,008,449和国际专利公开号WO 2006/121168中。

[0624] 在另一个实施方案中,PD-1抑制剂包括派姆单抗(可作为KEYTRUDA从美国新泽西州凯尼尔沃思的Merck&Co.,Inc.购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。派姆单抗被分配CAS登记号1374853-91-4,并且也称为兰博利珠单抗、MK-3475和SCH-900475。派姆单抗的特性、用途和制备描述于国际专利公开号WO 2008/156712 Al、美国专利号8,354,509以及美国专利申请公开号US 2010/0266617 Al、US 2013/0108651 Al和US2013/0109843A2中。

[0625] 在一个实施方案中,PD-LI抑制剂是德瓦鲁单抗,也称为MEDI4736(其可从作为AstraZeneca plc.子公司的马里兰州盖瑟斯堡的Medimmune,LLC购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。在一个实施方案中,PD-LI抑制剂是美国专利号8,779,108或美国专利申请公开号2013/0034559中披露的抗体。

[0626] 在一个实施方案中,PD-LI抑制剂是阿维鲁单抗,也称为MSB0010718C(可从Merck KGaA/EMD Serono购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。阿维鲁单抗的制备和特性描述于美国专利申请公开号US 2014/0341917 Al中。

[0627] 在一个实施方案中,PD-LI抑制剂是阿特珠单抗,也称为MPDL3280A或RG7446(可作为TECENTRIQ从作为瑞士巴塞尔的Roche Holding AG子公司的Genentech,Inc.购得)或其抗原结合片段、缀合物或变体。在一个实施方案中,PD-LI抑制剂是美国专利号8,217,149中披露的抗体,将其公开内容通过引用明确并入本文。在一个实施方案中,PD-LI抑制剂是美

国专利申请公开号2010/0203056A1、2013/0045200A1、2013/0045201A1、2013/0045202A1或2014/0065135A1中披露的抗体。阿特珠单抗的制备和特性描述于美国专利号8,217,149中。

V.试剂盒和制品

[0628] 本文提供了包含所提供的组合物的制品和试剂盒，所述组合物如含有通过所提供的任何方法产生的T细胞或者含有或富集肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞的组合物。在一些实施方案中，通过所提供的任何方法产生组合物。

[0629] 试剂盒可以任选地包括一个或多个组件，如使用说明书、装置和另外的试剂(例如，用于稀释组合物和/或重构经冻干的蛋白质的无菌水或盐水溶液)以及用于实践所述方法的组件(如管、容器和注射器)。在一些实施方案中，试剂盒可以进一步含有用于样品的收集、样品的制备和处理的试剂，和/或用于对样品中的一种或多种表面标记物的量进行定量的试剂(如但不限于检测试剂，如抗体、缓冲液、酶染色底物、色原或其他材料(如载玻片、容器、微量滴定板))，以及任选地用于进行所述方法的说明书。本领域技术人员将认识到可以根据所提供的方法使用的许多其他可能的容器和板以及试剂。

[0630] 在一些实施方案中，试剂盒可以作为制品来提供，所述制品包括用于包装细胞、抗体或试剂或其组合物或者一种或多种其他组分的包装材料。例如，试剂盒可以含有容器、瓶、管、小瓶以及适合于分离或组织试剂盒的组分的任何包装材料。所述一个或多个容器可以由多种材料(如玻璃或塑料)形成。在一些实施方案中，所述一个或多个容器容纳包含细胞或抗体或用于在所述方法中使用的其他试剂的组合物。本文的制品或试剂盒可以在单独的容器中或在同一容器中包含细胞、抗体或试剂。

[0631] 在一些实施方案中，容纳组合物的所述一个或多个容器可以是一次性使用的小瓶或多次使用的小瓶，后者在一些情形中可以允许重复使用组合物。在一些实施方案中，制品或试剂盒可以进一步包含第二容器，所述第二容器包含合适的稀释剂。制品或试剂盒可以进一步包括从商业、治疗和用户角度来看希望的其他材料，包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器、治疗剂和/或印有使用说明书的包装插页。

[0632] 在一些实施方案中，试剂盒可以任选地包括说明书。说明书通常包括描述细胞组合物、任选地试剂盒中包括的其他组分及其使用方法的明确表达。在一些实施方案中，说明书指示如根据所提供的任何实施方案使用细胞组合物施用至受试者以供治疗疾病或病症的方法。在一些实施方案中，说明书作为标签或包装插页来提供，所述标签或包装插页位于容器上或与容器相关联。在一些实施方案中，说明书可以指示重构和/或使用组合物的指导。

VI.定义

[0633] 除非另外定义，否则本文所用的所有领域术语、符号以及其他技术和科学术语或命名都旨在具有与所要求保护的主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情形中，为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语，并且在本文中包括此类定义不一定应当被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0634] 除非上下文另外明确规定，否则如本文所用，单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。例如，“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”意指“至少一个/至少一种”或“一个或多个/一种或多种”。应理解，本文所述的方面和变化包括

“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0635] 在整个本公开文本中，所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应当理解，以范围形式描述仅仅是为了便捷和简洁，并且不应当被解释为对所要求保护的主题的范围的僵硬限制。因此，应当将范围的描述视为已经明确公开该范围内所有可能的子范围以及单独数值。例如，在提供值的范围的情况下，应理解，在该范围的上限与下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他所陈述值或中间值都涵盖在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在较小范围内，并且也涵盖在所要求保护的主题内，受制于所陈述范围内任何明确排除的限值。在所陈述范围包括一个或两个限值的情况下，排除那些所包括限值中的任一个或两个的范围也被包括在所要求保护的主题内。无论范围的宽度如何，这都适用。

[0636] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知晓的对应值的通常误差范围。在本文中提及“约”某值或参数包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如，提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0637] 术语“表位”意指源自蛋白质抗原的短肽，其中肽与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合，并且在MHC结合的背景下被T细胞识别。表位可以结合MHC I类分子(例如，HLA-A1、HLA-A2或HLA-A3)或MHC II类分子。

[0638] 术语“T细胞佐剂”是指如下药剂或分子，所述药剂或分子促进T细胞存活，拯救细胞免于细胞凋亡，维持扩增和/或增加细胞因子产生。示例性T细胞佐剂包括例如T细胞共刺激激动剂或细胞凋亡抑制剂。

[0639] 如关于共刺激激动剂的术语“激动剂”和“激动性”是指或描述如下分子，所述分子能够直接或间接地实质性诱导、促进或增强由共刺激受体(如OX40或4-1BB或其他共刺激受体)介导的生物活性或激活。激动剂可以是抗体或抗原结合片段，或者可以是共刺激受体的配体。例如，激动剂可以是生物活性配体，其与其互补的生物活性受体结合并激活所述受体，从而引起受体的生物反应或增强受体的预先存在的生物活性。

[0640] 如本文所用的术语“同种异体的”意指从一种生物体取出并且然后输注或过继转移至相同物种的在遗传上不同的生物体中的细胞或组织。

[0641] 如本文所用的术语“自体的”意指从生物体中取出并且之后输注或过继转移至同一生物体中的细胞或组织。

[0642] 本文的术语“抗体”是以最广义使用，并且包括多克隆和单克隆抗体，包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段，包括片段抗原结合(Fab)片段、$F(ab')_2$片段、Fab’片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))和单结构域抗体(例如，sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式，如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体、多特异性(例如，多特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另外说明，否则术语“抗体”应当理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体，包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。所提供的抗体包括抗体片段。

[0643] “抗体片段”或“抗原结合片段”是指除了常规或完整抗体以外的分子，其包含常规或完整抗体的一部分，所述部分至少含有结合抗原的可变区。抗体片段的例子包括但不限

于Fv、单链Fv(sdFv)、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$;双抗体;线性抗体;仅包含V_H区的单结构域抗体(VHH)。

[0644] 如本文所用,"结合(bind)"、"结合(bound)"或其语法变型是指分子参与和另一种分子的任何有吸引力的相互作用,导致稳定缔合,其中这两种分子彼此非常靠近。结合包括但不限于非共价键、共价键(如可逆和不可逆共价键),并且包括分子之间的相互作用,所述分子如但不限于蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质和小分子,如包括药物在内的化学化合物。

[0645] 术语"生物样品"意指来自活物或曾经的活物的一定量的物质。此类物质包括但不限于血液(例如,全血)、血浆、血清、尿液、羊水、滑液、内皮细胞、白细胞、单核细胞、其他细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾脏。

[0646] 如本文所用,当提及一种或多种特定细胞类型或细胞群时,"富集"是指例如与组合物中的总细胞数或组合物的体积相比或者相对于其他细胞类型,如通过基于群体或细胞表达的标记物的阳性选择,或通过基于在待耗尽的细胞群或细胞上不存在的标记物的阴性选择来增加细胞类型或群体的数量或百分比。所述术语不需要从组合物完全去除其他细胞、细胞类型或群体,并且不需要如此富集的细胞在经富集的组合物中以等于或甚至接近100%存在。

[0647] 术语"同时地"在本文中用于指代涉及两种或更多种药剂的程序,如孵育、选择、富集或施用,其中在特定程序中用一种药剂的至少一部分在时间上与至少第二药剂重叠。

[0648] 术语"间断地"在本文中用于指代涉及两种或更多种药剂的程序,如孵育、选择、富集或施用,其中涉及每种药剂的特定程序不以规律的间隔进行,或者不是连续的,或者间隔一定时间段反复停止和开始。

[0649] 术语"依序地"在本文中用于指代涉及两种或更多种药剂的程序,如孵育、选择、富集或施用,其中涉及每种药剂的特定程序在时间上不重叠。

[0650] 如本文所用,关于肽、蛋白质或多肽的"分离的"或"纯化的"是指如下分子,所述分子基本上不含所有其他多肽、污染物、起始试剂或其他材料,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品。如果制剂看起来不含如通过本领域技术人员用于评估这种纯度的标准分析方法(如高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)或毛细管电泳(CE))所确定可易于检测的杂质,或者足够纯而使得进一步纯化不会可检测地改变物质的物理和化学特性,则可以确定所述制剂基本上是游离的。

[0651] 如本文所用,术语"重组的"是指已经通过引入外源(如异源)核酸分子而被修饰的细胞、微生物、核酸分子或载体,或者是指已经被改变使得内源核酸分子或基因的表达受到控制、失调或呈组成型的细胞或微生物,其中此类改变或修饰可以通过遗传工程引入。遗传改变可以包括例如引入编码一种或多种蛋白质或酶的核酸分子(其可以包括表达控制元件,如启动子)的修饰或其他核酸分子添加、缺失、取代或对细胞遗传材料的其他功能性破坏或添加。示例性修饰包括异源或同源多肽的编码区或其功能片段中的相对于参考或亲本分子的修饰。术语"重组的"还可以指代从此种核酸分子或载体或者从此种细胞或微生物(向其中引入外源核酸或用外源核酸修饰)表达的蛋白质产物。

[0652] 如本文所用,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0653] 如本文所用,"任选的"或"任选地"意指随后描述的事件或情形发生或不发生,并

且所述描述包括所述事件或情形发生的情况和所述事件或情形不发生的情况。例如，任选地取代的基团意指基团未被取代或被取代。

[0654] 术语“药物组合物”是指适合于哺乳动物受试者(通常是人)的医药用途的组合物。药物组合物通常包含有效量的活性剂(例如，如根据所提供的方法扩增的细胞)以及载体、赋形剂或稀释剂。载体、赋形剂或稀释剂通常分别是药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0655] “药学上可接受的载体”是指用于与治疗剂一起使用的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包囊材料、配制助剂或本领域常规的载体，它们共同构成用于施用至受试者的“药物组合物”。药学上可接受的载体在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒，并且与配制品的其他成分相容。药学上可接受的载体适用于所采用的配制品。

[0656] 在本文中提及“细胞群”意在指代共享共同性状的多个细胞。细胞群通常含有多个细胞，如大于为或约100个细胞、为或约1000个细胞，并且通常数量的范围为$1x10^{4}$至$1x10^{10}$。

[0657] 关于蛋白质的如本文所用的术语“可溶性”意指蛋白质没有结合、固定或附着至颗粒(如细胞)或固体支持物(例如珠)。例如，可溶性蛋白包括如下蛋白质，所述蛋白质没有像跨膜蛋白那样结合至细胞的细胞膜。在一些情形中，蛋白质的溶解性可以通过直接或间接地经由接头与另一种分子(如Fc结构域)连接或附着来改进，这在一些情形中还可以改进蛋白质的稳定性和/或半衰期。在一些方面，可溶性蛋白是Fc融合蛋白。

[0658] 如本文所用的术语“特异性结合”意指蛋白质在特异性结合条件下与靶蛋白结合，使得其亲和力或亲合力是相同蛋白质与足够统计量的随机肽或多肽集合的平均亲和力或亲合力的至少10倍，但是任选地50、100、250或500倍，或甚至至少1000倍的能力。特异性结合蛋白无需仅与单一靶标分子结合，而是可以与超过一种靶标分子特异性结合。在一些情形中，特异性结合蛋白可以与结构构象与靶蛋白类似的蛋白质(例如，旁系同源物或直系同源物)结合。技术人员将认识到，特异性结合至在不同物种的动物中具有相同功能的分子(即，直系同源物)或与靶分子具有基本上类似的表位的分子(例如，旁系同源物)是可能的，并且不会减弱相对于独特非靶标(例如，随机多肽)的统计学上有效的集合来确定的结合特异性。固相ELISA免疫测定、ForteBio Octet或Biacore测量可以用于确定两种蛋白质之间的特异性结合。通常，两种结合蛋白之间的相互作用的解离常数(Kd)小于约$1x10^{-5}$M，并且通常低至约$1x10^{-12}$M。在本公开文本的某些方面，两种结合蛋白之间的相互作用的解离常数小于约$1x10^{-6}$M、$1x10^{-7}$M、$1x10^{-8}$M、$1x10^{-9}$M、$1x10^{-10}$M或$1x10^{-11}$M或更小。

[0659] 如本文所用，细胞或细胞群对特定标记物呈“阳性”的陈述是指，特定标记物(通常是表面标记物)在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标记物时，所述术语是指如通过流式细胞术检测到的表面表达的存在，例如通过用与标记物特异性结合的抗体染色并检测所述抗体，其中染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的，所述水平显著高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色，和/或所述水平与已知对标记物呈阳性的细胞的水平基本上类似，和/或所述水平显著高于已知对标记物呈阴性的细胞的水平。

[0660] 如本文所用，细胞或细胞群对特定标记物呈“阴性”的陈述是指，特定标记物(通常是表面标记物)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记物时，所述术语是指如通过流式细胞术检测到的表面表达的不存在，例如通过用与标记物特异性结合

的抗体染色并检测所述抗体，其中染色通过流式细胞术以如下水平检测不到，所述水平显著高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色，和/或所述水平显著低于已知对标记物呈阳性的细胞的水平，和/或所述水平与已知对标记物呈阴性的细胞的水平相比是基本上类似的。

[0661] 如本文所用，“受试者”是哺乳动物，如人或其他动物，并且通常是人。受试者可以是雄性或雌性，并且可以是任何合适的年龄，包括婴儿、幼年、青少年、成年和老年受试者。

[0662] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指如含有例如根据所提供的方法扩增的细胞的治疗性组合物在施用至患者时产生病症、障碍或疾病或其他适应证的症状被改善或以其他方式有益地改变的任何方式的量和/或浓度。用于治疗疾病或障碍的有效量可以是减轻、减少或缓解与疾病或障碍相关的至少一种症状或生物反应或效应，阻止疾病或障碍进展，或者改进患者的身体机能的量。在特定方面，存在对疾病进展的统计学上显著的抑制，如例如通过改善或消除疾病的症状和/或病因。在细胞疗法的情形中，有效量是施用至患者的细胞的有效剂量或数量。在一些实施方案中，患者是人类患者。

[0663] 如本文所用，“疾病”、“障碍”或“病症”是指由包括但不限于感染、获得性病症、遗传病症的原因或病症引起的并且由可识别的症状表征的生物体的病理病症。特别地，它是需要和/或期望治疗的病症。

[0664] 如本文所用的术语疾病或障碍的“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”意指减慢、停止或逆转疾病或障碍的进展，如通过临床或诊断症状的减少、停止或消除所证实的，通过施用单独的或与如本文所述的另一种化合物组合的本发明的免疫调节蛋白或工程化细胞来实现。“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”或“疗法”还意指急性或慢性疾病或障碍的症状严重程度的降低，或如例如在复发型或缓解型自身免疫性疾病病程的情形中复发率的降低，或在自身免疫性疾病的炎症方面的情形中炎症的减少。如在本发明背景下所用的疾病或障碍的“预防(preventing)”、“预防(prophylaxis)”或“预防(prevention)”是指施用单独的或与另一种化合物组合的本发明的免疫调节蛋白或表达免疫调节蛋白的工程化细胞，以防止疾病或障碍或者疾病或障碍的一些或所有症状出现或发作，或者减小疾病或障碍发作的可能性。例如，在癌症的背景下，术语癌症的“治疗”或“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”或“抑制(inhibition)”是指以下中的至少一种：肿瘤生长速率的统计学上显著的下降，肿瘤生长的停止，或者肿瘤的大小、质量、代谢活性或体积的降低，如通过标准准则(如但不限于实体瘤的疗效评价标准(RECIST))所测量的；或者无进展生存期(PFS)或总生存期(OS)的统计学上显著的增加。

[0665] 术语“抗原”是指可以诱导免疫反应的分子。通常，抗原是能够被免疫分子(如抗体或T细胞受体(如果由主要组织相容性复合物(MHC)分子呈递))上的识别位点结合的分子。抗原可以具有一个或多个表位，其中作为抗原的一部分的每个表位可以被抗体或TCR/MHC复合物的识别位点结合。在一些实施方案中，抗原能够诱导体液免疫反应或细胞免疫反应，导致B淋巴细胞和/或T淋巴细胞的激活。

[0666] 如本文所用，“肿瘤相关抗原”或“肿瘤特有的抗原”是指仅在癌细胞上而不在正常细胞上发现的蛋白质或其他分子。

[0667] 如本文所用，“新抗原”是指先前尚未暴露免疫系统的抗原，如通过病毒感染、致瘤性转化、药物代谢或其他方式改变宿主抗原而产生的抗原。在特定方面，新抗原是由肿瘤特

有的经突变的基因编码的抗原,或者是在肿瘤细胞中发展的新抗原。

[0668] 术语“体内”是指在哺乳动物受试者体内发生的事件。

[0669] 术语“离体”是指在哺乳动物受试者的组织或细胞之上或之内发生但在哺乳动物受试者体外的事件。通常,事件在外部环境中进行。在特定方面,离体程序包括如下任何程序,其中从用于治疗或程序的受试者(通常是活体)获取器官、细胞或组织,然后将其返回受试者。

[0670] 术语“体外”是指在测试系统中(如在实验室中)发生的事件。

[0671] 如本文所用,试剂盒是经包装的组合,其任选地包括其他元件(如另外的试剂)以及组合或其元件的使用说明书。

[0672] 术语“包装插页”用于指代通常在治疗产品的商业包装中所包括的说明书,所述说明书含有关于使用此类治疗产品的适应证、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌证和/或警告的信息。

[0673] 如本文所用,“制品”是被制造的并且在一些情形中可以销售的产品。在一些实施方案中,所述术语可以指代包装物品中(如容器中)所含的组合物。

[0674] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“包含方面和实施方案”、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。

VII.示例性实施方案

[0675] 所提供的实施方案包括:

1.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,任选地其中所述一种或多种T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,任选地其中所述至少一种重组细胞因子是IL-2,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,任选地其中所述一种或多种T细胞刺激剂包括(i)启动TCR/CD3细胞内信号传导的药剂,(ii)启动经由共刺激受体的信号传导的药剂以及(iii)选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在重组IL-23、重组IL-25和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。

2.根据实施方案1所述的方法,其中启动TCR/CD3细胞内信号传导的所述药剂是抗

CD3抗体,任选地OKT3。

3.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中所述T细胞共刺激受体是CD28。

4.根据实施方案1-3中任一项所述的方法,其中启动经由T细胞共刺激受体的信号传导的所述药剂包含外周血单个核细胞(PBMC),任选地非分裂的或经辐照的PBMC。

5.根据实施方案1-4中任一项所述的方法,其中启动经由共刺激受体的信号传导的所述药剂是抗CD28抗体,任选地其中所述抗CD28。

6.根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中:

所述第一次扩增中的所述培养是用各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体;和/或

所述第二次扩增中的所述培养是用各自可溶的抗CD3抗体和抗CD28抗体。

7.根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述生物样品是经切除的肿瘤。

8.根据实施方案7所述的方法,其中获得所述第一T细胞群包括使所述经切除的肿瘤破碎成一个或多个碎片。

9.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)使来自受试者的经切除的肿瘤破碎成一个或多个碎片,所述一个或多个碎片包含第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,任选地其中所述一种或多种T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,任选地其中所述至少一种重组细胞因子是IL-2,以产生第一经扩增的T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽各自包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集所述肿瘤反应性T细胞的第四群体;

(e)通过用可溶性抗CD3抗体(任选地OKT3)、可溶性抗CD28抗体以及选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在重组IL-23、重组IL-25和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。

10.根据实施方案8或实施方案9所述的方法,其中所述碎片是0.5mm至3mm的碎片,任选地1mm至2mm的碎片。

11.根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增和/或所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。

12.根据实施方案1-10中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增和/或所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-7和重组IL-15。

13.根据实施方案1-6中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增和/或所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2、重组IL-7和重组IL-15。

14.根据实施方案1-13中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增在重组IL-23、重组IL-25和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。

15.根据实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增在重组IL-23的存在下进行。

16.根据实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增在重组IL-25的存在下进行。

17.根据实施方案1-14中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

18.根据实施方案1-17中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增在重组IL-23、重组IL-25和/或免疫抑制阻断剂的存在下进行。

19.根据实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增在重组IL-23的存在下进行。

20.根据实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增在重组IL-25的存在下进行。

21.根据实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

22.根据实施方案1-14、17、18和21中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制存在于肿瘤微环境中的免疫抑制因子的活性。

23.根据实施方案22所述的方法,其中所述免疫抑制因子是IL-27、IL-35、TGFβ或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)。

24.根据实施方案1-14、17、18和21-23中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制IL-27的活性。

25.根据1-14、17、18和21-24所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂是IL-27Rα受体的可溶形式,任选地IL-27Ra Fc融合蛋白。

26.根据实施方案1-14、17、18和21-24所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂是针对IL-27或其亚基的单克隆抗体。

27.根据实施方案1-14、17、18和21-23中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制IL-35的活性。

28.根据实施方案1-14、17、18、21-23和27中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂是针对IL-27或其亚基的单克隆抗体。

29.根据实施方案26或实施方案28所述的方法,其中所述单克隆抗体结合或识别IL-27β(EBI3)。

30.根据实施方案1-14、17、18和21-23中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制TGFβ的活性。

31.根据实施方案1-14、17、18、21-23和30中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻断剂是针对TGFβ的单克隆抗体,任选地非苏木单抗;针对TGFβ受体的抗体,任选地LY3022859;吡咯-咪唑聚酰胺药物;靶向TGFβ1或TGFβ2mRNA的反义RNA,任选地ISTH0036或ISTH0047;或者ATP-模拟物TβRI激酶抑制剂,任选地加尼舍替。

32.根据实施方案1-14、17、18和21-23中任一项所述的方法,其中所述免疫抑制阻

断剂是IDO抑制剂。

33.根据实施方案32所述的方法，其中所述IDO抑制剂是PF-06840003、艾卡哚司他(INCB24360)、INCB23843、纳沃昔莫德(GDC-0919)、BMS-986205、伊马替尼或1-甲基-色氨酸。

34.根据实施方案1-33中任一项所述的方法，其中在所述培养前，所述方法包括产生新抗原肽的突变文库，任选地其中所述肽的长度为8至32个氨基酸，长度为8至24个氨基酸，长度为8至18个氨基酸，长度为8至10个氨基酸，长度为10至32个氨基酸，长度为10至24个氨基酸，长度为10至18个氨基酸，长度为18至32个氨基酸，长度为18至24个氨基酸或者长度为24至32个氨基酸，任选地为或约9聚体；并且

通过在于所述MHC的表面上呈递所述肽中的一种或多种的条件下用所述肽突变文库脉冲所述APC来使所述APC接触或暴露于所述至少一种新抗原肽。

35.根据实施方案1-34中任一项所述的方法，其中使APC暴露于或接触所述至少一种新抗原肽包括：

产生编码包含所述肿瘤特有的突变的所述至少一种新抗原肽的DNA，任选地小基因构建体；

在体外将所述DNA转录成RNA；

在于主要组织相容性复合物(MHC)的表面上呈递所述新抗原肽中的一种或多种的条件下将所述经体外转录的RNA引入所述APC中，任选地其中所述MHC是MHC II类。

36.根据实施方案1-35中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增中的所述培养进行7至10天。

37.根据实施方案1-36中任一项所述的方法，其中所述APC是单核细胞源树突细胞，任选地其中所述APC对于所述受试者是自体的。

38.根据实施方案1-37中任一项所述的方法，其中所述第二T细胞群与所述APC/新抗原肽的孵育持续长达96小时、任选地持续6至48小时、任选地持续24至48小时、任选地持续为或约6小时、为或约12小时、为或约18小时、为或约24小时或者任何前述值之间的任何值。

39.根据实施方案1-38中任一项所述的方法，其中在所述第三群体中将T细胞与所述APC分离以产生富集肿瘤反应性T细胞的所述第四群体包括选择对一种或多种激活标记物呈表面阳性的T细胞。

40.根据实施方案39所述的方法，其中所述一种或多种激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134(OX40)、CD258、CD256、PD-1、TIM-3和LAG-3。

41.根据实施方案40所述的方法，其中所述一种或多种激活标记物是CD137(4-1BB)和CD134(OX40)。

42.根据实施方案1-41中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增中的所述培养持续7至10天。

43.根据实施方案1-42中任一项所述的方法，其中所述受试者展现出疾病或病症，任选地其中所述疾病或病症是癌症。

44.根据实施方案1-43中任一项所述的方法，其中进行所述第二次扩增中的所述

培养直至达到如下阈值细胞量:为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间的总细胞或总活细胞、为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间的总细胞或总活细胞或者为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间的总细胞或总活细胞,每个都包含端值。

45.根据实施方案1-44中任一项所述的方法,其中所述方法导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增,所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或者更多倍。

46.根据实施方案1-45中任一项所述的方法,其中所述受试者展现出疾病或病症,任选地其中所述疾病或病症是癌症。

47.根据实施方案1-46中任一项所述的方法,所述方法进一步包括配制所述经收获的细胞用于施用至受试者。

48.根据实施方案47所述的方法,其中所述配制包括冷冻保存,其中在施用至所述受试者之前将所述细胞解冻。

49.一种通过根据实施方案1-48中任一项所述的方法产生的组合物。

50.根据实施方案49所述的组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

51.根据实施方案49或实施方案50所述的组合物,所述组合物包含冷冻保护剂。

52.根据实施方案49-51中任一项所述的组合物,所述组合物是无菌的。

53.一种治疗方法,所述治疗方法包括将根据实施方案49-52中任一项的组合物施

用至患有癌症的受试者。

54.根据实施方案53所述的方法,其中所述经施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

55.根据实施方案53或实施方案54所述的方法,其中所述癌症是上皮癌。

56.根据实施方案46和53-55中任一项所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、乳腺癌以及皮肤癌如鳞状细胞癌和基底细胞癌、前列腺癌或肾细胞癌。

57.根据实施方案46和53-56中任一项所述的方法,其中所述癌症是黑色素瘤。

58.根据实施方案46和53-56中任一项所述的方法,其中所述癌症是食道癌、胃(stomach/gastric)癌、胰腺癌、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌、粘膜相关淋巴组织的癌症(MALT淋巴瘤)、胆管树的癌症、结直肠癌(包括结肠癌、直肠癌或两者)、肛门癌或胃肠类癌瘤。

59.根据实施方案46和53-56中任一项所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌,任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

[0676] 所提供的实施方案还包括:

1.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

2.根据实施方案1所述的方法,其中步骤(b)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

3.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其中步骤(c)在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

4.根据实施方案1-3中任一项所述的方法,其中步骤(e)在选自重组IL-23、重组

IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

5.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

6.根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个进一步在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

7.根据实施方案1-5中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、细胞凋亡抑制剂和热休克蛋白抑制剂的T细胞佐剂的存在下进行。

8.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物;

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

9.根据实施方案8所述的方法,其中步骤(b)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

10.根据实施方案8或实施方案9所述的方法,其中步骤(c)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

11.根据实施方案8-10中任一项所述的方法,其中步骤(e)在所述免疫抑制阻断剂的存在下进行。

12.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在免疫抑制阻断剂的存在下进行,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体;

(d)在所述孵育后,将T细胞与所述APC分离,以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群;

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增,其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第五T细胞群;以及

(f)收获所述第五T细胞群,以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

13.根据实施方案8-12中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个进一步在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

14.根据实施方案8-13中任一项所述的方法,其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂、细胞凋亡抑制剂和热休克蛋白抑制剂的T细胞佐剂的存在下进行。

15.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法,所述方法包括:

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群;

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增,其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子,以产生第二T细胞群;

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育,所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变,以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的

至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；

(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及

(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物；

其中步骤(a)-(e)中的一个或多个在浓度为或约0.5μM与为或约100μM之间的细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

16.根据实施方案15所述的方法，其中步骤(b)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

17.根据实施方案15或实施方案16所述的方法，其中步骤(c)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

18.根据实施方案15-17中任一项所述的方法，其中步骤(e)在所述细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

19.一种产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法，所述方法包括：

(a)从来自患有肿瘤的受试者的生物样品获得第一T细胞群；

(b)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第一T细胞刺激剂培养所述第一T细胞群来进行第一次扩增，其中所述一种或多种第一T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，并且其中用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行的所述孵育在浓度为或约0.5μM与为或约100μM之间的细胞凋亡抑制剂的存在下进行；

(c)将来自所述第二T细胞群的细胞与已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的抗原呈递细胞(APC)一起孵育，所述一种或多种新抗原肽包含存在于所述受试者的肿瘤中的肿瘤特有的突变，以产生含有识别在所述APC上的主要组织相容性复合物(MHC)上呈递的至少一种新抗原肽的肿瘤反应性T细胞的第三群体；

(d)在所述孵育后，将T细胞与所述APC分离，以产生富集肿瘤反应性T细胞的第四T细胞群；

(e)通过用刺激T细胞扩增的一种或多种第二T细胞刺激剂培养富集所述肿瘤反应性T细胞的所述第四群体来进行第二次扩增，其中所述一种或多种第二T细胞刺激剂包括选自IL-2、IL-15、IL-7和IL-21中的一种或多种的至少一种重组细胞因子，以产生第五T细胞群；以及

(f)收获所述第五T细胞群，以产生肿瘤反应性T细胞组合物。

20.根据实施方案15-19中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个进一步在选自重组IL-23、重组IL-25、重组IL-27或重组IL-35的一种或多种调节细胞因子的存在下进行。

21.根据实施方案15-20中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个进一步在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

22.根据实施方案15-21中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在选自共刺激激动剂、免疫检查点抑制剂和热休克蛋白抑制剂的T细胞佐剂的存在下进行。

23.根据实施方案1-22中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。

24.根据实施方案1-23中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增中的所述至少一种重组细胞因子是或包括重组IL-2。

25.根据实施方案23或实施方案24所述的方法，其中重组IL-2的浓度是100IU/mL至6000IU/mL。

26.根据实施方案23-25中任一项所述的方法，其中重组IL-2的浓度是300IU/mL至6000IU/mL、300IU/mL至3000IU/mL或300IU/mL至1000IU/mL，任选地其中重组IL-2的浓度是为或约300IU/mL或者是为或约1000IU/mL。

27.根据实施方案1-26中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-23。

28.根据实施方案1-27中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-23。

29.根据实施方案27或实施方案28所述的方法，其中IL-23的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

30.根据实施方案1-29中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-25。

31.根据实施方案1-30中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-25。

32.根据实施方案30或实施方案31所述的方法，其中IL-25的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

33.根据实施方案1-32中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-27。

34.根据实施方案1-33中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-27。

35.根据实施方案33或实施方案34所述的方法，其中IL-25的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/mL或者为或约1000ng/mL。

36.根据实施方案1-35中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-35。

37.根据实施方案1-36中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在调节细胞因子的存在下进行，所述调节细胞因子是重组IL-35。

38.根据实施方案36或实施方案37所述的方法，其中IL-25的浓度是100ng/mL至2000ng/mL，任选地在为或约250ng/mL与1000ng/mL之间，如为或约250ng/mL、为或约500ng/

mL或者为或约1000ng/mL。

39.根据实施方案6、8-14和21-38中任一项所述的方法，其中所述第一次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

40.根据实施方案6、8-14和21-39中任一项所述的方法，其中所述第二次扩增在免疫抑制阻断剂的存在下进行。

41.根据实施方案6、8-14和21-40中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制存在于肿瘤微环境中的免疫抑制因子的活性。

42.根据实施方案41所述的方法，其中所述免疫抑制因子是TGFβ或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)。

43.根据实施方案6、8-14和21-42中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂降低或抑制TGFβ的活性。

44.根据实施方案6、8-14和21-43中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂是针对TGFβ的单克隆抗体，任选地非苏木单抗；针对TGFβ受体的抗体，任选地LY3022859；吡咯-咪唑聚酰胺药物；靶向TGFβ1或TGFβ2mRNA的反义RNA，任选地ISTH0036或ISTH0047；或者ATP-模拟物TβRI激酶抑制剂，任选地加尼舍替。

45.根据实施方案6、8-14和21-42中任一项所述的方法，其中所述免疫抑制阻断剂是IDO抑制剂。

46.根据实施方案45所述的方法，其中所述IDO抑制剂是PF-06840003、艾卡哚司他(INCB24360)、INCB23843、纳沃昔莫德(GDC-0919)、BMS-986205、伊马替尼或1-甲基-色氨酸。

47.根据实施方案7和14中任一项所述的方法，其中步骤(b)、(c)或(e)中的一个或多个在细胞凋亡抑制剂的存在下进行。

48.根据实施方案47所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂的浓度在为或约0.5μM与为或约100μM之间。

49.根据实施方案7和14-48中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂抑制胱天蛋白酶激活或活性。

50.根据实施方案7和14-49中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂抑制胱天蛋白酶2、胱天蛋白酶8、胱天蛋白酶9、胱天蛋白酶10、胱天蛋白酶3、胱天蛋白酶6或胱天蛋白酶7中的一种或多种。

51.根据实施方案7和14-50中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂选自恩利卡生(IDN-6556、PF-03491390)、NAIP(神经元凋亡抑制蛋白；BIRC1)、cIAP1和cIAP2(细胞凋亡抑制蛋白1和2；分别为BIRC2和BIRC3)、XIAP(X染色体结合IAP；BIRC4)、存活蛋白(BIRC5)、BRUCE(Apollon；BIRC6)、生存蛋白(BIRC7)和Ts-IAP(睾丸特异性IAP；BIRC8)、蟛蜞菊内酯、NS3694、NSCI和Z-氟甲基酮Z-VAD-FMK或其氟甲基酮变体。

52.根据实施方案7和14-51中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是抑制两种或更多种胱天蛋白酶的激活或活性的泛胱天蛋白酶抑制剂。

53.根据实施方案7和14-52中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂是Z-VAD-FMK、Z-FA-FMK、Z-VAD(OH)-FMK、Z-DEVD-FMK、Z-VAD(OM2)-FMK或Z-VDVAD-FMK。

54.根据实施方案7和14-53中任一项所述的方法，其中所述细胞凋亡抑制剂的浓

度在为或约0.5μM与为或约50μM之间、在为或约0.5μM与为或约25μM之间、在为或约0.5μM与为或约10μM之间、在为或约0.5μM与为或约5μM之间、在为或约0.5μM与为或约1μM之间、在为或约1μM与为或约100μM之间、在为或约1μM与为或约50μM之间、在为或约1μM与为或约25μM之间、在为或约1μM与为或约10μM之间、在为或约1μM与为或约5μM之间、在为或约5μM与为或约100μM之间、在为或约5μM与为或约50μM之间、在为或约5μM与为或约25μM之间、在为或约5μM与为或约10μM之间、在为或约10μM与为或约100μM之间、在为或约10μM与为或约50μM之间、在为或约10μM与为或约25μM之间、在为或约25μM与为或约100μM之间、在为或约25μM与为或约50μM之间或者在为或约50μM与为或约100μM之间，每个都包含端值。

55.根据实施方案7、实施方案14和实施方案22所述的方法，其中所述T细胞佐剂是共刺激激动剂，所述共刺激激动剂是肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)激动剂。

56.根据实施方案7、14、22或55所述的方法，其中所述共刺激激动剂是特异性结合TNFRSF成员的抗体或抗原结合片段，或者是包含TNFRSF成员的配体的细胞外结构域或其结合部分的融合蛋白。

57.根据实施方案56所述的方法，其中所述TNFRSF成员选自OX40、4-1BB、GITR和CD27。

58.根据实施方案55所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合OX40。

59.根据实施方案55或实施方案58所述的方法，其中所述共刺激激动剂是选自以下的抗体或抗原结合片段：他佛利珠单抗、泊加珠单抗、11D4、18D8、Hu119-122、Hu106-222、PF-04518600、GSK3174998、MEDI6469、BMS 986178或9B12，或者是其抗原结合片段。

60.根据实施方案59所述的方法，其中所述共刺激激动剂是他佛利珠单抗。

61.根据实施方案55所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合4-1BB。

62.根据实施方案55或实施方案61所述的方法，其中所述共刺激激动剂是乌瑞鲁单抗或乌托鲁单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

63.根据实施方案55所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合CD27。

64.根据实施方案55或实施方案63所述的方法，其中所述共刺激激动剂是伐立鲁单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

65.根据实施方案55所述的方法，其中所述共刺激激动剂特异性结合GITR。

66.根据实施方案55或实施方案65所述的方法，其中所述共刺激激动剂是MK-1248，或者是前述任一种的抗原结合片段。

67.根据实施方案55-66中任一项所述的方法，其中以如下浓度添加所述共刺激激动剂：在为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间以及在为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间，每个都包含端值。

68.根据实施方案7、实施方案14和实施方案22所述的方法，其中所述T细胞佐剂是检查点抑制剂。

69.根据实施方案68所述的方法，其中所述检查点抑制剂抑制选自以下的免疫检查点的活性：PD-1/PD-L1、CTLA-4、OX40、LAG-3、TIM-3和B7-H3。

70.根据实施方案68或实施方案69所述的方法，其中所述免疫检查点选自PD-1/PD-L1。

71.根据实施方案68、69或70所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗PD-1抗体，任选地其中所述抗体选自派姆单抗、西米普利单抗、纳武单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

72.根据实施方案70或实施方案71所述的方法，其中所述检查点抑制剂是派姆单抗。

73.根据实施方案68、69或70所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗PDL1抗体，任选地其中所述抗体选自阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗和阿特珠单抗，或者是前述任一种的抗原结合片段。

74.根据实施方案68、69或70所述的方法，其中所述免疫检查点是OX40。

75.根据实施方案74所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗OX40L抗体，任选地其中所述抗体是奥塞芦单抗或者是其抗原结合片段。

76.根据实施方案68、69或70所述的方法，其中所述免疫检查点是CTLA-4。

77.根据实施方案68、69或70所述的方法，其中所述检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体，任选地其中所述抗体是伊匹单抗或者是其抗原结合片段。

78.根据实施方案68-77中任一项所述的方法，其中以如下浓度添加所述检查点抑制剂：在为或约0.5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约0.5μg/mL与为或约1μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间、在为或约1μg/mL与为或约5μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约25μg/mL之间、在为或约5μg/mL与为或约10μg/mL之间以及在为或约10μg/mL与为或约25μg/mL之间，每个都包含端值。

79.根据实施方案7、14、22和55-78中任一项所述的方法，其中在用所述一种或多种重组细胞因子孵育期间连续添加所述T细胞佐剂，其中在所述孵育期间一次或多次补充或更换所述T细胞佐剂。

80.根据实施方案7、14、22和55-78中任一项所述的方法，其中在所述培养的一个或多个步骤期间瞬时添加所述T细胞佐剂，其中在培养的所述一个或多个步骤期间仅添加一次所述T细胞佐剂。

81.根据实施方案7、14、22和55-78中任一项所述的方法，其中在用所述一种或多种重组细胞因子孵育期间瞬时添加所述T细胞佐剂，其中在所述孵育期间仅添加一次所述T细胞佐剂。

82.根据实施方案1-81中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是有核细胞，如树突细胞、单核吞噬细胞、B淋巴细胞、内皮细胞或胸腺上皮细胞。

83.根据实施方案1-82中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞是树突细胞。

84.根据实施方案1-83中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞对于所述受试者是自体的，或者对于所述受试者是同种异体的。

85.根据实施方案1-84中任一项所述的方法，其中所述抗原呈递细胞

86.根据实施方案1-85中任一项所述的方法，其中所述T细胞对于所述受试者是自体的。

87.根据实施方案1-86中任一项所述的方法,其中所述一种或多种肽包含来自所述受试者的肿瘤相关抗原的至少一个新表位。

88.根据实施方案1-87中任一项所述的方法,其中在将来自所述第二T细胞群的细胞与所述APC一起孵育的步骤(c)之前,所述方法进一步包括如下步骤:

(a)通过对来自受试者的健康和肿瘤组织进行外显子组测序来鉴定与一种或多种肿瘤相关抗原相关的体细胞突变;以及

(b)鉴定所述一种或多种肿瘤相关抗原的至少一个新表位。

89.根据实施方案1-88中任一项所述的方法,其中所述MHC分子是I类分子。

90.根据实施方案1-89中任一项所述的方法,其中所述MHC分子是II类分子。

91.根据实施方案1-89中任一项所述的方法,其中所述MHC分子是MHC I类和II类。

92.根据实施方案1-91中任一项所述的方法,其中所述T细胞是CD4+细胞。

93.根据实施方案1-92中任一项所述的方法,其中所述T细胞是CD8+细胞。

94.根据实施方案1-93中任一项所述的方法,其中所述T细胞是CD4+细胞和CD8+细胞。

95.根据实施方案1-94中任一项所述的方法,其中所述一种或多种肽包括单独肽或肽池。

96.根据实施方案1-95中任一项所述的方法,其中已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的(APC)包括通过转染编码所述一种或多种肽的经体外转录合成的小基因构建体来加载抗原呈递细胞,任选地其中所述一种或多种肽以串联方式在每一侧侧接来自内源蛋白的12个氨基酸,其中所述经转录的小基因构建体产生单独肽。

97.根据实施方案1-95中任一项所述的方法,其中已经暴露于或接触一种或多种新抗原肽的(APC)通过肽脉冲,任选地通过电穿孔。

98.根据实施方案97所述的方法,其中所述一种或多种肽的长度各自单独地为5-30个氨基酸,任选地12-25个氨基酸,任选地为或约25个氨基酸。

99.根据实施方案97或实施方案98所述的方法,其中:

所述一种或多种肽是肽池,并且用于所述肽脉冲的所述肽池中肽的浓度在为或约0.001μg/mL与为或约40μg/mL、0.01μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约1μg/mL与为或约40μg/mL、为或约0.01μg/mL与为或约10μg/mL或者为或约1μg/mL与为或约10μg/mL之间;或者

所述一种或多种肽是单独肽,并且用于所述肽脉冲的单独肽的浓度在为或约0.00001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.00001μg/mL与为或约0.01μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL、为或约0.0001μg/mL与为或约0.1μg/mL或者为或约0.0001μg/mL与为或约0.01μg/mL之间。

100.根据实施方案97-99中任一项所述的方法,其中所述一种或多种肽中单独肽的浓度平均是为或约0.00001μg/mL至为或约0.01μg/mL。

101.根据实施方案97-100中任一项所述的方法,其中所述一种或多种肽中单独肽的浓度平均是为或约0.0001μg/mL至为或约0.001μg/mL。

102.根据实施方案1-101中任一项所述的方法,其中在步骤(c)中,抗原呈递细胞

与T细胞的比率在20:1与1:1之间、在15:1与1:1之间、在10:1与1:1之间、在5:1与1:1之间、在2.5:1与1:1之间、在1:20与1:1之间、在1:15与1:1之间、在1:10与1:1之间、在1:5与1:1之间或在1:2.5与1:1之间。

103.根据实施方案1-103中任一项所述的方法，其中在步骤(c)中，抗原呈递细胞与T细胞的比率是或是约1:1。

104.根据实施方案1-103中任一项所述的方法，其中(c)中的所述孵育持续2小时至24小时。

105.根据实施方案1-104中任一项所述的方法，其中(c)中的所述孵育持续为或约6小时。

106.根据实施方案1-100中任一项所述的方法，其中在步骤(d)中将T细胞与APC分离包括从所述共培养物富集对所述一种或多种肽具有反应性的肿瘤反应性T细胞群，其中富集肿瘤反应性T细胞包括选择对一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞。

107.根据实施方案106所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD137(4-1BB)、CD59、CD69、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258、CD256、PD-1、TIM-3和LAG-3。

108.根据实施方案106或实施方案107所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD38、CD39、CD6、CD90、CD134和CD137。

109.根据实施方案106-108中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物是CD134和/或CD137。

110.根据实施方案106-109中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107、CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90、CD38、CD30、CD154、CD252、CD134、CD258和CD256。

111.根据实施方案106-110中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物选自CD107a、CD39、CD103、CD59、CD90和CD38。

112.根据实施方案106-111中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物包括选自以下的至少两种标记物：CD107a和CD39、CD107a和CD103、CD107a和CD59、CD107a和CD90、CD107a和CD38、CD39和CD103、CD39和CD59、CD39和CD90、CD39和CD38、CD103和CD59、CD103和CD90、CD103和CD38、CD59和CD90、CD59和CD38以及CD90和CD38。

113.根据实施方案110-112中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物进一步包括CD137。

114.根据实施方案113所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物包括选自以下的至少两种标记物：CD107a和CD137、CD38和CD137、CD103和CD137、CD59和CD137、CD90和CD137以及CD38和CD137。

115.根据实施方案108-114中任一项所述的方法，其中所述一种或多种T细胞激活标记物进一步包括选自以下的至少一种标记物：PD-1、TIM-3和LAG-3。

116.根据实施方案106-115中任一项所述的方法，其中选择对所述一种或多种T细胞激活标记物呈表面阳性的T细胞是通过流式细胞术，任选地通过自动化高通量流式细胞术来进行，任选地通过FX500细胞分选仪或Miltenyi Tyto细胞分选仪。

117.根据实施方案116所述的方法，其中通过流式细胞术进行1轮、2轮、3轮或4轮

以富集来自所述样品的所述肿瘤反应性T细胞。

118.根据实施方案1-117中任一项所述的方法,其中所述方法的步骤中的一个或多个在封闭系统中进行。

119.根据实施方案1-118中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增持续7至21天,任选地7至14天。

120.根据实施方案1-119中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增是在封闭系统中。

121.根据实施方案1-120中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增是在透气性培养器皿中。

122.根据实施方案1-121中任一项所述的方法,其中所述第一次扩增使用生物反应器来进行。

123.根据实施方案1-122中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增持续7至21天,任选地7至14天。

124.根据实施方案1-123中任一项所述的方法,其中用所述一种或多种第二T细胞刺激剂进行的孵育是在封闭系统中。

125.根据实施方案1-124中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增是在透气性培养器皿中。

126.根据实施方案1-125中任一项所述的方法,其中所述第二次扩增使用生物反应器来进行。

127.根据实施方案1-126中任一项所述的方法,其中在所述第一次扩增开始后30天内进行收获。

128.根据实施方案1-128中任一项所述的方法,其中在所述第一次扩增开始后至多30天,任选地在所述培养开始后7至30天、7至20天、7至14天、7至10天、10至20天、10至14天或14至20天的时间点收获所述细胞。

129.根据实施方案1-128中任一项所述的方法,其中所述受试者展现出癌症。

130.根据实施方案1-129中任一项所述的方法,其中使用包含通过所述方法产生的经扩增的肿瘤反应性T细胞的组合物来治疗所述受试者的癌症。

131.根据实施方案1-131中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是上皮癌的肿瘤。

132.根据实施方案1-131中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是以下的肿瘤:黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌(CRC)、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

133.根据实施方案1-132中任一项所述的方法,其中所述肿瘤是以下的肿瘤:非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌,任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

134.根据实施方案1-133中任一项所述的方法,其中所述生物样品是外周血样品、淋巴结样品或肿瘤样品。

135.根据实施方案134所述的方法,其中所述生物样品是外周血样品,并且所述外周血样品是通过抽血或通过单采术来收集,任选地其中所述单采术是白细胞单采术。

136.根据实施方案135所述的方法,其中所述生物样品是淋巴结样品或肿瘤样品,

其中所述样品是通过针刺活检，任选地芯针活检或细针抽吸来收集。

137.根据实施方案1-136中任一项所述的方法，其中所述第一T细胞群包含肿瘤浸润淋巴细胞、淋巴的淋巴细胞或外周血单个核细胞。

138.根据实施方案1-137中任一项所述的方法，其中所述生物样品是肿瘤，并且包含T细胞的所述细胞群包含肿瘤浸润淋巴细胞。

139.根据实施方案1-138中任一项所述的方法，其中所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片。

140.根据实施方案139所述的方法，其中将所述一个或多个肿瘤碎片以约1个肿瘤碎片/2cm2接种，以供用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行孵育。

141.根据实施方案1-140中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是黑色素瘤。

142.根据实施方案1-138中任一项所述的方法，其中所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是通过对来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片进行匀浆化和/或酶促消化而处理得到的单细胞悬浮液。

143.根据实施方案1-138中任一项所述的方法，其中所述生物样品是经切除的肿瘤，并且所述第一T细胞群是通过对来自所述经切除的肿瘤的一个或多个肿瘤碎片进行匀浆化和酶促消化而处理得到的单细胞悬浮液。

144.根据实施方案142或实施方案143所述的方法，其中所述酶促消化是通过用胶原酶，任选地胶原酶IV或胶原酶I/II进行孵育。

145.根据实施方案142-144中任一项所述的方法，其中将所述第一T细胞群以约$5x10^5$至为或约$2x10^6$个总细胞/$2cm^2$接种，以供用所述一种或多种第一T细胞刺激剂进行孵育。

146.根据实施方案1-140和142-145中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是结直肠癌(CRC)。

147.根据实施方案1-146中任一项所述的方法，其中所述方法导致T细胞的倍数扩增或导致肿瘤反应性T细胞的倍数扩增，所述扩增倍数为至少或至少约2倍、至少或至少约5倍、至少或至少约10倍、至少或至少约25倍、至少或至少约50倍、至少或至少约100倍、至少或至少约250倍、至少或至少约500倍、至少或至少约1000倍或者更多倍。

148.根据实施方案1-147中任一项所述的方法，其中通过所述方法产生的所述肿瘤反应性细胞组合物能够在抗原特异性刺激后产生浓度大于或大于约30pg/mL，任选地大于或大于约60pg/mL的IFNγ。

149.根据实施方案1-148中任一项所述的方法，所述方法包括用冷冻保护剂配制所述经收获的细胞。

150.一种组合物，所述组合物包含通过根据实施方案1-144中任一项所述的方法产生的肿瘤反应性T细胞。

151.根据实施方案150所述的组合物，其中所述T细胞是CD3+T细胞，或者包括CD4+T细胞和/或CD8+T细胞。

152.根据实施方案150或实施方案151所述的组合物，其中所述T细胞包括CD4+T细胞和CD8+T细胞，其中CD8+T细胞与CD4+T细胞的比率在为或约1:100与为或约100:1之间、在为或约1:50与为或约50:1之间、在为或约1:25与为或约25:1之间、在为或约1:10与为或约

10:1之间、在为或约1:5与为或约5:1之间或者在为或约1:2.5与为或约2.5:1之间。

153.根据实施方案150-153中任一项所述的组合物，其中所述组合物中肿瘤反应性T细胞或对T细胞激活标记物呈表面阳性的总T细胞或其活细胞的数量在为或约$0.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$0.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$0.5x10^8$与为或约$1x10^8$之间、在$1x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在$1x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$1x10^8$与为或约$3.5x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$3.5x10^8$与为或约$8x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$8x10^8$与为或约$15x10^8$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$15x10^8$与为或约$60x10^8$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$30x10^9$之间、在为或约$60x10^8$与为或约$12x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$50x10^9$之间、在为或约$12x10^9$与为或约$30x10^9$之间或者在为或约$30x10^9$与为或约$60x10^9$之间，每个都包含端值。

154.根据实施方案150-153中任一项所述的组合物，所述组合物包含药学上可接受的赋形剂。

155.一种治疗方法，所述治疗方法包括将根据实施方案150-153中任一项的组合物施用至患有癌症的受试者。

156.根据实施方案155所述的方法，其中所述经施用的组合物的细胞对于所述受试者是自体的。

157.根据实施方案155或实施方案156所述的方法，其中治疗有效剂量是$1x10^9$与$10x10^9$之间的T细胞。

158.根据实施方案155-157中任一项所述的方法，其中所述癌症是上皮癌。

159.根据实施方案155-158中任一项所述的方法，其中所述癌症是黑色素瘤、肺鳞癌、肺腺癌、膀胱癌、肺小细胞癌、食道癌、结直肠癌、宫颈癌、头颈癌、胃癌或子宫癌。

160.根据实施方案155-159中任一项所述的方法，其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、CRC、卵巢癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆管癌、子宫内膜癌，任选地其中所述乳腺癌是HR+/Her2-乳腺癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2+乳腺癌。

VIII.实施例

[0677] 以下实施例被包括在内仅用于说明目的，并不旨在限制本发明的范围。

实施例1对获得肿瘤源T细胞群中的肿瘤处理方法的评估

[0678] 如下文所述处理来自患有结直肠癌(CRC)或黑色素瘤的患者的肿瘤，并且分析所得浸润T细胞群的细胞计数活力。

A.结直肠癌

[0679] 肿瘤来源自患有CRC的患者的原发性肿瘤，并且在HypoThermosol中在4℃下过夜运输。将肿瘤处理为碎片或单细胞悬浮液(SCS)培养物。

[0680] 对于碎片培养物，将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片，并且将每个1-8mm的碎片置于在含有5％人血清的Roswell Park Memorial Institute(RPMI)或无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)的存在下的培养器皿(透气性24孔培养板或常规6孔板)的孔中。培养基补充有300或6000IU/mL的重组IL-2，并且还含有10μg/ml的庆大霉素、根据制造商的建议在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ICSR，ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。维持并目视监测碎片培养物，直至在培养的大约第5天与第11天之间进行细胞计数。

[0681] 对于SCS培养物，也将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片。然后在存在或不存在1mg/ml或5mg/ml的消化肿瘤的酶的情况下，使用Miltenyi GentleMACS在封闭系统中将碎片匀浆化，所述酶是根据制造商的建议使用的来自Miltenyi人用肿瘤解离试剂盒(货号130-095-929)的酶混合剂、胶原酶I/II共混物(Nordmark，胶原酶NB 4G证明等级，货号：S1746503)或胶原酶IV(Worthington Biomedical，货号:LS004130)。将指定用于通过匀浆化和酶消化获得的SCS的碎片用酶混合剂或胶原酶孵育总计60分钟。在产生SCS后，立即在NC-200自动化细胞计数器(ChemoMetec)上进行细胞计数和活力评估。

[0682] 如图3A所示，与从CRC肿瘤碎片培养后获得的总活细胞相比，用酶促消化或不用酶促消化的SCS培养物产生的总活细胞(TVC)更多。图3B描绘了在酶的存在下通过匀浆化产生的碎片或SCS所产生的培养物中活细胞的百分比是类似的。

B.黑色素瘤

[0683] 肿瘤来源自患有黑色素瘤的患者的原发性肿瘤，并且在HypoThermosol中在4℃下过夜运输。以与上文所述类似地培养细胞。

[0684] 简而言之，对于碎片培养物，将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片，并且将每个1-8mm的碎片在含有5％人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基的存在下在透气性24孔培养板或常规6孔板的孔中培养，所述培养基补充有浓度为300IU/ml或6000IU/ml的重组IL-2。培养基还含有10μg/ml的庆大霉素以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。维持并目视监测碎片培养物，直至在培养的第5天与第9天之间进行细胞计数。

[0685] 为了产生SCS培养物，在存在或不存在酶的情况下使用Miltenyi GentleMACS将肿瘤碎片匀浆化，所述酶包括浓度为1mg/mL或5mg/mL的胶原酶IV或者浓度为1mg/mL或5mg/mL的胶原酶I/II共混物(Nordmark，胶原酶NB 4G证明等级，货号:S1746503)。如上，在产生SCS后立即使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)进行细胞计数和活力评估。

[0686] 图4A描绘了与通过匀浆化和用酶解离产生的SCS相比，由黑色素瘤肿瘤碎片产生的培养物产生的总活细胞更多。如图4B所示，无论酶促匀浆化如何，碎片培养物的活细胞百分比也高于来自SCS培养物的细胞。

实施例2对肿瘤源细胞的T细胞扩增动力学的评估

[0687] 如实施例1中所述处理肿瘤以产生直径为1-8mm的碎片或SCS培养物，然后将其在扩增存在于肿瘤内的T细胞群的条件下孵育。如下所述，在重组IL-2的存在下，在各种测试条件下使培养物生长以评估细胞扩增。所测试的条件包括培养板的类型、培养基和IL-2的

浓度对细胞扩增的影响。

A.培养条件

[0688] 通过来自患有CRC或黑色素瘤的供体患者的原发性肿瘤的匀浆化和酶消化获得单细胞悬浮液(SCS)。如实施例1中所述,将细胞在常规6孔板或透气性24孔培养板中培养。在可能的情况下,启动来自每名供体的多种条件并平均化(误差条表示±标准差)。对于6孔板,将细胞以250,000与1,000,000个细胞/mL之间接种,并且对于透气性24孔板,将细胞以5,000与750,000个细胞/mL之间接种。在两种情形中,将细胞接种于含有5%人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基中,所述培养基含有以300IU/mL或6000IU/mL的IL-2浓度补充的重组IL-2。培养基还含有10μg/ml的庆大霉素以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。将细胞孵育至多31天,通常是14至21天,其中在培养第5天开始,每隔一天更换50%的细胞培养基。

[0689] 对于从肿瘤碎片扩增,将如实施例1中所述从患有CRC或黑色素瘤的供体患者的原发性肿瘤获得的单独的1-8mm的肿瘤碎片置于透气性24孔培养板或6孔板的孔中,并且在含有5%人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基中进行培养,所述培养基含有以300IU/mL或6000IU/mL的浓度补充的重组IL-2。培养基还含有10μg/ml的庆大霉素以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。将细胞孵育至多31天,如通常是14至21天,其中在培养第5天开始,每隔一天更换50%的细胞培养基。

[0690] 对于所有条件,大约每隔一天使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)进行细胞计数,并且收集样品用于荧光激活的细胞分选(FACS)。在扩增期(例如第14天-第31天)完成后,将细胞在PBS中洗涤,然后在冷冻保护剂的存在下冷冻保存。冷冻保存使用CoolCell装置(Corning)或VIA Freeze(GE Healthcare)来进行。

B.结果

1.生长曲线

[0691] 在不同培养器皿中扩增培养后,从来自CRC供体患者的肿瘤碎片获得的SCS的扩增的生长曲线示于图5A和5B中。所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2在任一培养基类型中进行孵育的培养物,但是基于起始细胞的来源而分开。如所示,可以在这些条件下扩增来自CRC供体的肿瘤的SCS的肿瘤源细胞。在一些供体中,在直接从CRC肿瘤获得的细胞的此初始扩增期中观察到大于2倍甚至高达10倍或更大的扩增。

[0692] 评估与来自CRC肿瘤活检产物的肿瘤碎片相比从SCS实现的扩增。如图5C和5D所示,无论是作为碎片还是作为SCS提取和培养,都可以在这些条件下扩增来自CRC肿瘤的细胞。然而,通常,在作为SCS提取的CRC培养物中实现更大的扩增,如通过与培养经由碎片提取的细胞相比更高的总细胞数(图5C)和扩增倍数(图5D)所证实的。

[0693] 在不同培养器皿中扩增培养后来自不同黑色素瘤供体的作为经提取的肿瘤碎片或作为来自肿瘤碎片的SCS培养的细胞的扩增的生长曲线示于图6A和6B中。所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2在任一培养基类型中进行孵育的培养物,但是基于起始细胞的来源而分开。如所示,在任一培养器皿中在作为肿瘤碎片提取的黑色素瘤培养物中观察到显著扩增,而对于作为SCS培养的黑色素瘤细胞观察到较少的扩增。

[0694] 与先前的观察结果一致,无论肿瘤类型如何,来自某些供体的肿瘤细胞都不适合扩增。这表明供体之间的扩增潜力有固有变异性,此外同一供体肿瘤的肿瘤碎片之间有固

有变异性。在培养期间汇集来自供体患者的肿瘤碎片的更大规模的方法有望通过组合来自同一供体肿瘤的肿瘤碎片来减轻肿瘤内变异性。

2.按照细胞培养基的生长评估

[0695] 在扩增14天与21天之间之后,比较如上所述在含有5%人血清的RPMI培养基或血清替代物配制品(OpTmizer培养基)中产生的经扩增的培养物。所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2在任一类型的培养器皿中进行孵育的培养物,但是基于培养基的类型而分开。CRC肿瘤的结果来自从肿瘤碎片获得的SCS的培养物(图7A和7B),而黑色素瘤肿瘤的结果来自肿瘤碎片的培养物(图8A和8B)。

[0696] 对于两种肿瘤类型,通过在5%人血清或血清替代物培养基中培养两种肿瘤类型,都观察到总细胞数(图7A和图8A)和扩增倍数(图7B和图8B)的增加。在所测试的样品中,存在使用OpTmizer培养基改进扩增的趋势,如通过在初始扩增期结束时更高的总细胞数所证实的(图7A和图8A)。

3.IL-2浓度

[0697] 比较在来自不同肿瘤类型的扩增期间不同IL-2浓度的影响。将培养物如上所述在含有5%人血清的RPMI培养基或血清替代物配制品(OpTmizer培养基)中在300IU/mL或6000IU/mL重组IL-2中扩增14天与31天之间,如14天与21天之间。所示的结果来自在任一培养基类型的存在下在任一类型的培养器皿中孵育的培养物,但是基于IL-2浓度而分开。CRC肿瘤的结果来自从肿瘤碎片获得的SCS的培养物(图9A和9B),而黑色素瘤肿瘤的结果来自肿瘤碎片的培养物(图10A和10B)。

[0698] 对于两种肿瘤类型,结果表明在高或低浓度的IL-2中生长的细胞的扩增类似,如通过类似的扩增后总细胞数(图9A和图10A)以及扩增倍数(图9B和图10B)所证实的。这些数据支持如下观察结果,约300IU/mL的IL-2剂量支持扩增,并且对于CRC或黑色素瘤培养物,高剂量的IL-2(如6000IU/mL)并非是细胞扩增所必需的。

[0699] 综上所述,结果表明,虽然扩增可以是供体依赖性的,此外是肿瘤样品依赖性的,但在多名供体中,来自SCS培养物的CRC肿瘤浸润T细胞和来自碎片培养物的黑色素瘤浸润T细胞成功生长。类似地观察到,对于黑色素瘤源和CRC源两种T细胞培养物,在与较低剂量相比时,添加高浓度的IL-2没有导致明显不同的扩增反应。

实施例3对抗CD3刺激对肿瘤源细胞的扩增的影响的评估

[0700] 在存在或不存在50ng/mL OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)的情况下培养如实施例1和2中所述从黑色素瘤肿瘤碎片处理的细胞。在常规6孔板或透气性培养板中用RPMI或OpTmizer培养基将细胞培养进行14天与31天之间,如14天与21天之间。培养物还补充有300或6000IU/mL的重组IL-2、10μg/mL的庆大霉素以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。如先前所述,在培养第5天开始,每隔一天更换约50%的细胞培养基。然后使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)对细胞进行计数。

[0701] 所示的结果来自用300IU/mL或6000IU/mL两种浓度的重组IL-2、不同培养基在任一类型的培养器皿中进行孵育的培养物,但是基于抗CD3刺激的存在或不存在而分开。在存在或不存在抗CD3刺激的两种情况下测试来自供体6的细胞,并且在所有条件下展示出2-4倍扩增,其中在不存在抗CD3刺激的情况下(-OKT3)孵育的补充有300IU/mL IL-2的

OpTmizer培养基中观察到13倍扩增。图11A-11B所示的结果证明，经由OKT3抗体进行的CD3刺激支持T细胞扩增，但是没有显著影响总细胞数(图11A)或扩增倍数(图11B)。这些数据与如下发现一致，抗CD3刺激(例如经由OKT3抗体)可能并非是扩增来自肿瘤培养物的细胞所必需的。

实施例4对刺激后CD4+和CD8+激活标记物的评估

[0702] 将来自三名健康供体的T细胞解冻，在补充有300IU/mL重组IL-2的OpTmizer培养基中静置过夜，然后使用50ng/mL OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)激活。在3-48小时的时间过程中使用流式细胞术测量在CD4+和CD8+细胞群上激活的特异性标记物。具体而言，评估以下标记物：CD38和CD39(图12A和图13A)、CD134和CD137(图12B和图13B)以及CD69和CD90(图12C和图13C)。

[0703] $CD8_+$细胞表面上的激活标记物的表达结果示于图12A-12C中，其展示了与在不存在OKT3的情况下的培养相比，在用OKT3进行的CD3刺激后48小时内CD8+T细胞上的标记物的上调动力学。在一些情形中，可以在刺激前第0天见到标记物的某一基础水平。如所示，在此时间过程期间，所有评估的标记物都以一定程度上调，其中在此研究期间，对于标记物CD38(图12A)、CD134(图12B)和CD69(图12C)上调的细胞百分比最高。

[0704] CD4+细胞表面上的激活标记物的表达结果示于图13A-13C中，其展示了与在不存在OKT3的情况下的培养相比，在用OKT3进行的CD3刺激后前48小时内CD4+T细胞上的标记物的上调动力学。如所示，在此时间过程期间，所有评估的标记物都以一定程度上调，其中在此研究期间，对于标记物CD38(图13A)、CD137(图13B)和CD69(图13C)上调的细胞百分比最高。

[0705] 综上所述，这些数据支持，以上标记物的表达可以用作上调标记物以选择已经被激活的T细胞，包括在预期会刺激经由TCR-CD3复合物的信号传导的激活条件下，如在与呈递新抗原肽的抗原呈递细胞共培养后将发生的。

实施例5供体细胞表型和细胞活力的确定

[0706] T细胞来源自患有黑色素瘤或CRC的患者的原发性肿瘤，如实施例1中所述。如实施例1中所述，将来自肿瘤的细胞提取为肿瘤碎片或提取为SCS，然后通过流式细胞术评估T细胞表型。

[0707] 对于肿瘤碎片，将每个1-8mm的碎片置于培养器皿(透气性24孔培养板或常规6孔板)的孔中，并且在含有5％人血清的RPMI或无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)的存在下孵育5天与11天之间。培养基补充有300或6000IU/mL的重组IL-2，并且还含有10μg/ml的庆大霉素以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)。还用或不用50ng/mL的抗CD3抗体OKT3进行孵育。目视监测碎片培养物，直至确定可以进行细胞计数(通常在培养的第5天与第9天之间)，然后对细胞进行染色并通过流式细胞术分析T细胞标记物。

[0708] 可替代地，对于SCS培养物，将肿瘤切碎成直径为1-8mm的碎片，然后在存在或不存在1mg/ml或5mg/ml的胶原酶IV(Worthington Biomedical，货号:LS004130)或1mg/mL的胶原酶NB4G证明等级(Nordmark Biomedicals;目录号S1746503)的情况下匀浆化。在用酶孵育约90分钟之后，立即对细胞进行染色并通过流式细胞术分析T细胞标记物。

[0709] 用于流式细胞术分析的门控层次结构设计如下：首先，记录来自总细胞事件的亲

本群体的CD3+细胞的百分比，之后记录来自CD3+亲本群体的活CD4+细胞的百分比，接下来记录来自同一亲本CD3+群体的活CD8+细胞的百分比。然后基于相应CD4+和CD8+亲本群体来计算记忆T细胞群(Tem)。因此，从活CD4+细胞的亲本群体确定CD4/Tem，同时从活CD8+细胞的亲本群体确定CD8/Tem。因此，如图12所描绘的结果是所记录的来自总细胞事件的亲本群体的CD3+细胞的百分比，其在层次结构中按照占层次结构中相应亲本群体的百分比被分选为子群体。图14描绘了紧接在通过匀浆化和酶消化从示例性CRC供体(供体1)提取肿瘤碎片之后，单细胞悬浮液中对选择T细胞标记物呈阳性的活细胞的百分比。

[0710] 比较SCS样品中的CD3+细胞的百分比，所述SCS样品已经仅通过匀浆化来提取(无胶原酶)，或者通过在用低浓度胶原酶(1mg/mL)或高浓度胶原酶(5mg/mL)消化后匀浆化来提取。来自第二名CRC和黑色素瘤患者的结果分别示于图15A和图15B中。如图15A所示，结果证明在匀浆化和用低浓度胶原酶消化后，来自CRC供体的SCS中CD3+T细胞的回收增加。尽管来自黑色素瘤供体的SCS中CD3+细胞的百分比较低，但结果也证明，匀浆化和用低浓度胶原酶消化产生最高的CD3+T细胞百分比(图15B)。综上所述，这些观察结果证明，可以获得相对较高纯度的来自黑色素瘤肿瘤的SCS的细胞，并且可以支持SCS是黑色素瘤源CD3+细胞的可行来源。

[0711] 还评估从另外的示例性CRC供体的肿瘤提取的SCS中CD3+细胞的百分比。另外，在此同一供体中，将紧接在匀浆化和消化后的SCS中CD3+T细胞的百分比与以下进行比较：(1)在将SCS用300IU/mL IL-2(低)或6000IU/mL IL-2(高)培养6天后CD3+细胞的百分比，或者(2)在存在或不存在CD3刺激(OKT3抗体)的情况下将单独肿瘤碎片用300IU/mL IL-2(低)或6000IU/mL IL-2(高)培养长达6天后CD3+细胞的百分比。如图15C所示，基线(第0天)SCS中CD3细胞的百分比显著高于在将肿瘤碎片用IL-2或OKT3培养6天后获得的培养物中CD3+细胞的百分比。观察到来自两名另外的供体的肿瘤碎片的培养物的类似结果，其中当在各种评估条件下从CRC肿瘤碎片提取肿瘤细胞时，在将CRC源肿瘤碎片用IL-2和/或OKT3培养11天(图15D)或9天(图15E)后获得的培养物中CD3+细胞的百分比也大体上显示出低产量。这些结果与如下发现一致，来自CRC患者的肿瘤活检的SCS可以比从肿瘤碎片的培养物获得的细胞更能够提供增加数量的T细胞用于扩增。

[0712] 与来自CRC患者的肿瘤碎片的培养物的结果相比，图16表明，可以在各种条件下从黑色素瘤肿瘤碎片的培养物获得高百分比的CD3+T细胞，所述条件如低(300IU/mL)或高(6000IU/mL)浓度IL-2的存在、CD3刺激(OKT3)的存在或不存在或者不同培养基。图16所描绘的结果来自第0天培养物。这些结果与如下发现一致，来自黑色素瘤患者的肿瘤碎片的培养物可以比从肿瘤活检的SCS获得的细胞更能够提供增加数量的T细胞用于扩增。

实施例6对与抗原呈递细胞共培养后肿瘤源T细胞激活的定量

[0713] T细胞作为肿瘤碎片来源自患有黑色素瘤或CRC的患者的原发性肿瘤，如实施例1中所述。在补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、根据制造商的建议在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的无血清OpTmizer培养基(ThermoFisher)中培养5天后，用OpTmizer培养基洗涤肿瘤源细胞，之后以300xg离心5分钟并以$2x10^6$个细胞/mL悬浮。然后将细胞以10,000,000个细胞/孔接种至常规6孔培养板中。

[0714] 在平行培养中，从作为来源T细胞的获自同一患者的PBMC(自体的)分化出抗原呈

递树突细胞(DC)。从十倍体积的1X DPBS(Gibco)中的液氮储存物解冻从接受单采术的患者分离的冷冻PBMC的冷冻小瓶,并且进行计数(NucleoCounter NC200)。在洗涤后,立即将细胞根据制造商试剂盒说明书用于CD14微珠阳性选择(MACS Miltenyi)。对经纯化的CD14(单核细胞)细胞进行计数,使细胞重悬于DendriMACs(MACS Miltenyi)中并以0.5-2x10^6个细胞/mL的密度接种于适当培养烧瓶中。将GM-CSF(100ng/mL)和IL-4(20ng/mL)添加至培养物中,以促进分化为不成熟树突细胞。将单核细胞培养和分化总计5天,其中在第2天添加50%的培养基(等于培养基起始量的50%)。

[0715] 根据全外显子组测序和RNA测序为每名患者自体鉴定肿瘤特有的肽的编码转录物,如Parkhurst,Maria R.等人"Unique neoantigens arise from somatic mutations in patients with gastrointestinal cancers."Cancer discovery 9.8(2019):1022-1035中所述。对经速冻的、未经固定的肿瘤组织和正常外周血细胞(正常来源)进行患者样品的全外显子组测序(WES)。使用来自novocraft(http://www.novocraft.com/)的novoalign MPI针对人基因组构建物(build)hg19进行来自肿瘤与正常样品的序列的比对。使用Picard的MarkDuplicates工具标记重复。根据GATK最佳实践工作流程(https://www.broadinstitut e.org/gatk/)进行插入缺失重比对和碱基重校准。在数据清理后,使用samtools mpileup(http://samtools.sourceforge.net)和Varscan2(http://varscan.sourceforge.net)、SomaticSn iper(http://gmt.genome.wustl.edu/packages/somatic-sniper/)、Strelka(https://sites.google.com/site/strelkasomaticvariantcaller/)以及Mutect(https://www.broadinstitute.org/gatk/)创建pileup文件。使用GATK CombineVariants工具合并VCF文件,并且使用Annovar(http://annovar.openbioinformatics.org)进行注释。然后使用Annovar(http://annovar.openbioinfo rmatics.org)注释存在于患者肿瘤中的变体(突变)。

[0716] 使用以下过滤器来产生推定突变的初始列表以供评价:(1)肿瘤和正常覆盖度大于10,(2)变体等位基因频率(VAF)为7%或以上,(3)变体读段计数为4或以上,以及(4)四个调用程序中的两个鉴定到突变。对于插入和缺失,除了鉴定到突变的仅单个调用程序需要通过过滤器之外,均使用相同截止值,因为这些只被varscan和strelka调用。针对通过四个过滤器的那些变体产生与连接至由单核苷酸变体(SNV)(N聚体)上游和下游区域编码的12个氨基酸的突变残基对应的氨基酸序列的表格。对于移码转录物,翻译序列直至在正常编码区中或在3'非翻译区中产生终止密码子。然后使用允许将映射比对可视化的综合基因组学查看器(IGV,Broad Institute)来进行变体调用的人工策展。在人工策展揭示得自在编码N聚体的转录物内存在的另外的体细胞变体或种系变体的非同义变化时,对N聚体的序列进行改变。标记从含有映射至不同读段中的不同位置的多个错配核苷酸、插入/缺失的读段推断的变体以及对应于频繁SNP的变体以供去除。

[0717] 标记在超过一名患者的肿瘤中但在少于2.5%的总肿瘤中检测到的变体,但是其被包括在通过的变体列表中。仅在ENSEMBL数据库中注释的变体转录物通常代表未经证实的编码区并且也被去除。标记为已知单核苷酸多态性或存在于多个肿瘤中的变体不会被自动去除,但是使用IGV进一步评价,因为去除潜在假阳性物(其不可能编码由T细胞识别的产物)不如去除可能代表假阴性物的候选物重要。

[0718] 然后使用这些测序数据来产生肽池,其代表与肿瘤相关的经突变的肽和与未患病

外周血细胞相关的野生型肽。

[0719] 合成肽是经由Fmoc化学来合成的。对于插入缺失，基于移码序列的翻译合成重叠10个氨基酸的25个氨基酸的肽，直至下一终止密码子。在一些情形中，合成最小表位的肽。将肽溶解于DMSO中并以等体积混合。

[0720] 经分化的DC加载有不同数量和浓度的来自如上所述鉴定的肽池的肽，之后将它们以几种比率的肿瘤细胞:DC添加至肿瘤源培养物中。然后将DC和肿瘤源细胞在37℃下在5％CO_2下共培养6小时，之后温和地搅动培养物并回收悬浮液中的细胞。然后经由流式细胞术针对经激活的T细胞使用T细胞激活标记物4-1BB和OX40来分选经回收的细胞。

[0721] 图17A和17B示出了在20至0.1ng/mL的肽范围内肿瘤源T细胞的激活。如图17A所示，T细胞与加载有所测试三种肽浓度中的每一种的DC的共培养产生可易于检测水平的4-1BB/OX40+T细胞，包括在1ng/mL肽下高至大约80％。相比于与未经加载的DC一起培养的细胞T细胞激活标记物表达的增加示于图17B中，其中0.1ng/mL肽导致最大Δ，但是所有三种肽浓度都导致正倍数变化。这些数据证明，低于20ng/mL的较低肽浓度可以导致共培养后T细胞激活标记物(上调标记物)的上调增加。

[0722] 图18类似地描绘了在研究中随41BB/OX40表达变化的肿瘤源T细胞激活，其中用一种或两种肽脉冲DC以在共培养期间进行表面呈递。如图18A所示以及图18B作为倍数变化所示，加载有仅一种肽的DC在激活共培养物中的T细胞方面更显著地更有效。

[0723] 如图19所示，在将肿瘤源T细胞与DC以1:2的比率(T细胞:DC)共培养时，与1:1相比，T细胞激活标记物41BB和OX40显著上调。

实施例7经由细胞分选对经激活的T细胞的富集和回收

[0724] 通过基于免疫亲和力的选择来分离来自健康供体的T细胞，然后将其冷冻保存。将T细胞解冻并静置过夜，然后用50ng/mL OKT3激活24-48小时，之后用抗CD4 FITC(BD)、抗CD8 PerCPCy.5.5(BD)、抗CD134(Beckman Couleter)和抗CD137(MACs Miltenyi)进行染色。使细胞达到大约$20x10^6$个细胞/mL的浓度，并且使用BD FACSAriaII以大约15,000个事件/秒的分选速率进行分选。在表达CD134、CD137或CD134和CD137两者的细胞周围绘制门，并且将其分选为单个群体。这是阳性分选的群体。将缺少CD134和CD137两者表达的细胞分选为单独群体。这是阴性分选的群体。在分选后，在替代流式细胞仪上分析来自阳性和阴性分选群体以及未经分选的群体的细胞，以验证纯度并评估回收率。

[0725] 如图20所示，将未经分选的肿瘤源T细胞群(分选前)与阳性分选群体进行比较，如先前在实施例6中所述在与加载突变型肽的自体树突细胞共培养后收集所述阳性分选群体并将其分选为41BB/OX40阳性群体。观察到，此门控策略导致三名供体的针对反应性TCR百分比的增加的富集(图20A)和增加的平均I类反应性(图20B)。

[0726] 来自细胞分选的总细胞回收相对于总细胞输入示于图21A中。在图21B中类似地见到，来自两次独立运行的回收百分比是大约80％。结果证明，在选择和分选对上调标记物呈阳性的细胞之后，可以获得高细胞回收。

[0727] 图22描绘了经由用OKT3激活并如上所述染色的健康供体T细胞的流式细胞术得出的CD4+群体纯度。首先基于CD4+对细胞进行门控，然后接下来对表达最高强度的CD134+的群体进行门控，并且所展示的输出显示CD4+相比于CD8+以及CD137+相比于CD134+。这些数据支持使用这些标记物对肿瘤浸润T细胞的高纯度群体进行门控。

实施例8经激活的肿瘤源T细胞的分选后扩增

[0728] 如实施例1中所述处理来源自原发性CRC肿瘤的T细胞，然后使用如实施例6中所述的方法与呈递肽的树突细胞共培养。简而言之，将经分离的肿瘤浸润淋巴细胞与自体DC一起培养，所述DC经加载以表达与健康组织相关的肽(野生型，WT)、与肿瘤组织相关的肽(突变体)，或根本不加载肽(无肽)。将T细胞的对照子群体在没有DC的情况下培养(未经激活)。在共培养后，经由荧光启用的Sony FX500基于激活标记物4-1BB和OX40的表面表达分选细胞。

[0729] 然后将细胞以250,000-1,000,000个细胞/cm2接种至透气性24孔培养板中的补充有浓度为300IU/mL的重组IL-2、10μg/mL的庆大霉素和2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的无血清OpTmizer培养基中。将细胞孵育总计7天，其中在培养第5天开始，每隔一天更换50％培养基。在培养中的每一天，使用NC-200自动化细胞计数器(Chemometec)进行细胞计数。

[0730] 如图23A所示以及图23B作为扩增倍数所示，所测试的每个肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)T细胞群在培养第3天与第5天之间经历可测量的扩增，并且在7天培养期结束时走向继续向上。与加载有突变型肿瘤相关肽的DC一起培养的肿瘤浸润T细胞在实验过程中达到最高总细胞数。

[0731] 使用以上数据，创建图23C所示的理论数学模型以预测在分选后回收的细胞数与在扩增期后存在于培养物中的预期细胞数之间的关系。

实施例9对肿瘤源T细胞的离体扩增进行蒙特卡罗建模

[0732] 作为对实施例8中确定性点分析的补充，设计第一次概率性蒙特卡罗模拟来预测由如实施例2中所述的第一次扩增产生的肿瘤浸润淋巴细胞的数量。通过代入固有不确定性、回收效率和扩增倍数能力中的两种因素的概率分布来运行在提取和第一次扩增后可能的总存活和总反应性T细胞数的蒙特卡罗模拟。将结果作为正态分布迭代计算数万次，其中针对低和中回收定义所回收细胞的平均值，并且针对低、中和高扩增潜力定义扩增中倍数变化的平均值。然后计算总活T细胞数以及总反应性T细胞的分布。

[0733] 对于初始蒙特卡罗模拟(其中计算第一次扩增的可能T细胞输出)，运行测试案例以模拟低回收/低扩增、中回收/低扩增、中回收/中扩增和中回收/高扩增条件。回收和扩增两个变量的平均值和标准差的值分配如下：(1)低回收定义为培养来自经处理的肿瘤的总计2千万个活细胞，标准差为6百万；(2)中回收定义为5千万或6千万个细胞，标准差为1千5百万；(3)低第一扩增倍数定义为50倍，标准差为11；(4)中扩增定义为75倍，标准差为15；并且(5)高扩增定义为500倍，标准差为160。

[0734] 来自第一次蒙特卡罗模拟的每个测试案例的数据展示于下表E1中。

表E1：第一次扩增的蒙特卡罗模拟

		总活肿瘤浸润T细胞		*总反应性肿瘤浸润T细胞*
测试条件	**假设**	**统计学**	**预测值**	**预测值**
低回收/低扩增	平均值 =20 标准差 =6 平均值 =50 标准差 =11	平均值	1.99×10^7	1.59×10^6
		中值	1.99×10^7	1.51×10^6
		概率分布（第10-第90百分位数）	1.22×10^7 – 2.76×10^7	7.48×10^5 – 2.53×10^6
中回收/低扩增	平均值 =50 标准差 =15 平均值 =50 标准差 =11	平均值	4.99×10^7	3.99×10^6
		中值	5.00×10^7	3.81×10^6
		概率分布（第10-第90百分位数）	3.05×10^7 – 6.93×10^7	1.85×10^6 – 6.34×10^6
中回收/中扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =75 标准差 =15	平均值	6.00×10^7	4.81×10^6
		中值	5.99×10^7	4.63×10^6
		概率分布（第10-第90百分位数）	4.07×10^7 – 7.91×10^7	4.07×10^7 – 7.91×10^7
中回收/高扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =500 标准差 =160	平均值	4.78×10^7	5.99×10^7
		中值	4.60×10^7	6.00×10^7
		概率分布（第10-第90百分位数）	4.07×10^7 – 7.94×10^7	2.43×10^6 – 7.40×10^6

[0735] 使用这些数据，设计第二组蒙特卡罗模拟以预测在如实施例8中所述与APC共培养、经由流式细胞术分选以及第二次扩增后，反应性肿瘤浸润淋巴细胞的最终数量。将存在于从肿瘤碎片或SCS培养的总T细胞群中的反应性T细胞的百分比的固定值分配为平均值为8％并且标准差为2.50。在数万次迭代计算后，来自第二次蒙特卡罗模拟的每个测试案例的数据描绘于下表E2中。

表E2：第二次也是最后一次扩增的蒙特卡罗模拟			
		总反应性肿瘤浸润T细胞	
测试条件	假设	统计学	预测值
低回收/低扩增	平均值 =20 标准差 =6 平均值 =50 标准差 =11	平均值	7.96×10^7
		中值	7.34×10^7
		概率分布（第10-第90百分位数）	3.41×10^7 – 1.34×10^8
中回收/低扩增	平均值 =50 标准差 =15 平均值 =50 标准差 =11	平均值	2.00×10^8
		中值	1.85×10^8
		概率分布（第10-第90百分位数）	8.44×10^7 – 3.33×10^8
中回收/中扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =75 标准差 =15	平均值	3.61×10^8
		中值	3.39×10^8
		概率分布（第10-第90百分位数）	1.68×10^8 – 5.80×10^8
中回收/高扩增	平均值 =60 标准差 =15 平均值 =500 标准差 =160	平均值	2.39×10^9
		中值	2.19×10^9
		概率分布（第10-第90百分位数）	9.57×10^8 – 4.06×10^9

[0736] 来自在肿瘤处理后第一次扩增或来自在与APC下游共培养后第二次扩增的肿瘤浸润反应性T细胞的回收和扩增潜力是在供体之间和肿瘤细胞群内固有可变的因素。通过这里所述的过程产生的T细胞数的预期范围包含在第10和第90百分位数内。低于第10百分位数的细胞数不可能被产生，并且将可能不会产生可用的药品。因此，来自表E1和E2中的蒙特卡罗模拟的观察结果支持，在第10与第90百分位数之间的所有情况下，在给定关于扩增潜力的一定范围的变异性水平的情况下，本文所述方法将可能提供稳健的接近于治疗性给药所需的细胞数的T细胞输出。

实施例10按照IFN-γ产生和TCR克隆性对肿瘤反应性TCR富集的评估

[0737] 如实施例1中所述，从肿瘤碎片处理来源自患有卵巢癌(样品A)、CRC(样品B)或黑色素瘤(样品C)的患者的原发性肿瘤的T细胞。在初始扩增后，然后使用基本上如实施例6中所述的方法将T细胞与呈递肽的自体树突细胞共培养6小时。对于共培养，自体DC加载有对于患者肿瘤独特的突变型单一长肽(例如25聚体)或与来自患者的正常样品相比未突变的野生型单一长肽。在共培养后，通过针对4-1BB(CD137)和/或OX40(CD134)的表达对细胞进行染色并通过荧光激活的细胞分选(FACS)分选细胞来富集肿瘤反应性T细胞。收集对41BB和OX40中的任一种或两种呈阳性的细胞作为“阳性”群体(也称为“突变型经富集的”群体)，并且收集对41BB和OX40呈双阴性的细胞作为“阴性”群体(也称为“野生型未经富集的”群体)。

[0738] 然后将突变型和野生型T细胞群在仅培养基中或在刺激IFN-γ分泌的条件下培养16小时。包括来自尚未基于41BB和OX40表达进行分选的共培养物的未经分选的、未经富集

的T细胞(大量T细胞)作为选择前对照并类似地进行刺激。收集培养上清液,并且通过ELISA确定IFN-γ分泌水平。

[0739] 通过单细胞TCR测序来确定经分选的群体中表达对肽新表位具有反应性的TCR的T细胞的百分比。还通过对TCR-β和TCR-α链的单细胞RNA测序来确定T细胞群中的TCR克隆性。

1.样品A(卵巢癌)

[0740] 将从样品A肿瘤细胞产生的突变型和野生型经富集的T细胞群或对照大量T细胞在仅培养基中培养16小时,或者通过用抗CD28和抗CD49d抗体以及对应于突变型肽的最小肽表位(8聚体)(新表位)或来自相应患者肿瘤的野生型肽培养来进行刺激。如图24A所示,与仅培养基相比,在用新表位培养后,大量T细胞展现出改进的反应性,如通过增加的IFN-γ分泌所证实的。在用新表位刺激的突变型经富集的T细胞群中,产生IFN-γ的能力进一步增加,但是在仅培养基中刺激与用新表位条件刺激后,在野生型经富集的T细胞群中没有观察到差异。另外,野生型未经富集的T细胞群仍包括一定程度的新抗原反应性T细胞,如通过与仅培养基相比,其对IFN-γ分泌的上调所证实的。此数据表明,在共培养后,大量T细胞含有新抗原反应性群体,将其通过基于41BB和OX40的表达进行分选来富集。此外,结果也证明了新抗原富集的特异性。

[0741] 通过RNA测序和流式细胞术对新表位特异性TCR的分析显示出在突变型经富集的T细胞群中TCR“A”新抗原特异性TCR的富集,其具有17%新抗原特异性TCR,与之相比,在初始大量T细胞群中为2%,或者在野生型经富集的T细胞群中为0.1%(图24B)。与经选择的群体(突变型经富集的T细胞群)相比未经选择的群体(野生型经富集的T细胞群)中T细胞的TCR克隆性示于图24C中,其表明在未经分选的T细胞群中引进的TCR多样性高,并且在经选择的群体中实现独特TCR克隆的富集。图24D证明,分选之前(大量)和之后的细胞群含有CD4和CD8细胞,表明I类和II类反应性细胞存在于经富集的群体中。

2.样品B(CRC患者)

[0742] 将从样品B肿瘤细胞产生的突变型和野生型经富集的T细胞群或对照大量T细胞在仅培养基中培养16小时,或者响应于使用抗CD3抗体(OKT3)的一般TCR刺激加以刺激。如图25A所示,所有T细胞群都在共培养和分选后响应于一般TCR刺激展示功能性(即IFNγ产生)。

[0743] 对新表位特异性TCR的分析显示出新抗原“B”特异性TCR在突变型经富集的T细胞群中的富集,其具有71%新抗原特异性TCR,与之相比,在初始大量T细胞群中为42%,或者在野生型经富集的T细胞群中为17%(图25B)。与共培养后的大量T细胞相比,这代表在经分选的T细胞群中肿瘤反应性T细胞的接近1.7倍富集,以及在未经分选的T细胞群中肿瘤反应性T细胞的接近2.5倍减少。与经选择的群体(突变型经富集的T细胞群)相比未经选择的群体(野生型经富集的T细胞群)中T细胞的TCR克隆性示于图25C中,其表明在未经分选的T细胞群中引进的TCR多样性高(807种独特TCR克隆),并且在经选择的群体中实现独特TCR克隆的富集(64种独特TCR克隆)。图25D证明,分选之前(大量)和之后的细胞群含有CD4和CD8细胞,表明I类和II类反应性细胞存在于经富集的群体中。

3.样品C(黑色素瘤患者)

[0744] 通过RNA测序以及流式细胞术和TCR克隆性评估从样品C肿瘤细胞产生的突变型和野生型经富集的T细胞群或对照大量T细胞中的T细胞的新表位特异性TCR。结果显示出新抗

原“C”特异性TCR在突变型经富集的T细胞群中的富集，其具有33％新抗原特异性TCR，与之相比，在初始大量T细胞群中为5％，或者在野生型经富集的T细胞群中为4％(图26A)。与共培养后的大量T细胞相比，这代表在经分选的T细胞群中肿瘤反应性T细胞的接近7倍富集，以及在未经分选的T细胞群中肿瘤反应性T细胞没有富集。与经选择的群体(突变型经富集的T细胞群)相比未经选择的群体(野生型经富集的T细胞群)中T细胞的TCR克隆性示于图26B中，其表明在未经分选的T细胞群中引进的TCR多样性高(182种独特TCR克隆)，并且在经选择的群体中实现独特TCR克隆的富集(15种独特TCR克隆)。图26C证明，分选之前(大量)和之后的细胞群含有CD4和CD8细胞，表明I类和II类反应性细胞存在于经富集的群体中。

4.结论

[0745] 综上所述，结果表明，在未经分选的T细胞群中引进的TCR多样性高(例如100-900种TCR)。此未经分选的群体产生低水平的IFNγ(例如5-25pg/mL)。在基于激活标记物(例如OX40/41BB)分选TCR群体后，TCR群体富集TCR的反应性群体(例如15-64种TCR)，其产生的IFNγ(例如65.3-98.6pg/mL)高于TCR的未经分选的和阴性分选群体(5pg/mL)。结果表明，这是与肿瘤反应性T细胞的富集一致的特异性激活，因为在野生型未经分选的共培养物中没有见到所述激活。

实施例11对T细胞佐剂对T细胞活力的影响的评估

[0746] 从PBMC扩增细胞，所述PBMC源自来自三名健康供体的单采术材料的Ficoll梯度分离。将PBMC以$2x10^6$个细胞/ml接种于补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中，并且用人抗CD3抗体OKT3抗体激活48小时。因为所述研究在健康供体中进行，所以用抗CD3(OKT3)刺激进行对T细胞的刺激以模拟存在于肿瘤微环境(TME)中的条件。

[0747] 接下来将细胞接种至透气性100M培养器皿中并扩增7-14天，以达到大型T细胞库，并且将其冷冻保存。将来自三名健康供体的先前扩增的人T细胞解冻，然后与一系列浓度的测试佐剂一起接种至96孔培养板中的补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中，至$5x10^5$个细胞/mL的最终细胞密度。一半孔另外补充有50ng/mL OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)。在存在和不存在抗CD3激活的情况下总计测试15种测试佐剂对细胞活力的影响(参见表E3)。将细胞培养总计6天，包括在培养第3天更换50％培养基，并且监测总活CD3+细胞计数。

表E3：高通量筛选中使用的化合物和浓度	
化合物	浓度
抗体	
他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、派姆单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248	0.625 μg/mL - 10 μg/mL
FasL（人抗FasL抗体）	0.625 μg/mL - 10 μg/mL
小分子抑制剂	
Z-VAD-FMK	1.5625 μM - 25 μM
NVP-HSP990	15.625 nM-250 nM
细胞因子	
IL-7	62.5 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-15	62.5 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-21	62.5 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-23	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-25	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-27	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-35	62.5 ng/ml – 1000 ng/ml
DMSO（对照）	*0% - 1% v/v*

[0748] 在不存在和存在OKT3刺激的情况下生长的细胞的总活CD3+细胞计数分别示于图27A-C以及图28A-C中。所示的结果是关于以下浓度的佐剂：10μg/mL的测试抗体(他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、派姆单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248、抗人FasL)；25μM的Z-VAD-FMK泛胱天蛋白酶抑制剂；250nM的HSP抑制剂NVP-HSP990；以及1000IU/mL的细胞因子(IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、IL-25、IL-27或IL-35)。

[0749] 总得来说，对于所测试的任何化合物都没有观察到毒性，表明这些化合物对TIL制造无害。虽然观察到固有的供体变异性，但无论激活状态如何，用抗PD1抗体派姆单抗、抗OX40L抗体奥塞芦单抗和泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK处理都导致始终高于DMSO处理对照的活细胞计数。

[0750] 分别在图29A和图29B所示的IL-7和IL-15的剂量反应曲线显示出剂量依赖性反应，其中细胞数随浓度递增而增加。这些数据支持，此测试浓度范围的IL-7和IL-15对于在培养期间增强总T细胞数可能是有益的。

实施例12在Fas配体或胱天蛋白酶抑制情况下的T细胞扩增

[0751] 评估针对Fas和胱天蛋白酶介导的途径的细胞凋亡抑制剂以确定在制造期间对肿瘤反应性T细胞的影响。所述研究在健康供体中进行，因此用抗CD3(OKT3)或抗CD3/抗CD28刺激进行对T细胞的刺激以模拟存在于肿瘤微环境(TME)中的条件。如可以通过抗CD3或抗CD3/抗CD28激活来刺激的存在于肿瘤微环境中的恒定激活信号可能对T细胞生长是有害的。使用细胞活力和预计细胞数来比较在瞬时和连续激活两种测定中调节细胞凋亡途径的

影响,其中后一种测定更接近地重演肿瘤微环境。

A.抗CD3刺激

[0752] 将来自三名健康供体的PBMC解冻,并且用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5%的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤。然后将细胞以2.14x10^5个细胞/mL(7.5x10^5个细胞/cm^2)的密度接种至24孔透气性细胞培养板中。将细胞使用50ng/ml OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)激活48小时,并且另外用如下所述的药剂处理。

[0753] 将培养孔分配给五个处理组之一,如下:(1)无抑制剂培养对照,其仅含有如所述的细胞培养基,没有另外的细胞凋亡调节剂;(2)仅在培养第0天将2μM泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK添加至培养基中(瞬时);(3)在培养第0天添加2μM泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK,并且另外在每次更换培养基时以相同浓度补充所述抑制剂(连续);(4)仅在第0天将500ng/ml的Fas配体(FasL)阻断抗体NOK-1(BioLegend)添加至培养基性(瞬时);或者(5)仅在第0天将500ng/ml的Fas配体(FasL)阻断抗体NOK-1(BioLegend)添加至培养基中,并且另外在每次更换培养基时补充所述阻断抗体(连续抑制)。

[0754] 将培养物维持至少13天,其中在培养第2天开始,每隔一天更换50%培养基。每隔一天监测细胞计数和活力。在细胞达到3x10^6个细胞/ml时,将1.5x10^6个细胞传代培养至24孔透气性培养板的含有7mL终体积培养基的新孔中,并且如上所述继续培养。

[0755] 三名供体中每一名的总细胞数和细胞活力示于图30A-30B(供体1)、图31A-31B(供体2)和图32A-32B(供体3)中。在整个培养期中对于所有处理条件,活力都保持较高,然而具有连续FasL阻断的条件显示出名义上低于其他条件的活力。在所有供体中,这些细胞也都生长得最慢,并且其生长在任何其他条件之前达到稳定期。在培养基中持续存在胱天蛋白酶抑制剂的细胞培养在供体之间显示出最大的细胞生长,而对照和瞬时处理条件类似地生长。用FasL阻断抗体NOK-1瞬时处理也导致显著的T细胞扩增。

[0756] 这些结果表明,胱天蛋白酶抑制剂的使用在TIL制造的扩增步骤期间可以用于使扩增最大化并维持活力,特别是在高密度培养物中。在其他细胞类型(尤其是肿瘤细胞)的存在下进行T细胞激活、共培养或处理期间瞬时使用FasL阻断也可以用于在促凋亡环境中阻断Fas信号传导。

B.抗CD3/抗CD28刺激

[0757] 将来自两名健康供体的PBMC解冻,并且用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5%的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤。然后将细胞以1.5x10^5个细胞/mL(5.0x10^5个细胞/cm^2)的密度接种至24孔透气性细胞培养板中。

[0758] 将培养孔分配给两个处理组(瞬时或连续激活)之一。对于瞬时激活,在培养第0天开始,将抗CD3/抗CD28顺磁珠(Dyanbeads™)以每个细胞1个珠的比率添加至培养基中,然后在第2天更换培养基期间去除。对于连续激活,在培养第0天开始,将抗CD3/抗CD28顺磁珠(Dyanbeads™)以每个细胞1个珠的比率添加至培养基中,然后在第4天再次添加,并且在第6天以每个细胞1个珠的比率再次添加。在第2天、第4天或第6天不去除抗CD3/抗CD28顺磁珠。

[0759] 对于连续和瞬时激活两者，将培养孔分配给如上所述的五个处理组之一，每名供体总计10种条件。

[0760] 每隔一天监测细胞计数和活力。在细胞达到$3x10^6$个细胞/ml时，将$1.5x10^6$个细胞传代培养至24孔透气性培养板的含有7mL终体积培养基的新孔中，并且如上所述继续培养。

[0761] 用抗CD3/抗CD28单次激活(瞬时激活)的处理组的细胞活力示于图33A(供体1)和图33B(供体2)中，并且相同处理的总细胞数分别示于图34A(供体1)和图34B(供体2)中。虽然观察到固有的供体变异性，但对于暴露于瞬时激活(单次激活)刺激的所有处理条件，活力都保持较高。对于所有处理组，活力都保持较高，除了具有连续FasL阻断的条件的处理组，其中活力和总活细胞数两者都随时间下降(图33A-B)。

[0762] 用抗CD3/抗CD28连续激活的处理组的细胞活力示于图35A(供体1)和图35B(供体2)中，并且相同处理的总细胞数示于图36A(供体1)和图36B(供体2)中。.在暴露于用抗CD3/抗CD28的连续激活(模拟天然肿瘤微环境)时，处理条件之间总活细胞数和活力两者的差异大于仅涉及瞬时激活事件的条件。在经连续激活的群体中，似乎暴露于胱天蛋白酶抑制剂(瞬时和连续两种情况)的细胞胜过其他条件，其中连续胱天蛋白酶抑制胜过瞬时条件。另外，暴露于FasL阻断的细胞显示出总细胞数和活力两者的最大下降，而瞬时暴露于FasL阻断且没有另外的处理的细胞的表现类似。

[0763] 这些结果表明，在培养期间使用胱天蛋白酶抑制可以改进细胞在可能对正常T细胞生长不利的环境中表现的能力，如在直接从肿瘤处理细胞时，所述肿瘤可以与此测定系统类似地组成型地呈递激活信号。这些结果还表明，连续阻断FasL信号传导可能在瞬时和连续T细胞激活的两种条件下对T细胞生长有害，并且对FasL的阻断在瞬时提供时不会如此强地影响T细胞生长。

实施例13对肿瘤处理中胱天蛋白酶抑制的评估

[0764] 如实施例1中所述使用胶原酶I/II共混物(Nordmark，胶原酶NB 4G证明等级，货号:S1746503)处理来自供体的CRC肿瘤，以产生碎片或SCS培养物。在透气性24孔培养板中使用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer培养基中维持肿瘤碎片和SCS培养物两者。一半培养物含有另外补充有2μM泛胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK的培养基，其是在每次更换培养基时进行补充。将培养物在约37℃下孵育最少18天，其中在培养第5天后每2-3天进行50％培养基更换。在第5天以及在每次更换培养基时使用NC-200自动化细胞计数器(ChemoMetec)进行细胞计数。

[0765] 图37A-C示出了在存在或不存在Z-VAD-FMK的情况下生长的SCS和肿瘤碎片两种来源的培养物的扩增倍数(图37A)、总活细胞(图37B)和活力百分比(图37C)。图37A和图37B证明，细胞的长出在含有泛胱天蛋白酶抑制剂的肿瘤碎片源条件下更优越。另外，如在图37C中所见，此条件的细胞活力也较高。对于作为SCS在胱天蛋白酶抑制的存在下培养的那些细胞，细胞活力类似地高，即使对于SCS条件没有观察到T细胞的长出。这些数据表明，对于从肿瘤生长的T细胞，胱天蛋白酶抑制可能是维持高活力和长出的机制。

实施例14对检查点调节剂和共刺激激动剂抗体对T细胞表型的影响的评价

[0766] 将来自两名健康供体的PBMC解冻，并且用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的

庆大霉素、5％的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤。然后将细胞以5.0x10^5个细胞/cm^2的密度接种至24孔透气性细胞培养板中。将细胞使用50ng/ml OKT3(一种人抗CD3单克隆抗体)激活48小时,并且另外用如下所述的药剂处理。在培养48小时后,分析细胞的表型。

[0767] 将细胞分为6个处理组,如下:伊匹单抗(抗CTLA4)、派姆单抗(抗PD1)、他佛利珠单抗(抗TNFRSF4)、乌瑞鲁单抗(抗CD137)和伐立鲁单抗(抗CD27),以及不添加药剂的对照。对于所有测试组,在0.5、1、10或20μg/mL的单克隆抗体的存在下培养每个处理组中的细胞。

[0768] 所测试的抗体似乎都不影响T细胞的记忆分化状态。经由流式细胞术针对激活标记物OX40、41BB、CD107a和PD1独立地评估CD4+和CD8+细胞的T细胞表型。结果示于图38(CD3+)、图39(CD4+)和图40(CD8+)中。较高浓度的伐立鲁单抗(一种激动剂抗CD27抗体)促进CD3+T细胞(图38B和38C)、CD4+T细胞(图39B和39C)和CD8+T细胞(图40B和40C)上的41BB和CD107a表达。乌瑞鲁单抗(一种激动剂CD137受体抗体)促进CD4 T细胞(图39B)和CD8+T细胞(图40B)上的41BB表达。派姆单抗(一种抗PD-1拮抗剂)减少CD4 T细胞上的PD1表达(图39D)。

[0769] 这些数据支持使用单克隆抗体调节剂在T细胞扩增中用作调节细胞激活状态的方式。

实施例15对细胞因子、调节剂和激动剂抗体对T细胞数、记忆表型和T细胞耗尽的影响的评价

[0770] 如实施例11中所述,将来自三名健康供体的PBMC激活,扩增并冷冻保存。将细胞用补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、5％的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基洗涤24小时。如先前所述,用抗CD3(OKT3)刺激进行冷冻保存前对健康供体T细胞的刺激以模拟存在于肿瘤微环境(TME)中的条件。

[0771] 接下来将细胞接种至透气性100M培养器皿中并扩增7-14天,以达到大型T细胞库,并且将其冷冻保存。将来自三名健康供体的先前扩增的人T细胞解冻,然后与一系列浓度的测试佐剂一起接种至96孔培养板中的补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂;Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中,至5x10^5个细胞/mL的最终细胞密度。

[0772] 表E4示出了这些研究中评估的药剂和浓度。将细胞在培养中维持6天,其中在培养开始后3天更换50％培养基。

[0773] 对于所有培养条件,在培养期结束时,通过用CD45RA和CCR7进行染色(幼稚,CD45RA+CCR7+;“中枢”记忆,CD45RA-CCR7+)通过流式细胞术评估细胞的细胞计数以及幼稚和中枢记忆T细胞的子表型。

表E4：与IL-2组合使用的化合物和浓度	
化合物	浓度
抗体	
抗OX40L（例如奥塞芦单抗）、抗GITR（例如MK-1248）	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
小分子抑制剂	
Z-VAD-FMK	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
细胞因子	
IL-23	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-21	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-27	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-35	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-7	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-15	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml

[0774] 与仅用IL-2扩增的培养物相比，所测试的每种细胞因子都导致在第6天CD3+细胞/mL的增加。在一些情形中，第6天细胞数的最大增加是在所测试的最高细胞因子浓度下。结果示于图41A(IL-23)、图42A(IL-21)、图43A(IL-35)、图44A(IL-27)、图45A(IL-15)和图46A(IL-7)中。

[0775] 除了细胞数之外，细胞因子IL-23(图41B)、IL-21(图42B)、IL-35(图43B)、IL-27(图44B)、IL-15(IL-45B)和IL-7(图46B)也导致在第6天存在于经扩增的群体中的幼稚和中枢记忆T细胞百分比的测量到的增加。具体而言，在几种测试浓度的IL-23和IL-27下，在孵育后，观察到幼稚和中枢记忆T细胞百分比的增加，它们是具有更少耗竭表型的T细胞。例如，如图44B所示，在三种测试浓度(3.9、250和1000IU/mL)中的每一种下，IL-27导致CD3+细胞数以及存在于群体中的幼稚和中枢记忆T细胞百分比的显著增加。

[0776] 与仅单独用IL-2扩增的培养物相比，添加人抗GITR抗体或抗OX40L抗体导致在第6天在最高测试浓度(50μg/mL)下CD3+细胞/mL的增加。结果示于图47A(人抗GITR MK-1248)和图48B(奥塞芦单抗)中。最高测试浓度的抗GITR抗体MK-1248另外导致在培养第6天存在于群体中的幼稚和中枢记忆T细胞百分比的显著增加(图47A)，而与仅用IL-2扩增的培养物相比，在抗OX40L抗体的情况下观察到对幼稚和中枢记忆T细胞的百分比几乎没有影响。

[0777] 与仅单独用IL-2扩增的培养物相比，小分子胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD-FMK在第6天在高于0.2μg/mL的浓度下也显著增加CD3+细胞数/mL(图49A)。Z-VAD-FMK化合物对与仅用IL-2扩增的培养物相比在抗OX40L抗体的情况下观察到的幼稚和中枢记忆T细胞的百分比没有影响。

实施例16对细胞因子、调节剂和激动剂抗体对CD4+/CD8+T细胞比率的影响的评价

[0778] 测定细胞因子、调节剂和激动剂抗体对存在于所得群体中的CD4+与CD8+T细胞的

比率的影响。简而言之，如实施例15中所述，将来自三名健康供体的PBMC激活，扩增并冷冻保存，之后解冻，洗涤并用OpTmizer细胞培养基静置24小时。然后将来自三名健康供体的先前扩增的人T细胞与一系列浓度的测试佐剂一起接种至96孔培养板中的补充有300IU/mL的重组IL-2、10μg/ml的庆大霉素、在2％与5％之间的免疫细胞血清替代物(ThermoFisher)以及终浓度为2.0mM的二肽形式的谷氨酰胺L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(GlutaMAX补充剂；Thermofisher)的OpTmizer细胞培养基中，至5x105个细胞/mL的最终细胞密度。

[0779] 表E5示出了这些研究中评估的药剂和浓度。将细胞在培养中维持6天，其中在培养开始后3天更换50％培养基。在培养期结束时，通过针对CD4和CD8进行染色通过流式细胞术评估细胞的T细胞亚型。一名供体的代表性结果示于图50中。

表E5：高通量筛选中使用的化合物和浓度

化合物	浓度
抗体	
他佛利珠单抗、奥塞芦单抗、伊匹单抗、托珠单抗、乌瑞鲁单抗、派姆单抗、伐立鲁单抗、抗GITR MK-1248	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
FasL（人抗FasL抗体）	0.2 μg/mL - 50 μg/mL
小分子抑制剂	
Z-VAD-FMK	0.4 μg/mL - 100 μg/mL
NVP-HSP990	4.0 μg/mL - 1000 μg/mL
细胞因子	
IL-23	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-21	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-27	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-35	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
IL-7	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-15	3.9 IU/ml – 1000 IU/ml
IL-21	3.9 ng/ml – 1000 ng/ml
DMSO（对照）	0.2 μg/mL - 50 μg/mL

[0780] 虽然观察到一定剂量依赖性，但所测试的抗体(图50A)、细胞因子(图50B)以及小分子抑制剂(图50C)都没有显著改变在仅IL-2(最左条)的情况下观察到的CD4+/CD8+T细胞比率。这些数据支持，这些药剂与IL-2组合可以用于调节T细胞数、表型和耗竭状态而不会显著改变存在于群体中的T细胞亚型的平衡。

[0781] 本发明在范围上并不旨在限于具体公开的实施方案，提供所述具体公开的实施方案例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授，对所述组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不背离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践此类变化，并且所述变化旨在落入本公开文本的范围内。

序列

SEQ ID	序列	注释
1	RAVPGGSSPAWTQCQQLSQKLCTLAWSAHPLVGHMDL REEGDEETTNDVPHIQCGDGCDPQGLRDNSQFCLQRIHQ GLIFYEKLLGSDIFTGEPSLLPDSPVGQLHASLLGLSQLLQ PEGHHWETQQIPSLSPSQPWQRLLLRFKILRSLQAFVAV AARVFAHGAATLSP	P19, UniProt Q9NPF7 20-189
2	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVL SHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNY SGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATL SAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVD AVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVE VSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFT DKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	P40, UniProt P29460 23-328
3	YSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHP ESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARC LCPHCVSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGE KGTHKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG	IL-25, UniProt Q9H293 33-177
4	FPRPPGRPQL SLQELRREFT VSLHLARKLL SEVRGQAHRF AESHLPGVNL YLLPLGEQLP DVSLTFQAWR RLSDPERLCF ISTTLQPFHA LLGGLGTQGR WTNMERMQLW AMRLDLRDLQ RHLRFQVLAA GFNLPEEEEE EEEEEEEERK GLLPGALGSA LQGPAQVSWP QLLSTYRLLH SLELVLSRAV RELLLLSKAG HSVWPLGFPT LSPQP	P28（IL27A）
5	RKGPP AALTLPRVQC RASRYPIAVD CSWTLPPAPN STSPVSFIAT YRLGMAARGH SWPCLQQTPT STSCTITDVQ LFSMAPYVLN VTAVHPWGSS SSFVPFITEH IIKPDPPEGV RLSPLAERQL QVQWEPPGSW PFPEIFSLKY WIRYKRQGAA RFHRVGPIEA TSFILRAVRP RARYYVQVAA QDLTDYGELS DWSLPATATM SLGK	EB13（IL27B）
6	RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF RIRAVTIDRV MSYLNAS	P35（IL-12α）
7	QVTDINSKGLELRKTVTTVETQNLEGLHHDGQFCHKPCP PGERKARDCTVNGDEPDCVPCQEGKEYTDKAHFSSKCR RCRLCDEGHGLEVEINCTRTQNTKCRCKPNFFCNSTVCE HCDPCTKCEHGIIKECTLTSNTKCKEEGSRSN	CD95（AA 26-173）

序列表

<110> 迈斯特治疗公司

<120> 使用调节剂产生肿瘤反应性T细胞组合物的方法

<130> 16517-20006.40

<140> 尚未分配

<141> 同时随同提交

<150> 62/941,628

<151> 2019-11-27

<150> 63/070,823

<151> 2020-08-26

<160> 7

<170> 用于Windows的FastSEQ 版本4.0

<210> 1

<211> 170

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P19, UniProt Q9NPF7 20-189

<400> 1

```
Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
1               5                  10                  15
Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
            20                  25                  30
Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
        35                  40                  45
Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
    50                  55                  60
Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
65                  70                  75                  80
Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu
                85                  90                  95
Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu
            100                 105                 110
Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile
        115                 120                 125
Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe
    130                 135                 140
Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val
```

145 150 155 160
Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro
165 170

<210> 2
<211> 306
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> P40, UniProt P29460 23-328
<400> 2

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
1 5 10 15
Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30
Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
35 40 45
Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
50 55 60
Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
65 70 75 80
Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
85 90 95
Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
100 105 110
Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
115 120 125
Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln
130 135 140
Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly
145 150 155 160
Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
165 170 175
Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
180 185 190
Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg
195 200 205
Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
210 215 220
Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp

225 230 235 240
Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
245 250 255
Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
260 265 270
Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
275 280 285
Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
290 295 300
Cys Ser
305

<210> 3
<211> 145
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> IL-25, UniProt Q9H293 33-177
<400> 3
Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro
20 25 30
Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly
35 40 45
Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg
50 55 60
Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys
65 70 75 80
Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly
85 90 95
Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro
100 105 110
Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg
115 120 125
Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met
130 135 140
Gly
145

<210> 4

<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> P28 (IL27A)
<400> 4

Phe Pro Arg Pro Pro Gly Arg Pro Gln Leu Ser Leu Gln Glu Leu Arg
1 5 10 15
Arg Glu Phe Thr Val Ser Leu His Leu Ala Arg Lys Leu Leu Ser Glu
20 25 30
Val Arg Gly Gln Ala His Arg Phe Ala Glu Ser His Leu Pro Gly Val
35 40 45
Asn Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Gly Glu Gln Leu Pro Asp Val Ser Leu
50 55 60
Thr Phe Gln Ala Trp Arg Arg Leu Ser Asp Pro Glu Arg Leu Cys Phe
65 70 75 80
Ile Ser Thr Thr Leu Gln Pro Phe His Ala Leu Leu Gly Gly Leu Gly
85 90 95
Thr Gln Gly Arg Trp Thr Asn Met Glu Arg Met Gln Leu Trp Ala Met
100 105 110
Arg Leu Asp Leu Arg Asp Leu Gln Arg His Leu Arg Phe Gln Val Leu
115 120 125
Ala Ala Gly Phe Asn Leu Pro Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
130 135 140
Glu Glu Glu Glu Arg Lys Gly Leu Leu Pro Gly Ala Leu Gly Ser Ala
145 150 155 160
Leu Gln Gly Pro Ala Gln Val Ser Trp Pro Gln Leu Leu Ser Thr Tyr
165 170 175
Arg Leu Leu His Ser Leu Glu Leu Val Leu Ser Arg Ala Val Arg Glu
180 185 190
Leu Leu Leu Leu Ser Lys Ala Gly His Ser Val Trp Pro Leu Gly Phe
195 200 205
Pro Thr Leu Ser Pro Gln Pro
210 215

<210> 5
<211> 209
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> EB13 (IL27B)

<400> 5

Arg Lys Gly Pro Pro Ala Ala Leu Thr Leu Pro Arg Val Gln Cys Arg
1 5 10 15
Ala Ser Arg Tyr Pro Ile Ala Val Asp Cys Ser Trp Thr Leu Pro Pro
20 25 30
Ala Pro Asn Ser Thr Ser Pro Val Ser Phe Ile Ala Thr Tyr Arg Leu
35 40 45
Gly Met Ala Ala Arg Gly His Ser Trp Pro Cys Leu Gln Gln Thr Pro
50 55 60
Thr Ser Thr Ser Cys Thr Ile Thr Asp Val Gln Leu Phe Ser Met Ala
65 70 75 80
Pro Tyr Val Leu Asn Val Thr Ala Val His Pro Trp Gly Ser Ser Ser
85 90 95
Ser Phe Val Pro Phe Ile Thr Glu His Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro
100 105 110
Glu Gly Val Arg Leu Ser Pro Leu Ala Glu Arg Gln Leu Gln Val Gln
115 120 125
Trp Glu Pro Pro Gly Ser Trp Pro Phe Pro Glu Ile Phe Ser Leu Lys
130 135 140
Tyr Trp Ile Arg Tyr Lys Arg Gln Gly Ala Ala Arg Phe His Arg Val
145 150 155 160
Gly Pro Ile Glu Ala Thr Ser Phe Ile Leu Arg Ala Val Arg Pro Arg
165 170 175
Ala Arg Tyr Tyr Val Gln Val Ala Ala Gln Asp Leu Thr Asp Tyr Gly
180 185 190
Glu Leu Ser Asp Trp Ser Leu Pro Ala Thr Ala Thr Met Ser Leu Gly
195 200 205
Lys

<210> 6

<211> 197

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P35

<400> 6

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
1 5 10 15
His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys

20 25 30
Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
35 40 45
His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu
50 55 60
Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
65 70 75 80
Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
85 90 95
Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr
100 105 110
Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125
Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140
Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160
Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175
Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190
Tyr Leu Asn Ala Ser
195

<210> 7
<211> 148
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> CD95 (AA 26-173)
<400> 7
Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val
1 5 10 15
Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln
20 25 30
Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys
35 40 45
Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys
50 55 60
Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg

65 70 75 80
Leu Cys Asp Glu Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg
85 90 95
Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser
100 105 110
Thr Val Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile
115 120 125
Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly
130 135 140
Ser Arg Ser Asn
145

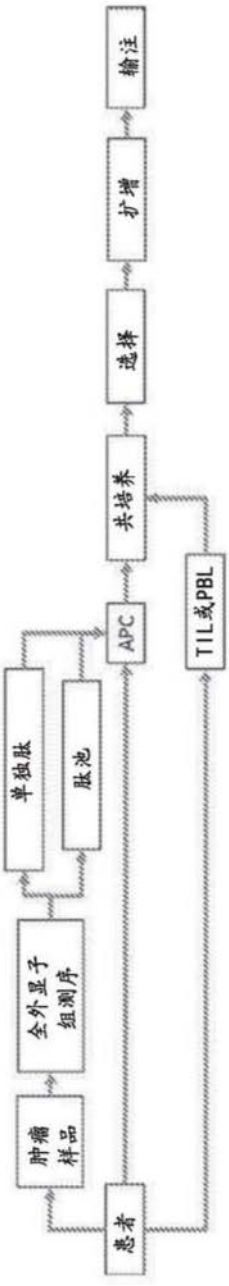


FIG.1A



FIG.1B

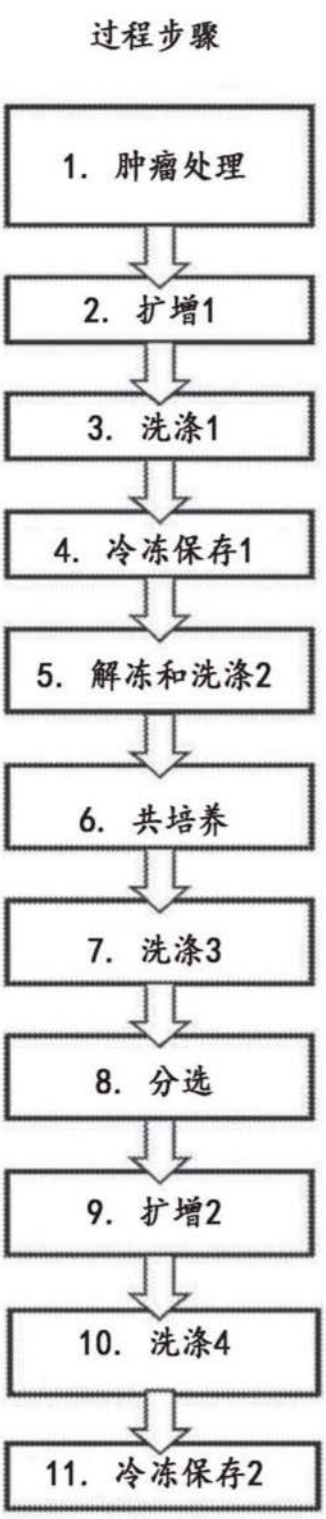

过程步骤
1. 肿瘤处理
2. 扩增1
3. 洗涤1
4. 冷冻保存1
5. 解冻和洗涤2
6. 共培养
7. 洗涤3
8. 分选
9. 扩增2
10. 洗涤4
11. 冷冻保存2

FIG.1C

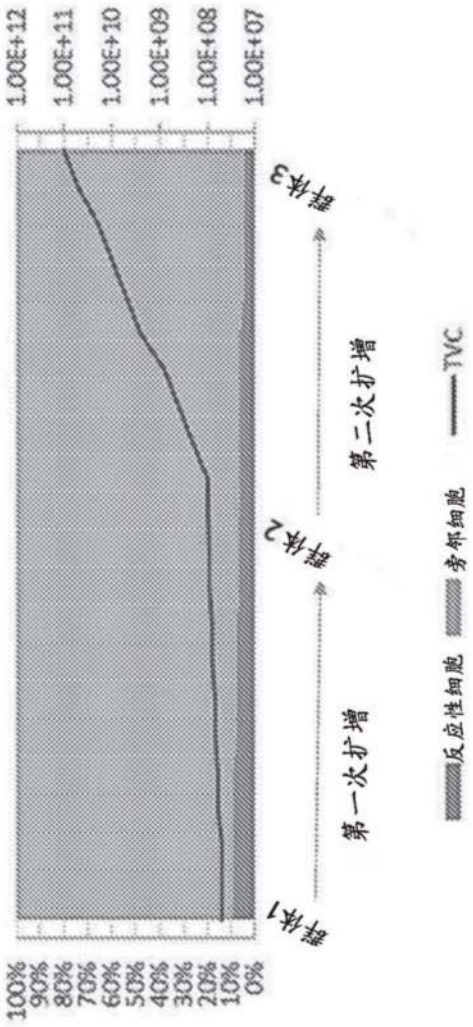

1.00E+12
1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
群体1
群体2
群体3
第一次扩增
第二次扩增
反应性细胞
旁邻细胞
TVC

FIG.2A

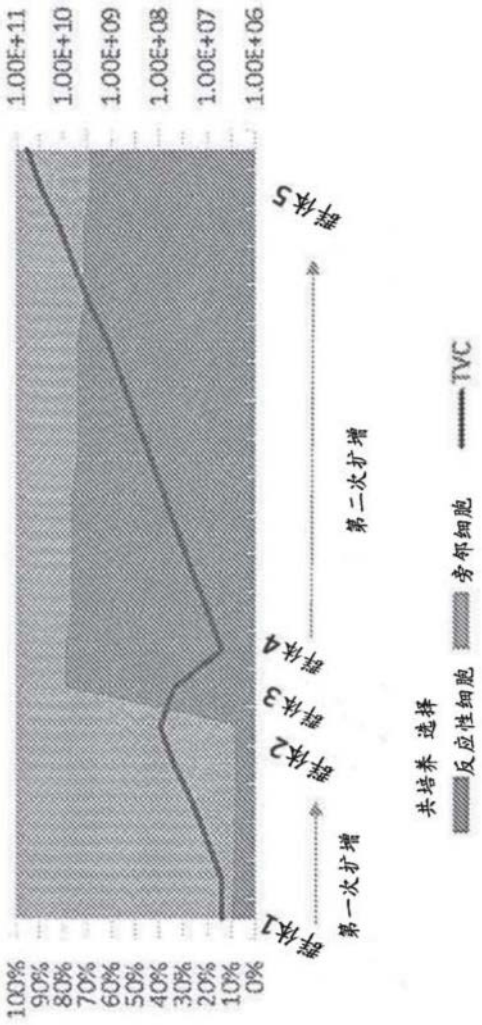

1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
群体1
群体2
群体3
群体4
群体5
第一次扩增
第二次扩增
共培养 选择
反应性细胞
旁邻细胞
TVC

FIG.2B

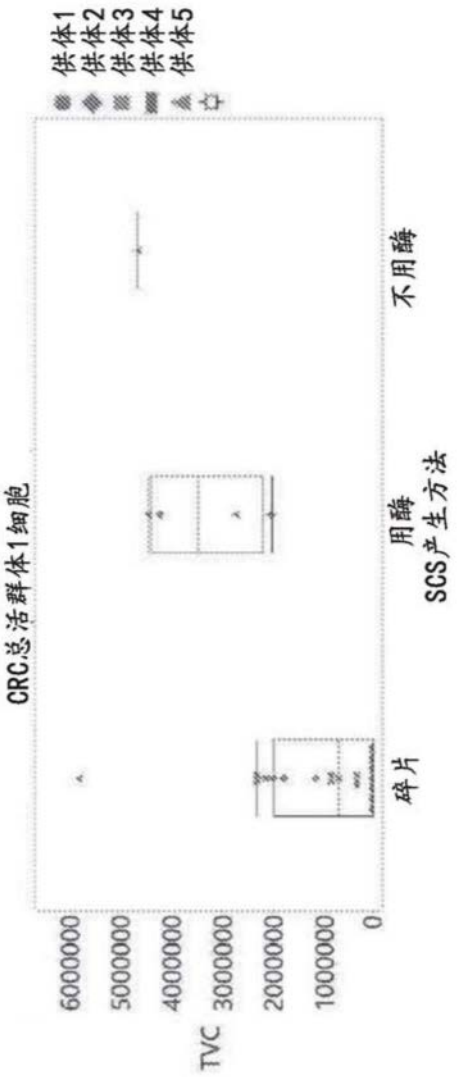

供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
CRC总活群体1细胞
TVC
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
碎片
用酶
SCS产生方法
不用酶

FIG.3A

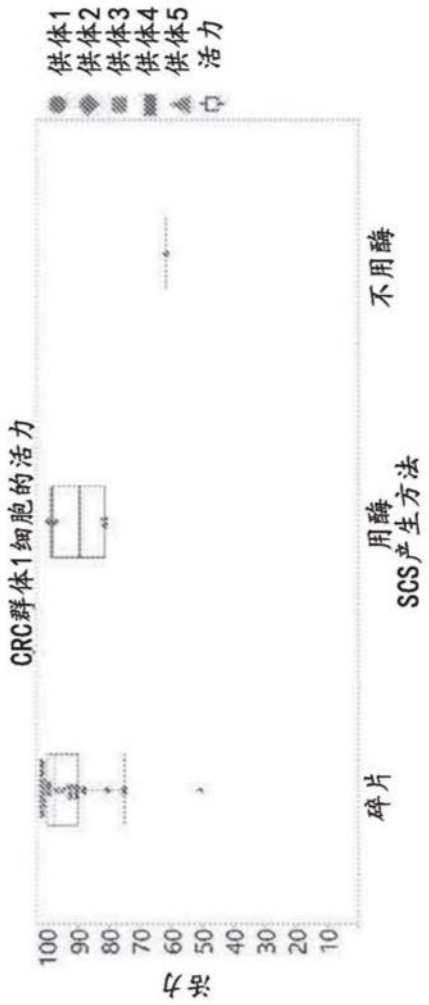

供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
活力
CRC群体1细胞的活力
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
%活力
碎片
用酶
SCS产生方法
不用酶

FIG.3B

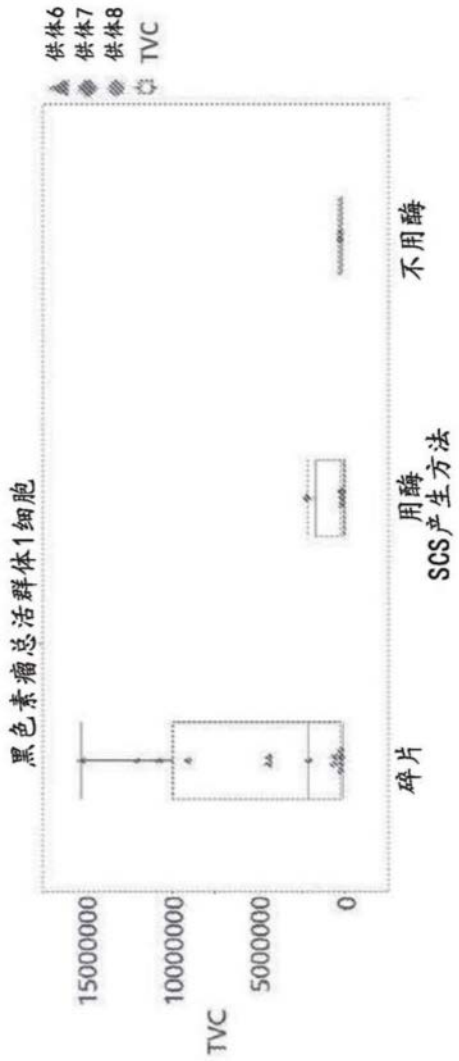

供体6
供体7
供体8
TVC
黑色素瘤总活群体1细胞
15000000
10000000
5000000
0
TVC
碎片
用酶
SCS产生方法
不用酶

FIG.4A

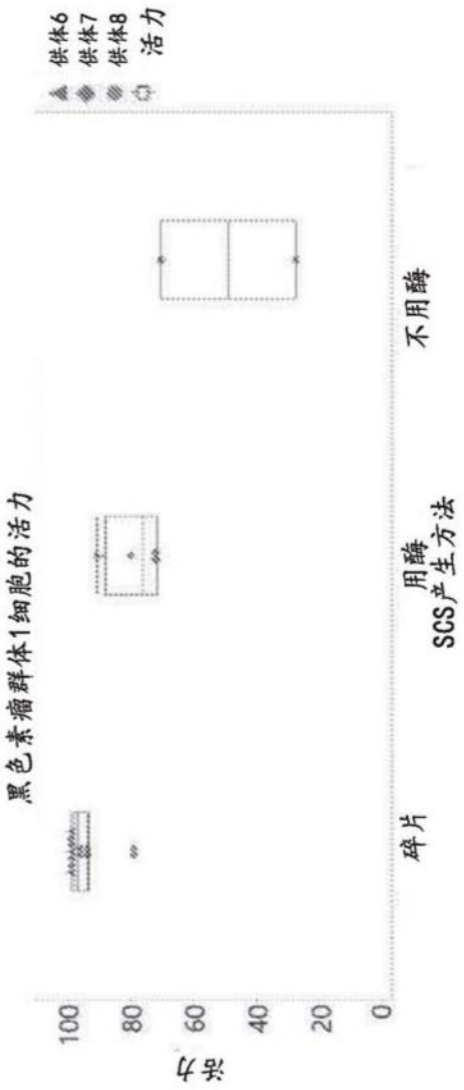


FIG.4B

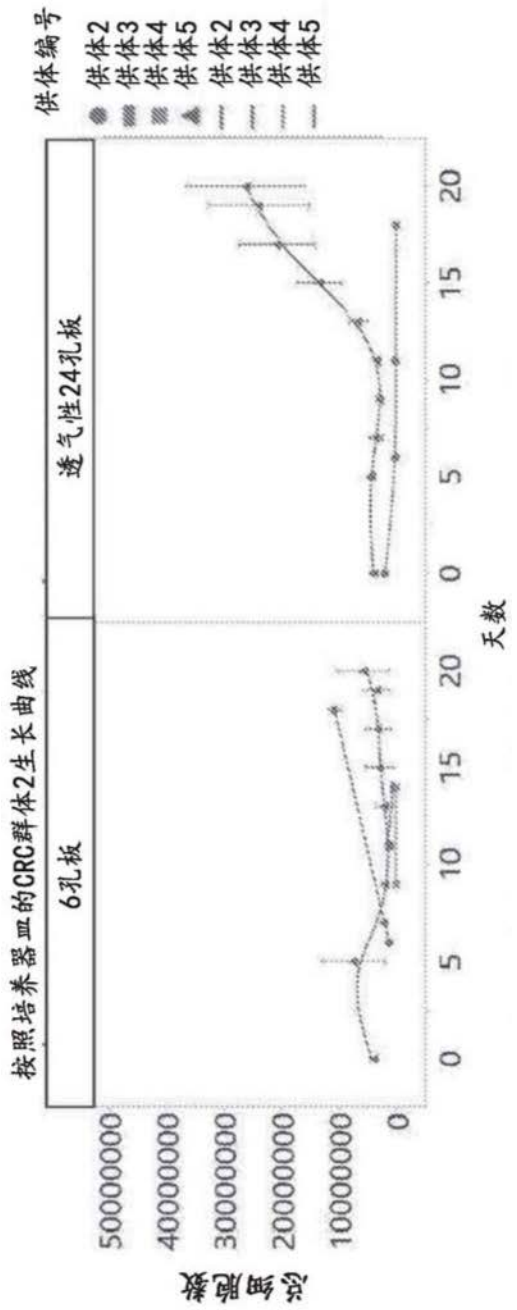

按照培养器皿的CRC群体2生长曲线
6孔板
透气性24孔板
供体编号
供体2
供体3
供体4
供体5
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
0
5
10
15
20
0
5
10
15
20
天数

FIG.5A

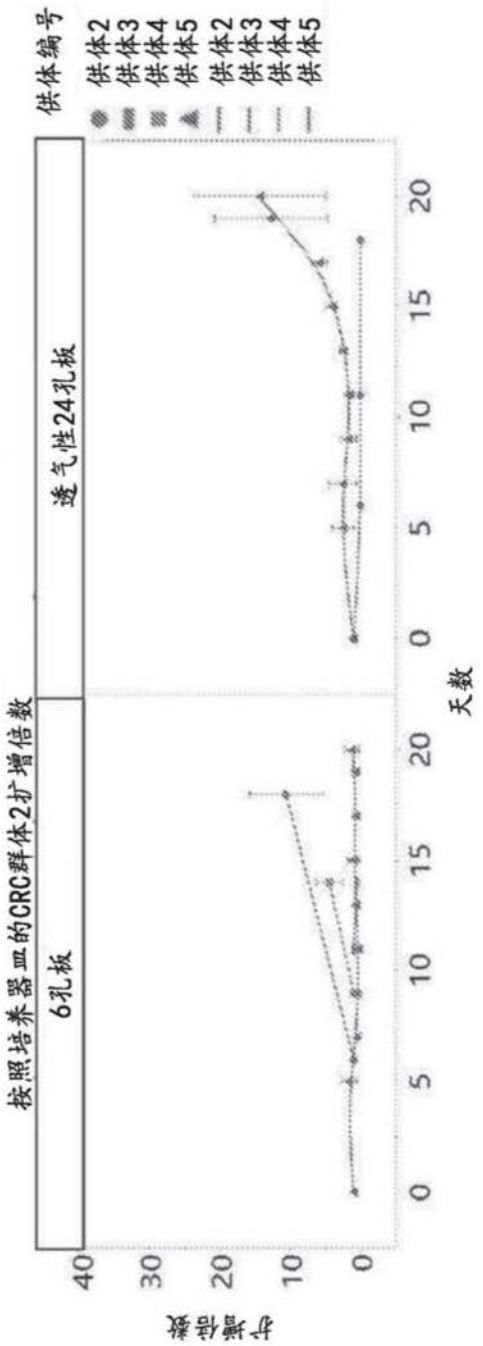

供体编号
供体2
供体3
供体4
供体5
供体2
供体3
供体4
供体5
按照培养器皿的CRC群体2扩增倍数
6孔板
透气性24孔板
扩增倍数
天数
0
10
20
30
40
0
5
10
15
20
0
5
10
15
20

FIG.5B

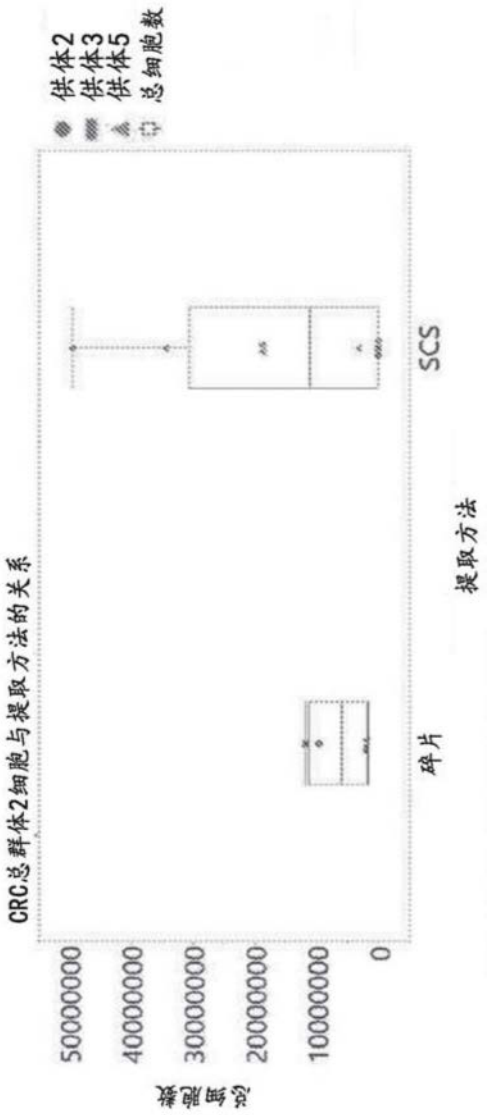

CRC总群体2细胞与提取方法的关系
供体2
供体3
供体5
总细胞数
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
碎片
SCS
提取方法

FIG.5C

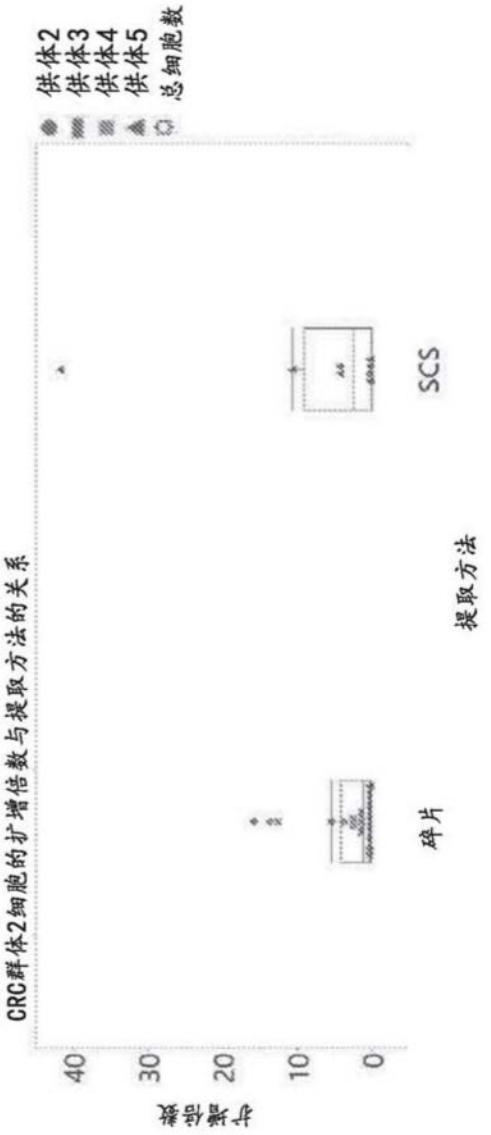

供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数
CRC群体2细胞的扩增倍数与提取方法的关系
扩增倍数
40
30
20
10
0
碎片
SCS
提取方法

FIG.5D

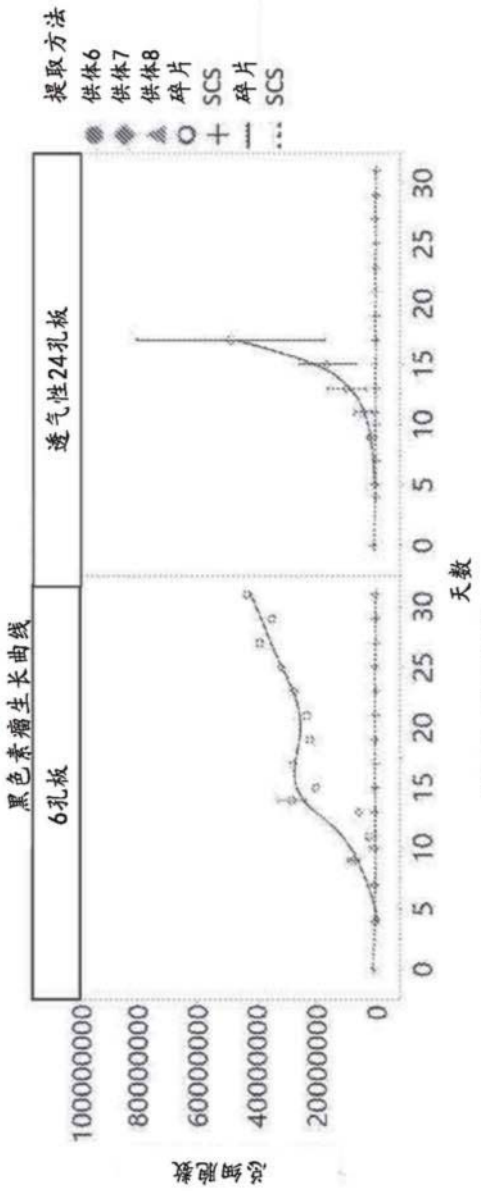

黑色素瘤生长曲线
6孔板
透气性24孔板
提取方法
供体6
供体7
供体8
碎片
SCS
碎片
SCS
细胞数
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
0 5 10 15 20 25 30 0 5 10 15 20 25 30
天数

FIG.6A

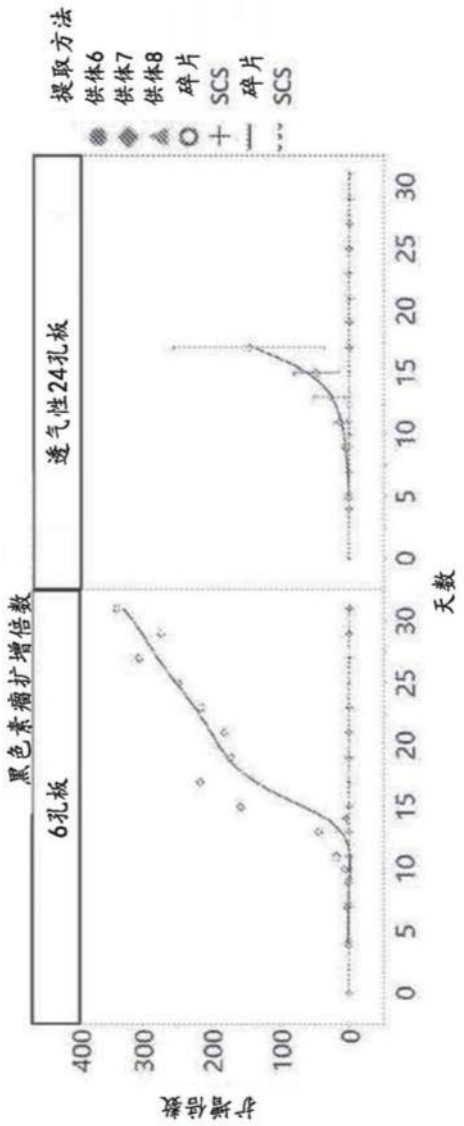

提取方法
供体6
供体7
供体8
碎片
SCS
碎片
SCS
黑色素瘤扩增倍数
6孔板
透气性24孔板
400
300
200
100
0
0 5 10 15 20 25 30 0 5 10 15 20 25 30
天数

FIG.6B

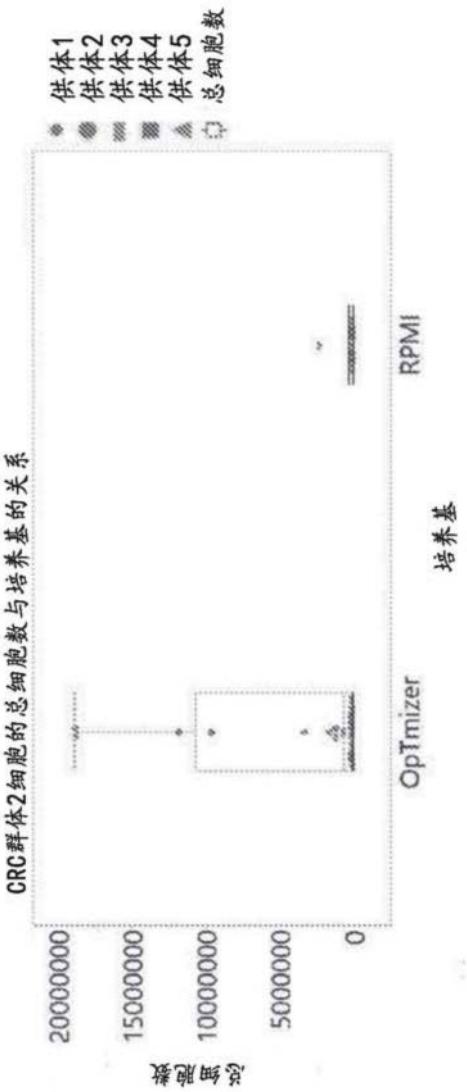

供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数
CRC群体2细胞的总细胞数与培养基的关系
20000000
15000000
10000000
5000000
0
总细胞数
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.7A

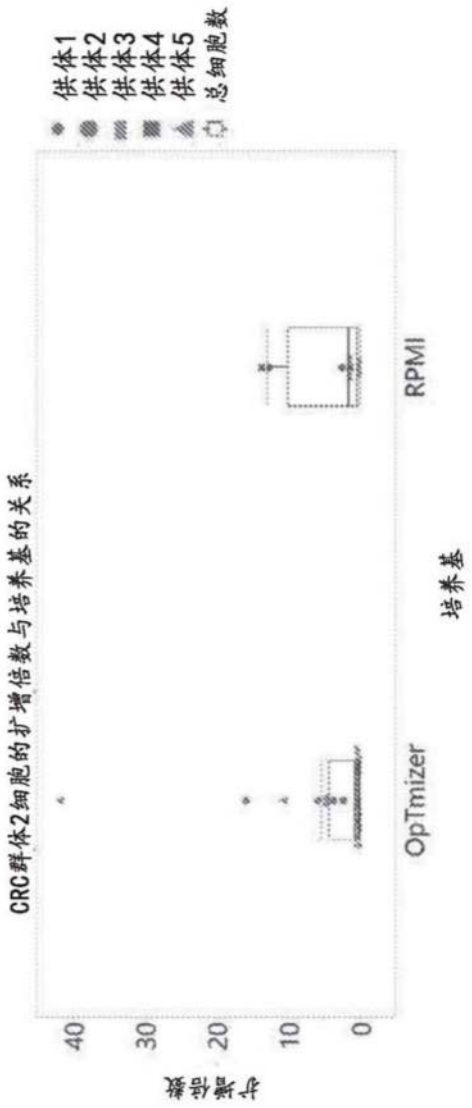

CRC群体2细胞的扩增倍数与培养基的关系
供体1
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数
扩增倍数
40
30
20
10
0
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.7B

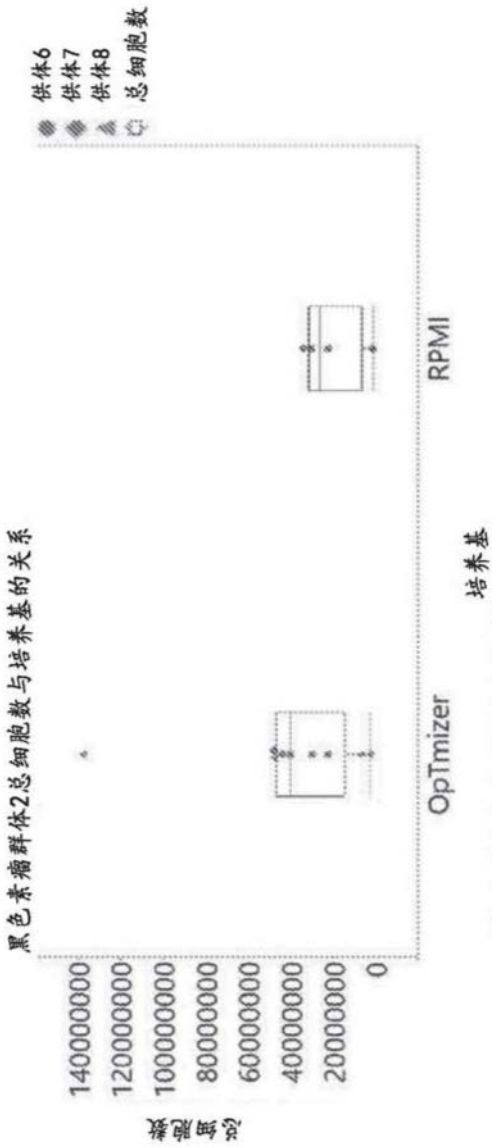

黑色素瘤群体2总细胞数与培养基的关系
供体6
供体7
供体8
总细胞数
140000000
120000000
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.8A

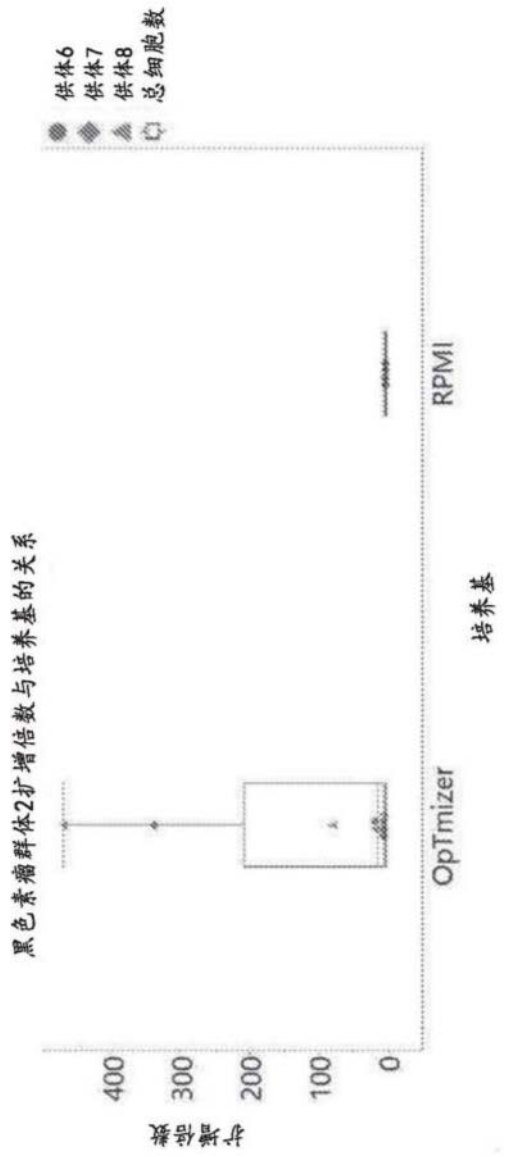

黑色素瘤群体2扩增倍数与培养基的关系
供体6
供体7
供体8
总细胞数
扩增倍数
400
300
200
100
0
OpTmizer
RPMI
培养基

FIG.8B

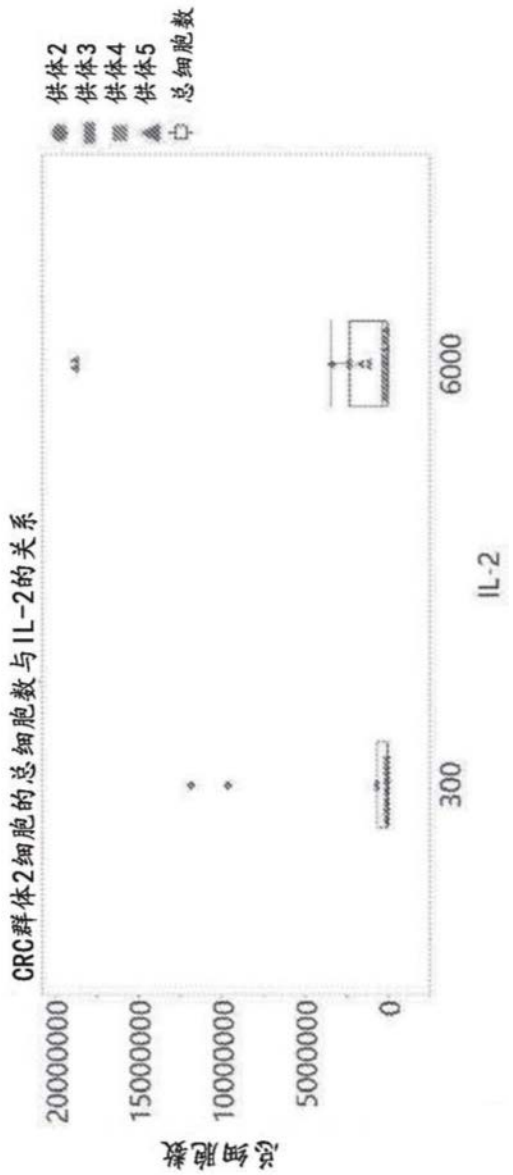

CRC群体2细胞的总细胞数与IL-2的关系
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数
20000000
15000000
10000000
5000000
0
总细胞数
300
6000
IL-2

FIG.9A

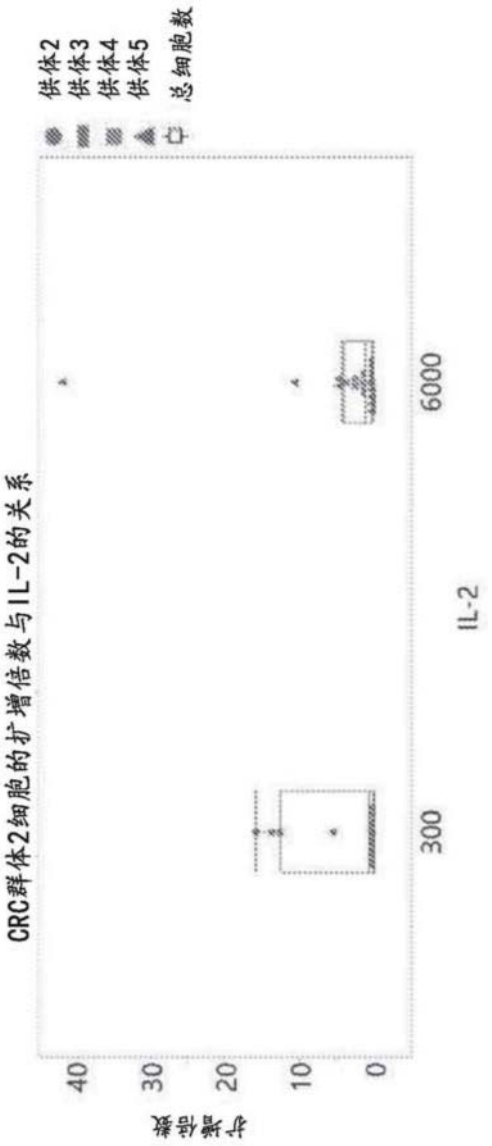

CRC群体2细胞的扩增倍数与IL-2的关系
供体2
供体3
供体4
供体5
总细胞数
扩增倍数
0
10
20
30
40
300
6000
IL-2

FIG.9B

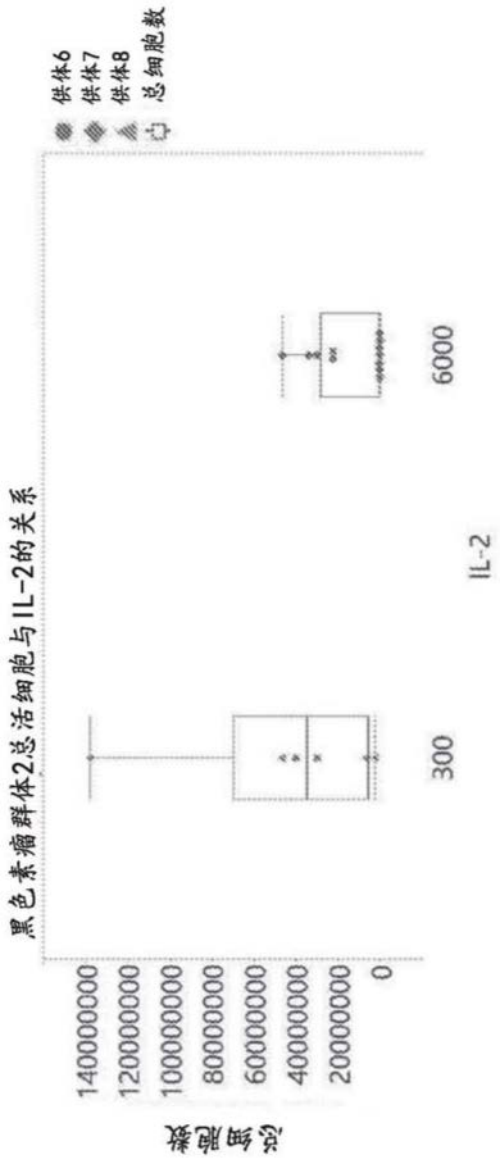

黑色素瘤群体2总活细胞与IL-2的关系
供体6
供体7
供体8
总细胞数
总细胞数
140000000
120000000
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
300
6000
IL-2

FIG.10A

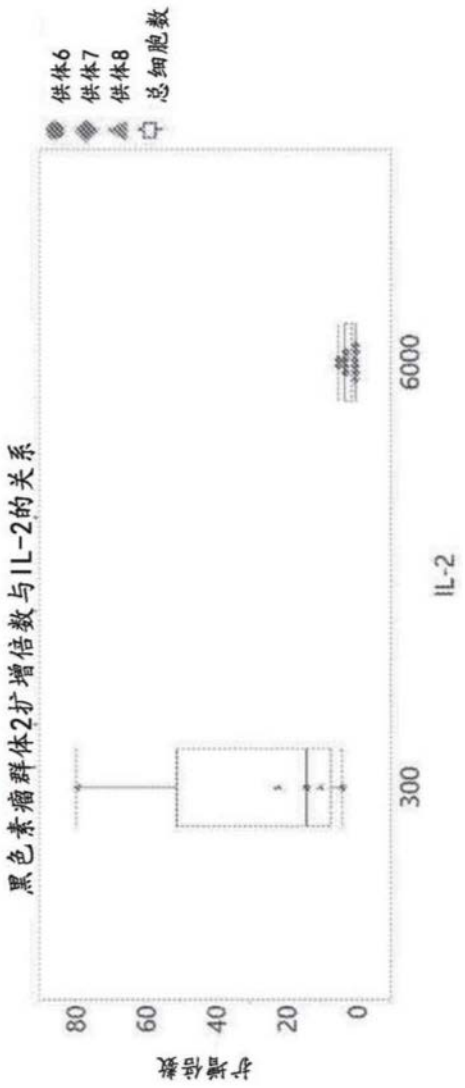

黑色素瘤群体2扩增倍数与IL-2的关系
供体6
供体7
供体8
总细胞数
扩增倍数
0
20
40
60
80
300
6000
IL-2

FIG.10B

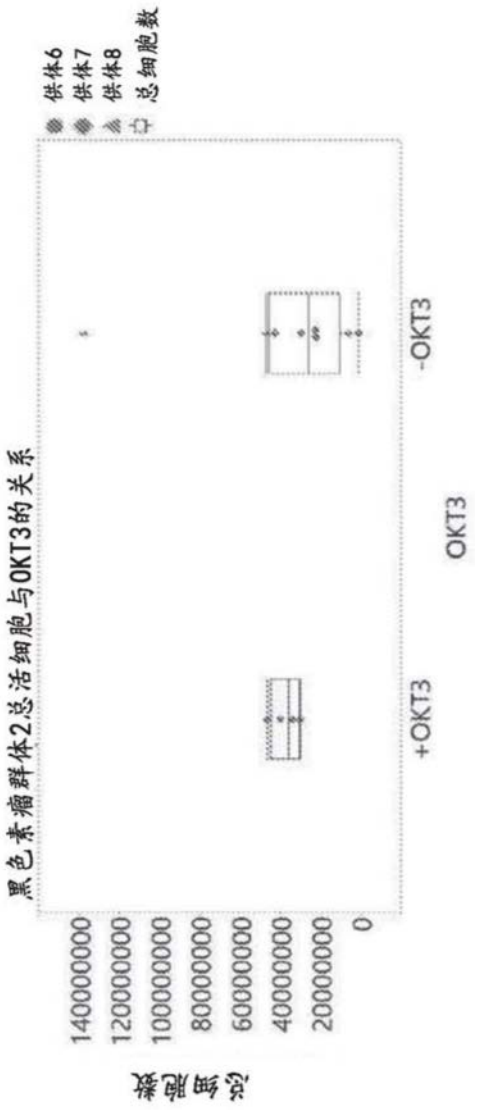

黑色素瘤群体2总活细胞与OKT3的关系
供体6
供体7
供体8
总细胞数
总细胞数
140000000
120000000
100000000
80000000
60000000
40000000
20000000
0
+OKT3
-OKT3
OKT3

FIG.11A

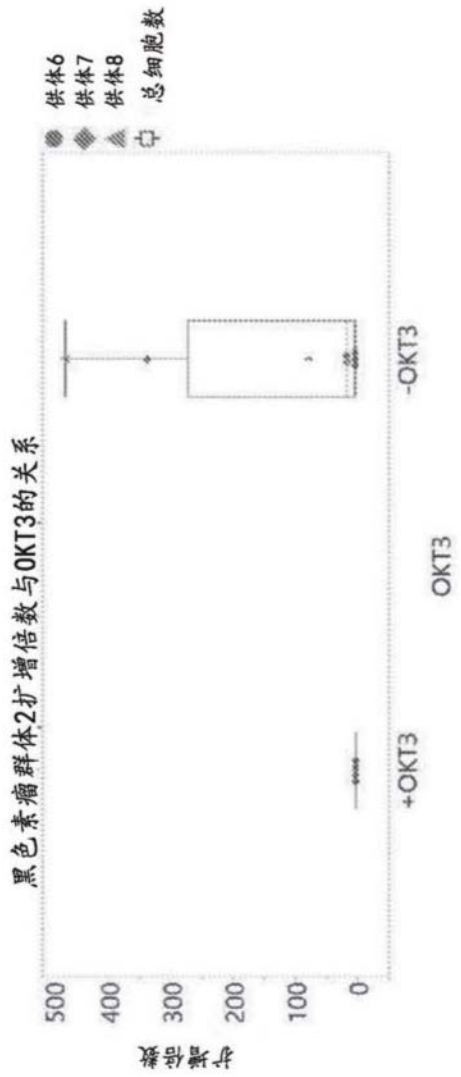

供体6
供体7
供体8
总细胞数
黑色素瘤群体2扩增倍数与OKT3的关系
扩增倍数
500
400
300
200
100
0
+OKT3
-OKT3
OKT3

FIG.11B

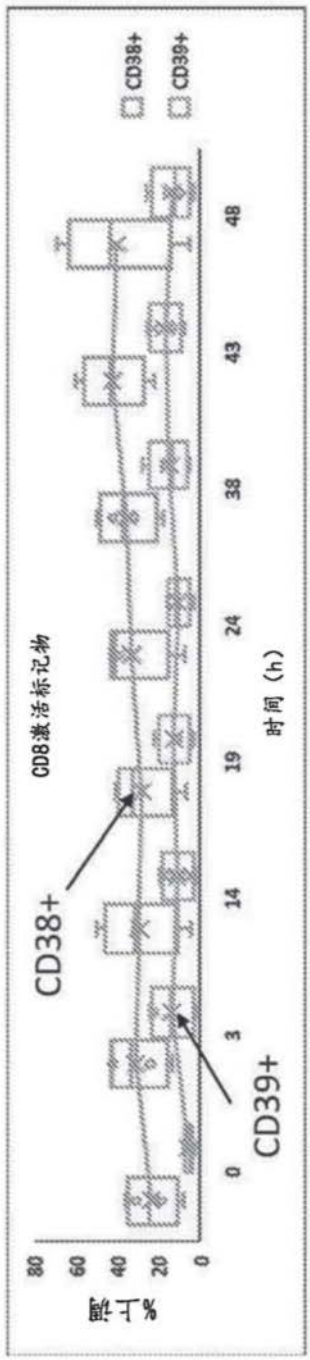

CD38+
CD39+
CD8激活标记物
CD38+
CD39+
%上调
80
60
40
20
0
0
3
14
19
24
38
43
48
时间 (h)

FIG.12A

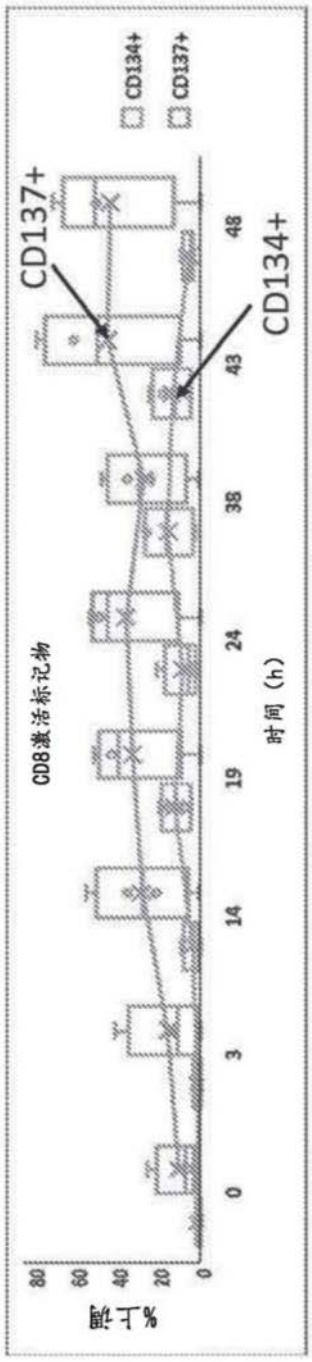

CD134+
CD137+
CD137+
CD134+
CD8激活标记物
时间（h）
%上调
0
3
14
19
24
38
43
48
0
20
40
60
80

FIG.12B

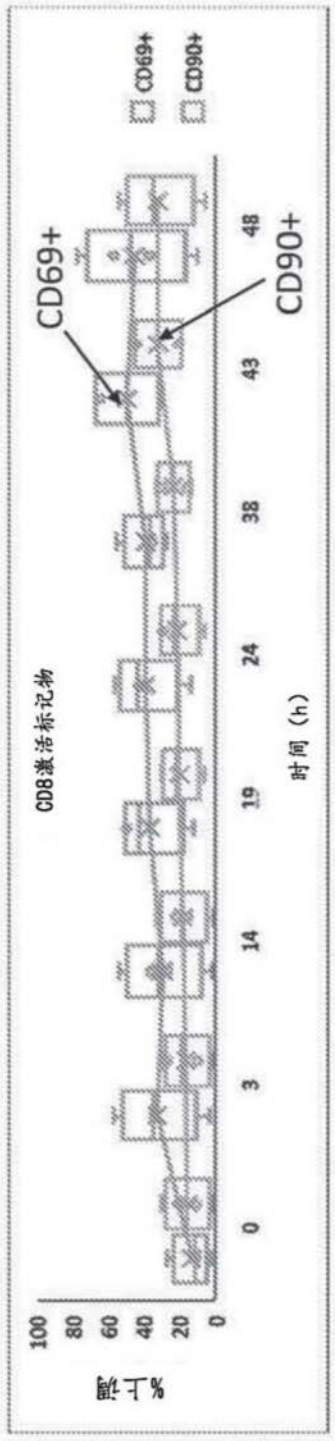

CD69+
CD90+
CD69+
CD90+
CD8激活标记物
时间（h）
%上调
0
3
14
19
24
38
43
48
0
20
40
60
80
100

FIG.12C

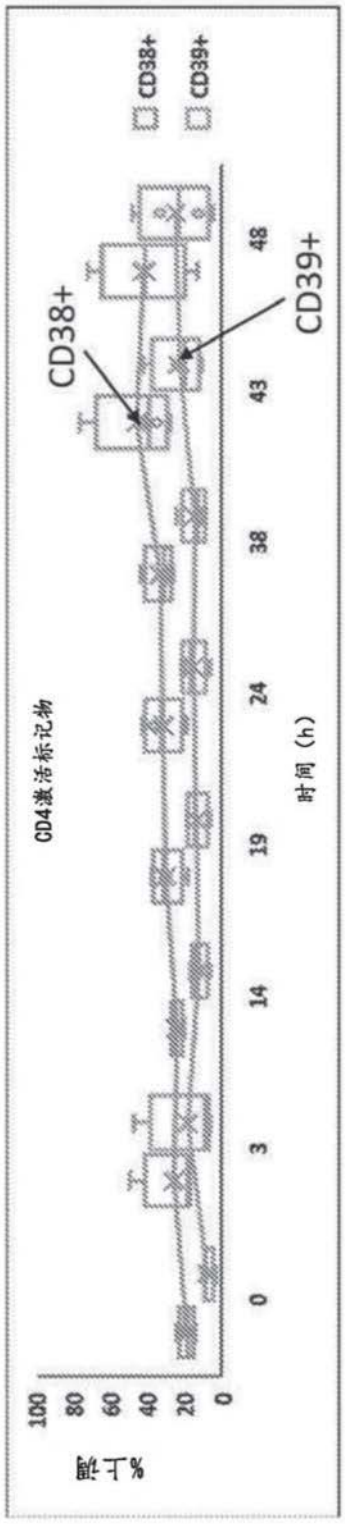

CD38+
CD39+
CD38+
CD39+
CD4激活标记物
%上调
100
80
60
40
20
0
0
3
14
19
24
38
43
48
时间（h）

FIG.13A

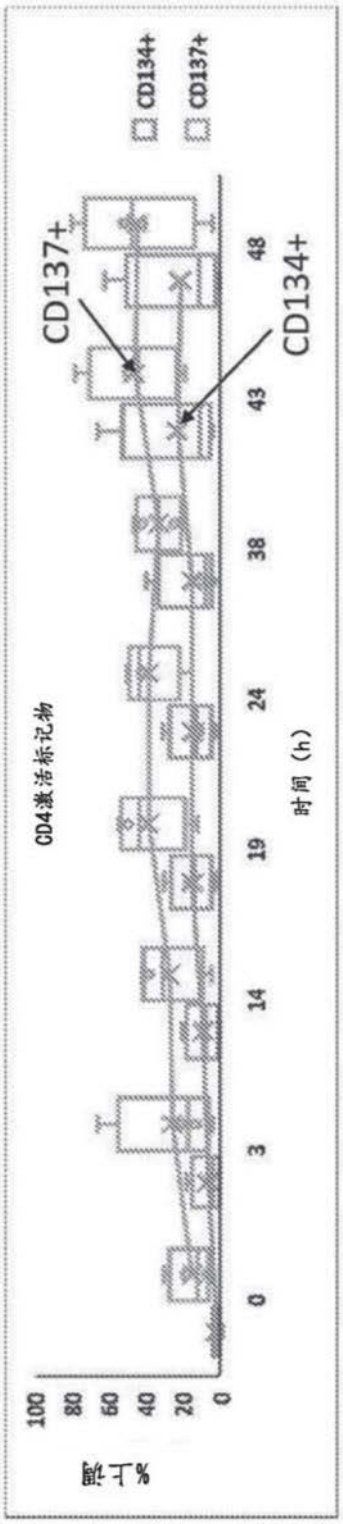

CD134+
CD137+
CD137+
CD134+
CD4激活标记物
时间（h）
%上调
0
3
14
19
24
38
43
48
100
80
60
40
20
0

FIG.13B

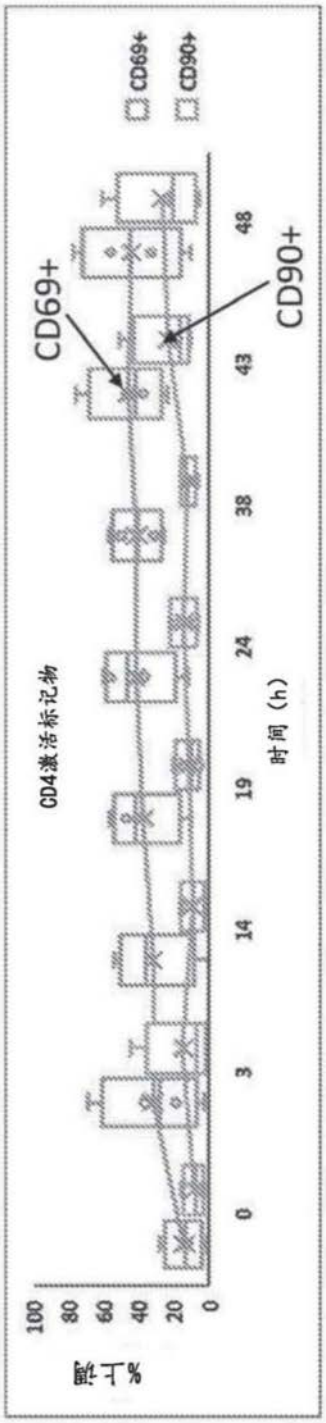

CD69+
CD90+
CD69+
CD90+
CD4激活标记物
时间 (h)
%上调
0
3
14
19
24
38
43
48
0
20
40
60
80
100

FIG.13C

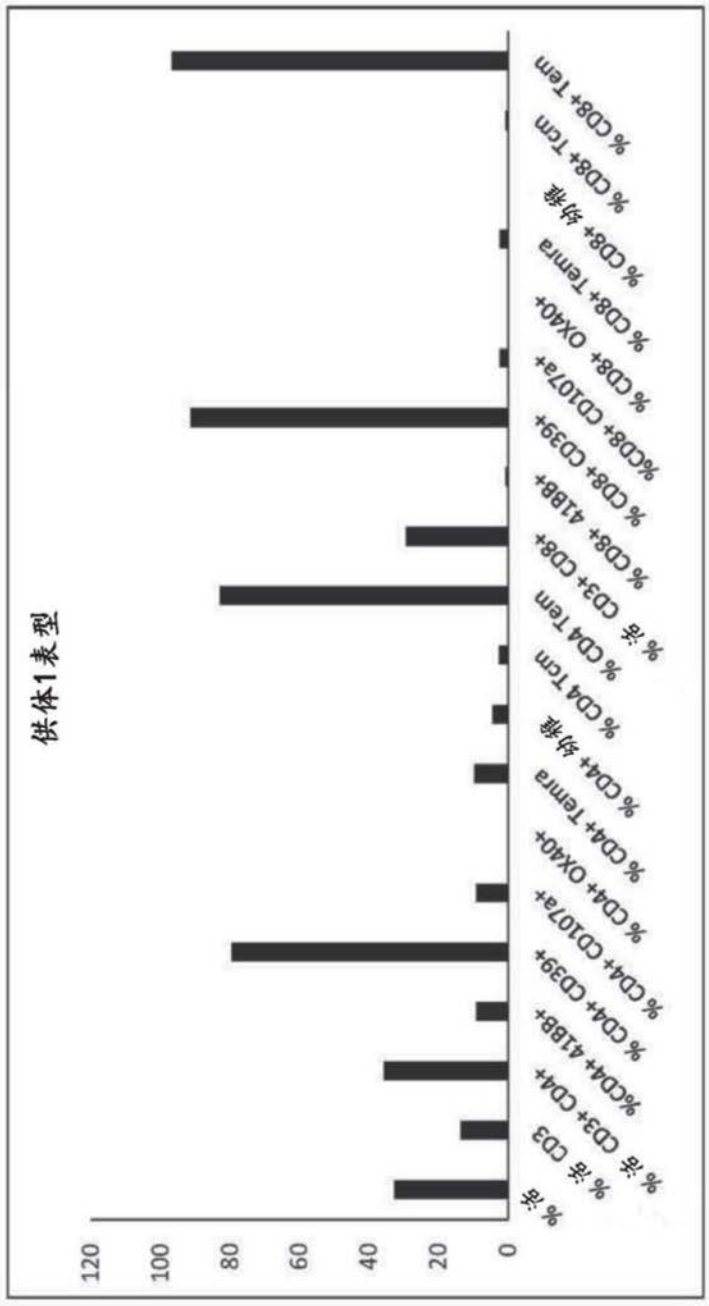

供体1表型
120
100
80
60
40
20
0
% 活
% 活 CD3
% 活 CD3+ CD4+
%CD4+ 41BB+
%CD4+ CD39+
%CD4+ CD107a+
%CD4+ OX40+
%CD4+ Temra
%CD4+ 幼稚
%CD4 Tcm
%CD4 Tem
%活 CD3+ CD8+
%CD8+ 41BB+
%CD8+ CD39+
%CD8+ CD107a+
%CD8+ OX40+
%CD8+ Temra
%CD8+ 幼稚
%CD8+ Tcm
%CD8+ Tem

FIG.14

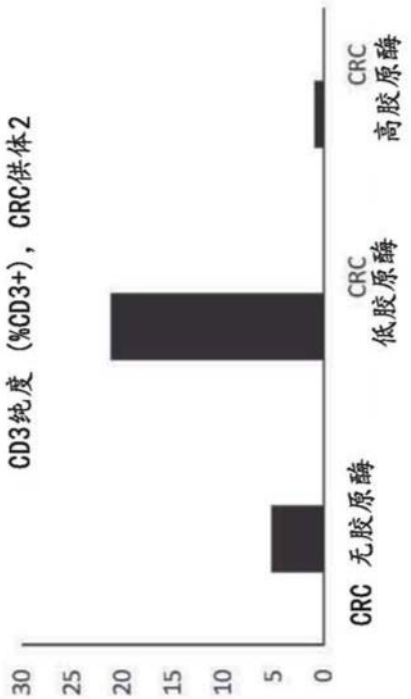


FIG.15A

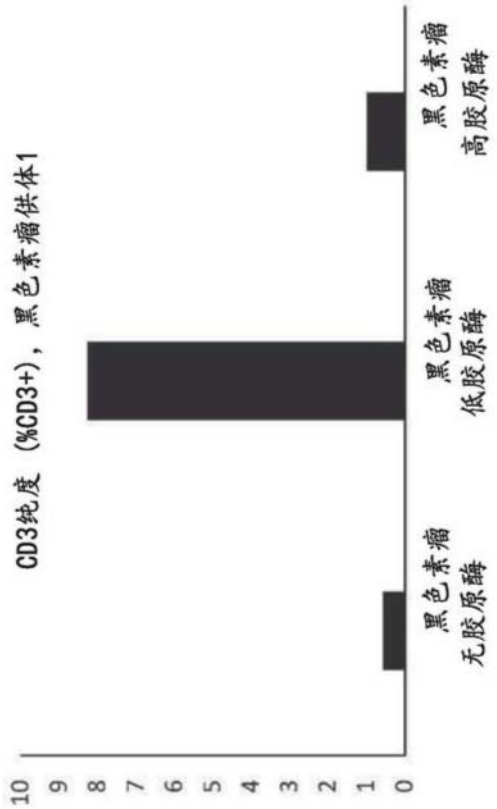


FIG.15B

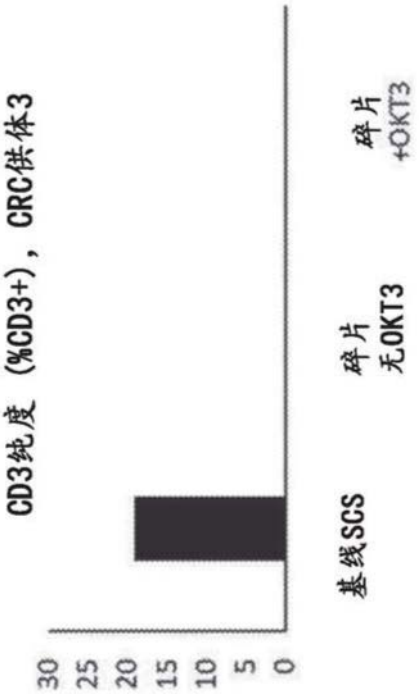


FIG.15C

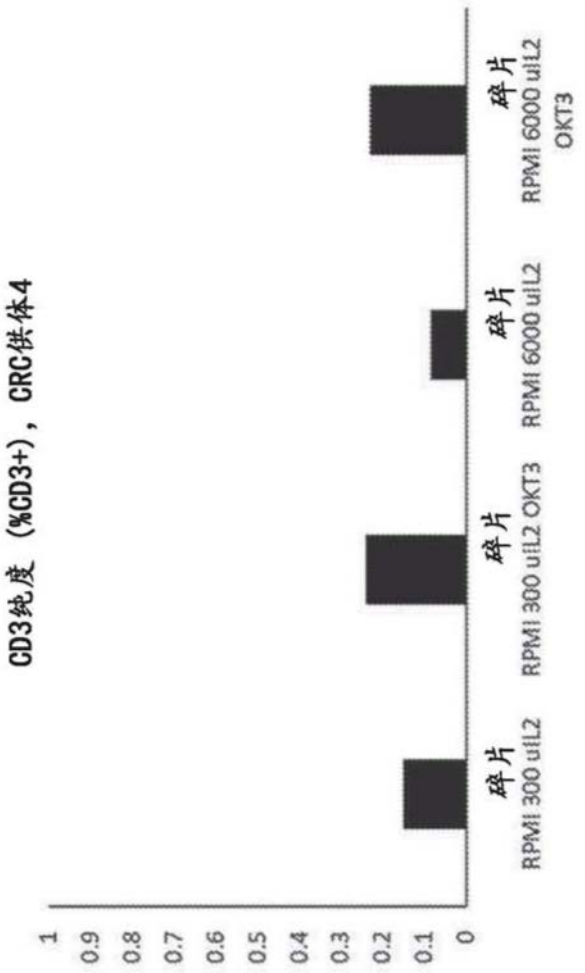

CD3纯度 (%CD3+), CRC供体4
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
碎片
RPMI 300 uIL2
碎片
RPMI 300 uIL2 OKT3
碎片
RPMI 6000 uIL2
碎片
RPMI 6000 uIL2 OKT3

FIG.15D

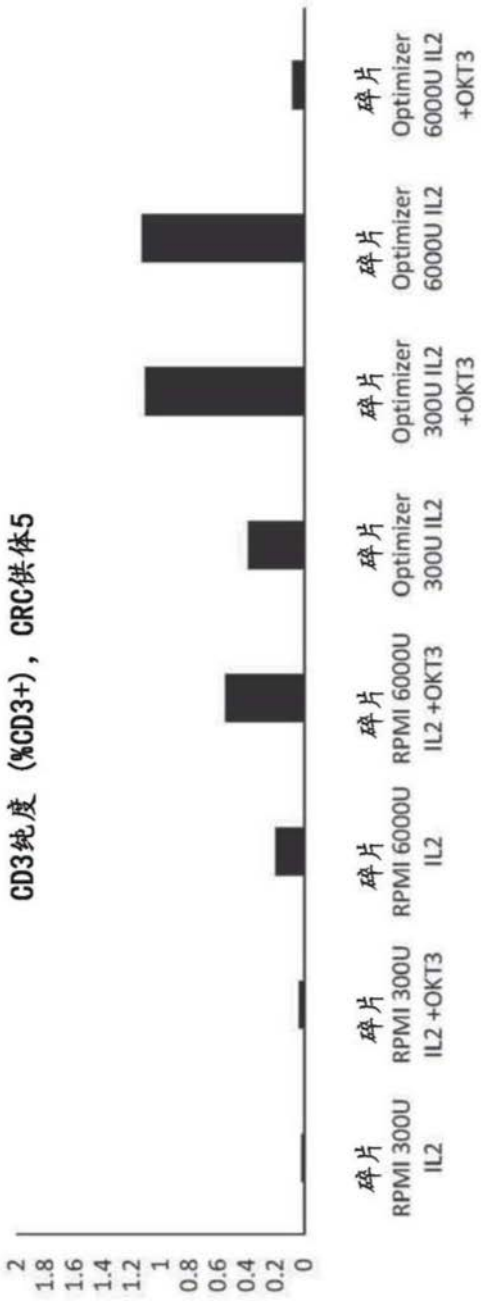

CD3纯度（%CD3+），CRC供体5
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
碎片 RPMI 300U IL2
碎片 RPMI 300U IL2 +OKT3
碎片 RPMI 6000U IL2
碎片 RPMI 6000U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 300U IL2
碎片 Optimizer 300U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 6000U IL2
碎片 Optimizer 6000U IL2 +OKT3

FIG.15E

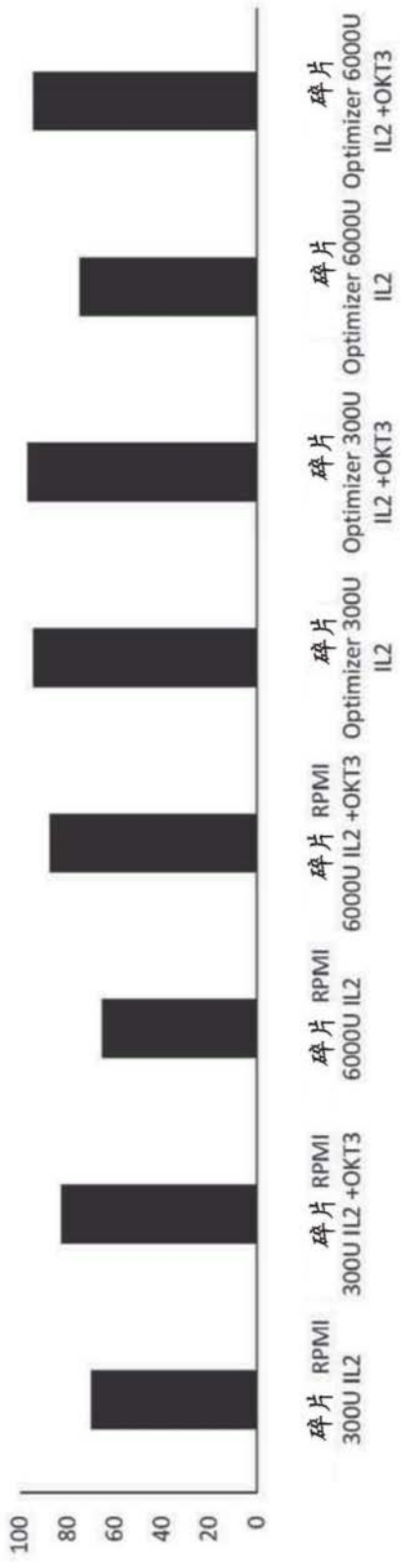

CD3纯度（%CD3+），黑色素瘤供体3
100
80
60
40
20
0
碎片 RPMI 300U IL2
碎片 RPMI 300U IL2 +OKT3
碎片 RPMI 6000U IL2
碎片 RPMI 6000U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 300U IL2
碎片 Optimizer 300U IL2 +OKT3
碎片 Optimizer 6000U IL2
碎片 Optimizer 6000U IL2 +OKT3

FIG.16

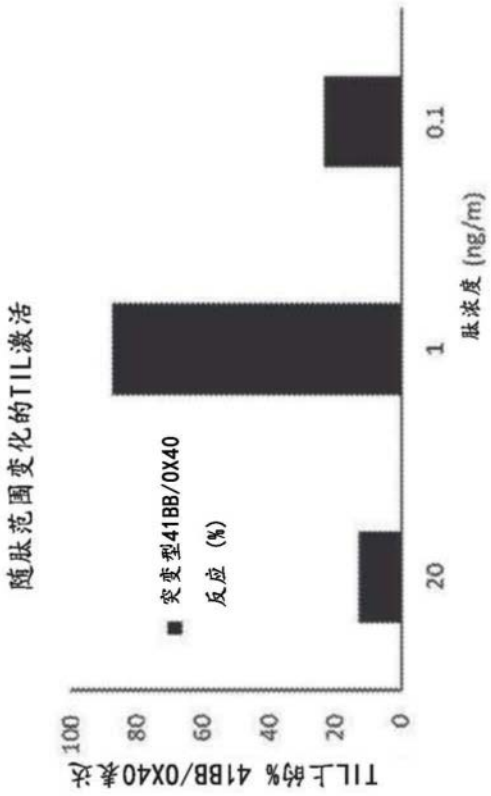

随肽范围变化的TIL激活
突变型41BB/OX40
反应 (%)
肽浓度 (ng/m)
0.1
1
20
0
20
40
60
80
100
TIL上的% 41BB/OX40表达

FIG.17A

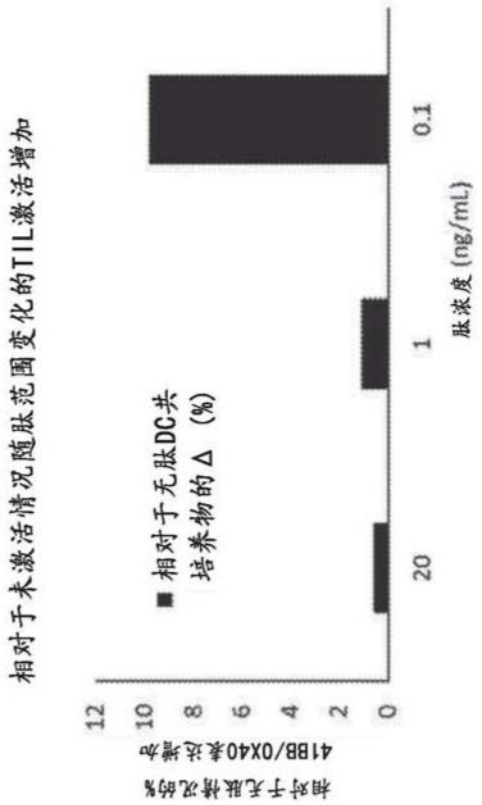


FIG.17B

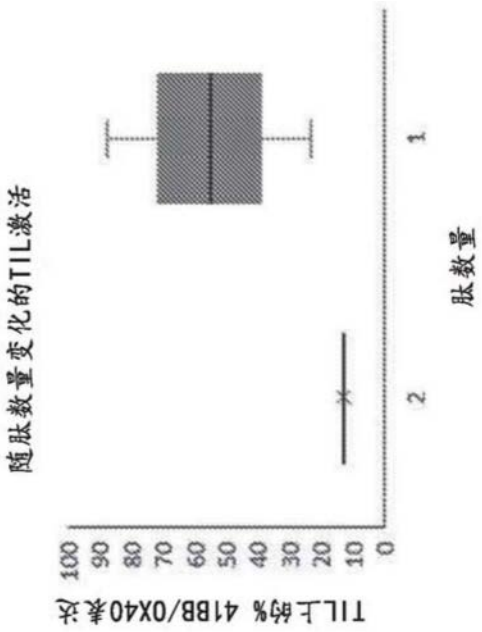


FIG.18A

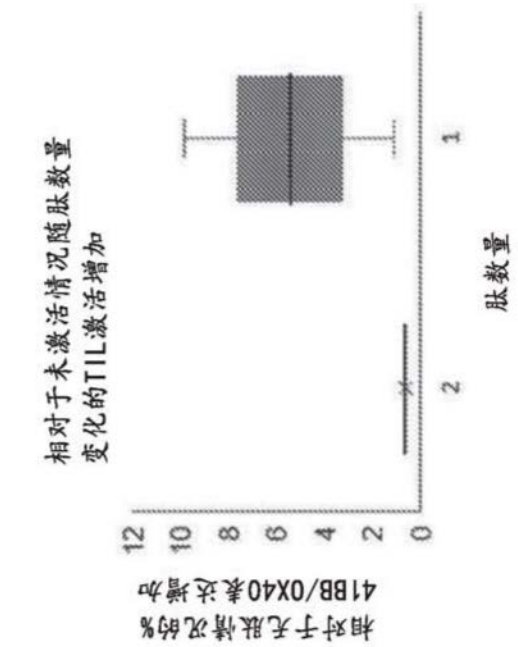


FIG.18B

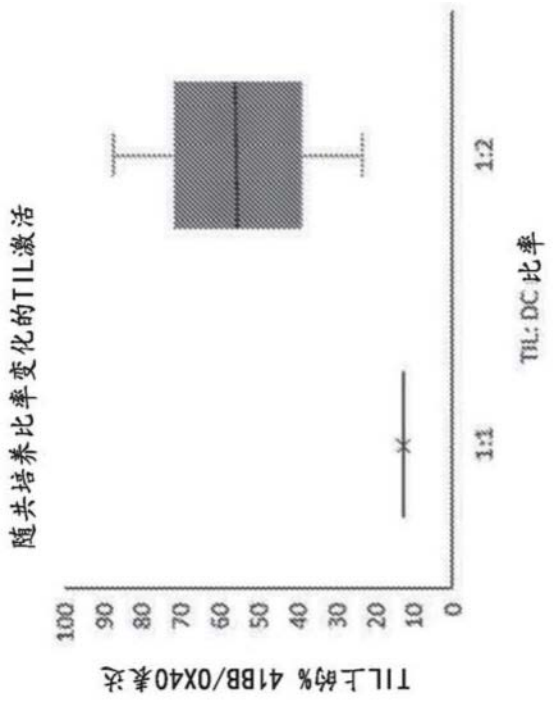


FIG.19A

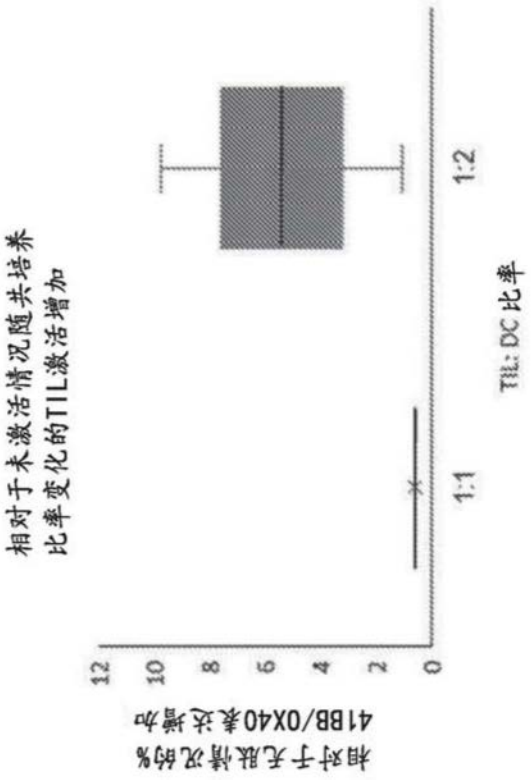


FIG.19B

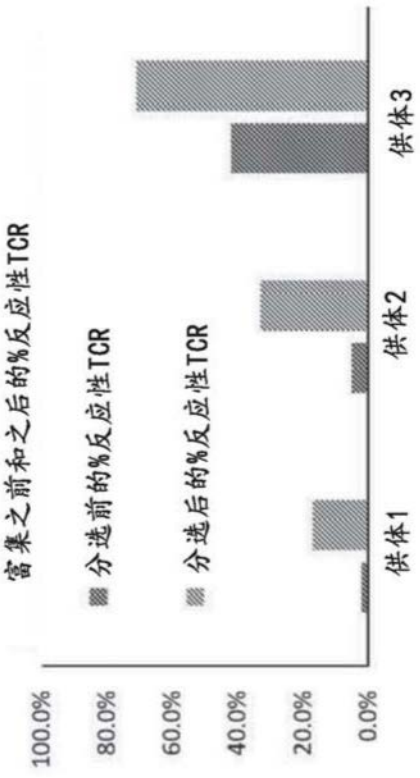


FIG.20A

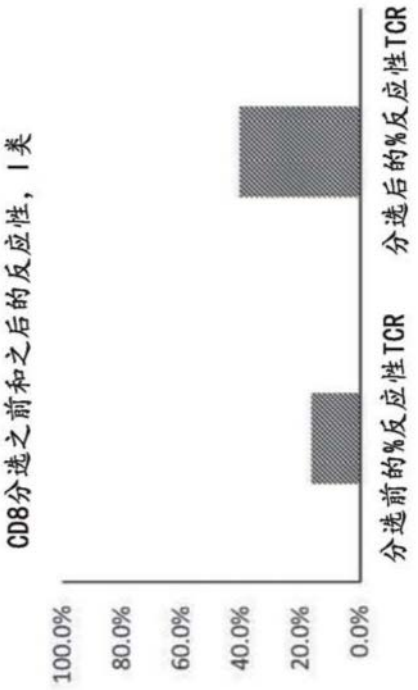


FIG.20B

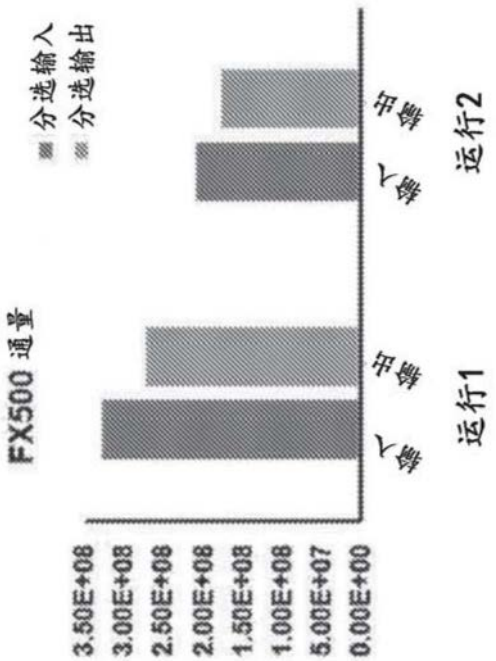


FIG.21A

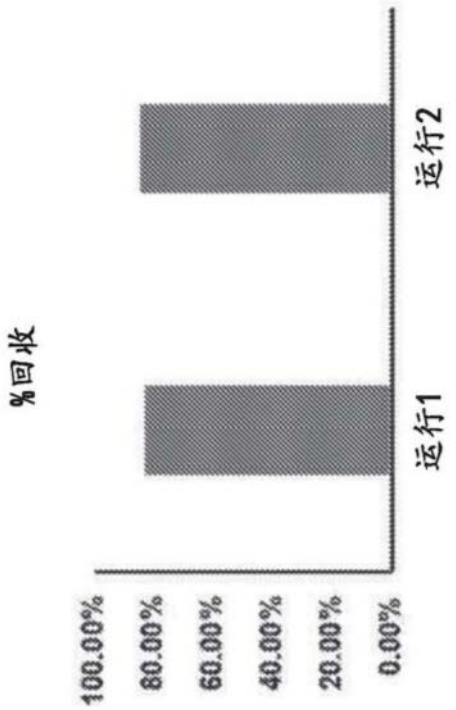


FIG.21B

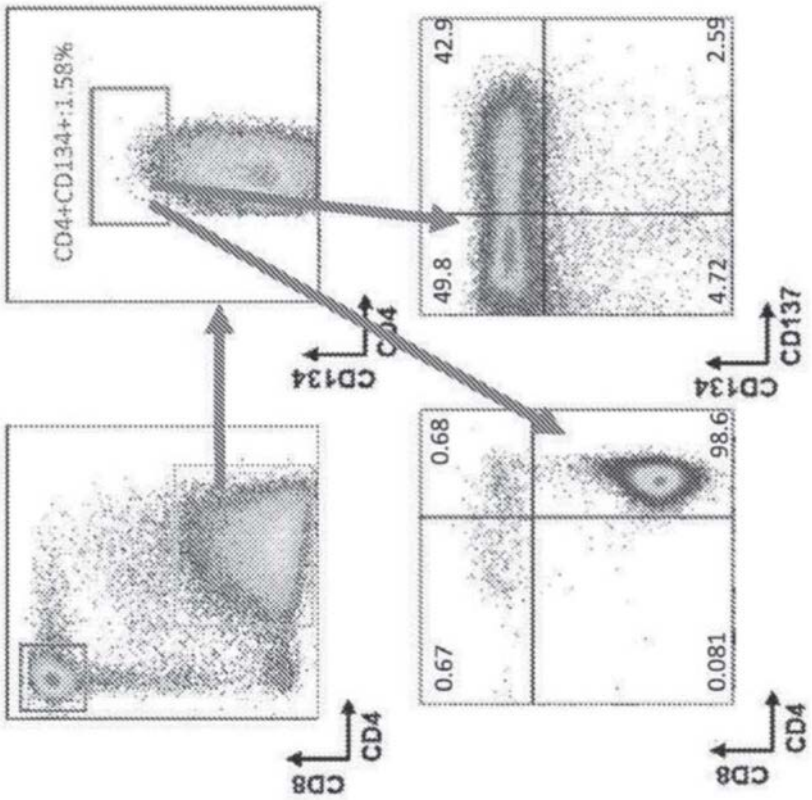


FIG.22

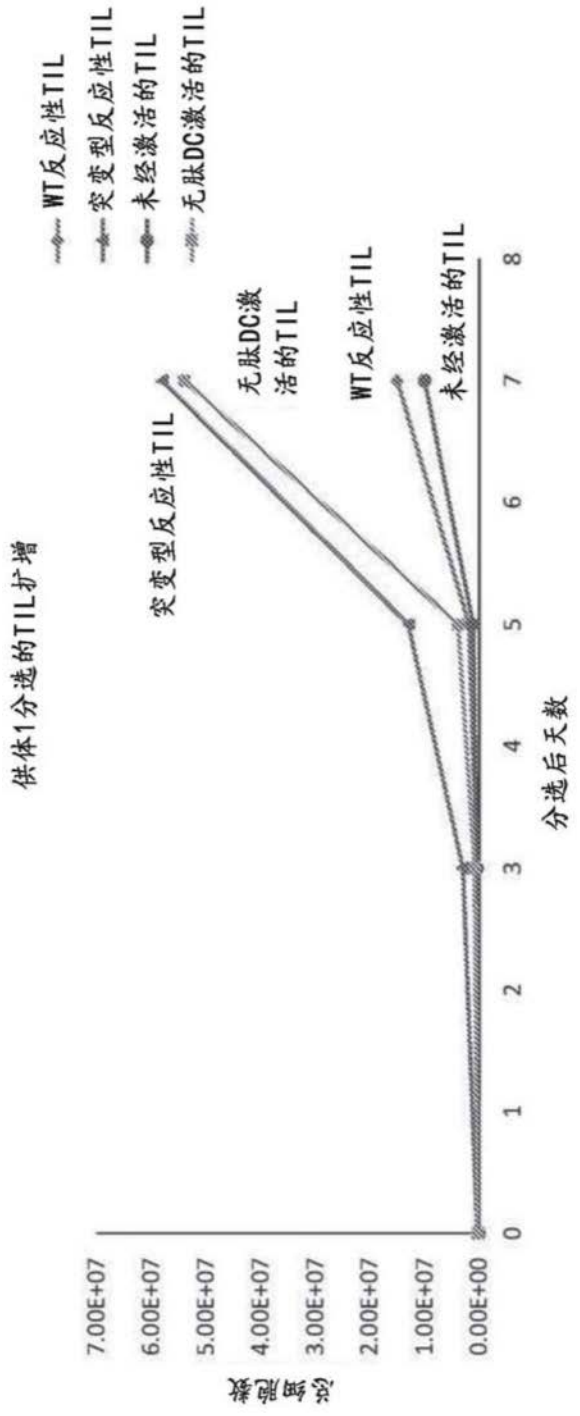

WT反应性TIL
突变型反应性TIL
未经激活的TIL
无肽DC激活的TIL
供体1分选的TIL扩增
突变型反应性TIL
无肽DC激活的TIL
WT反应性TIL
未经激活的TIL
分选后天数
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0.00E+00
1.00E+07
2.00E+07
3.00E+07
4.00E+07
5.00E+07
6.00E+07
7.00E+07

FIG.23A

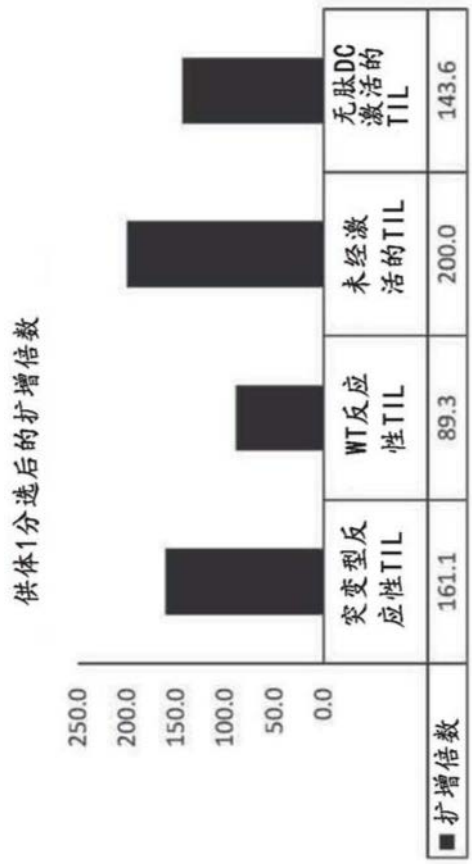

供体1分选后的扩增倍数
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
突变型反应性TIL
WT反应性TIL
未经激活的TIL
无肽DC激活的TIL
■扩增倍数
161.1
89.3
200.0
143.6

FIG.23B

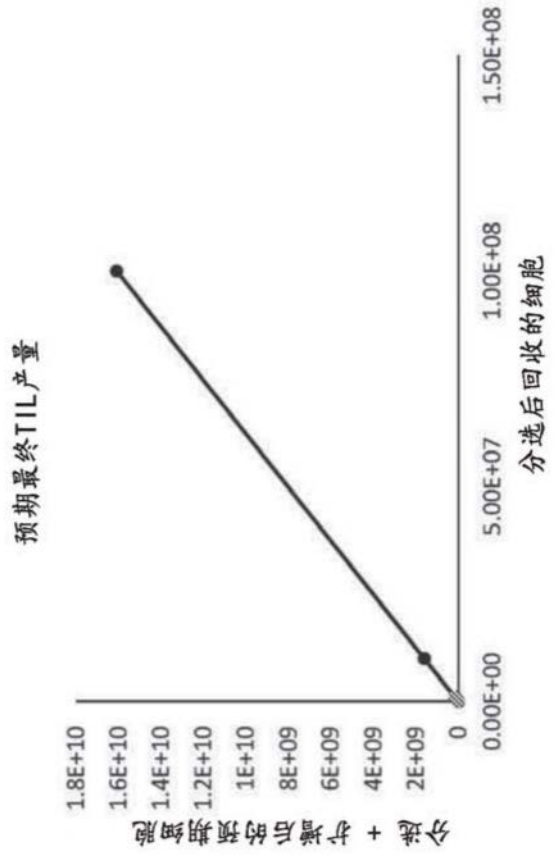

预期最终TIL产量
分选后回收的细胞
0.00E+00
5.00E+07
1.00E+08
1.50E+08
0
2E+09
4E+09
6E+09
8E+09
1E+10
1.2E+10
1.4E+10
1.6E+10
1.8E+10

FIG.23C

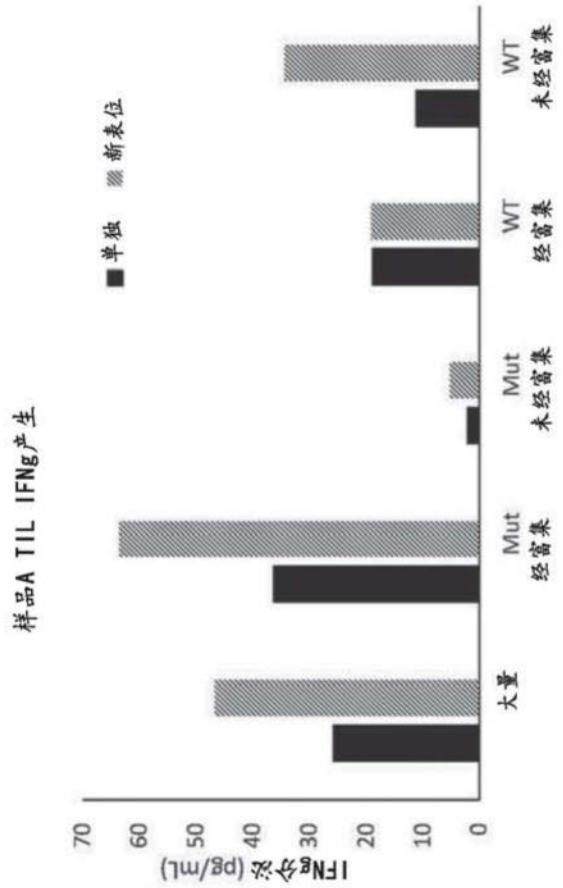


FIG.24A

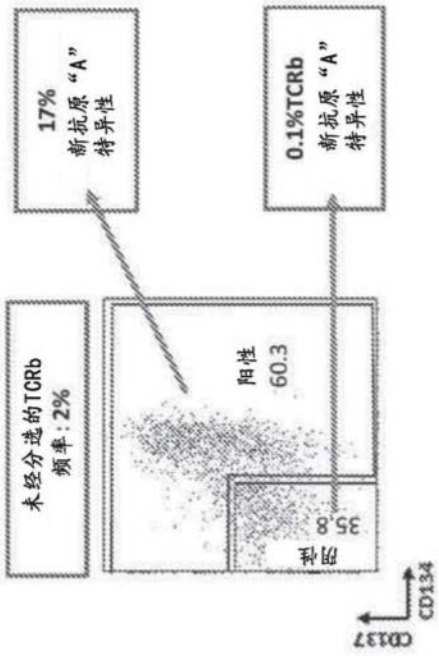


FIG.24B

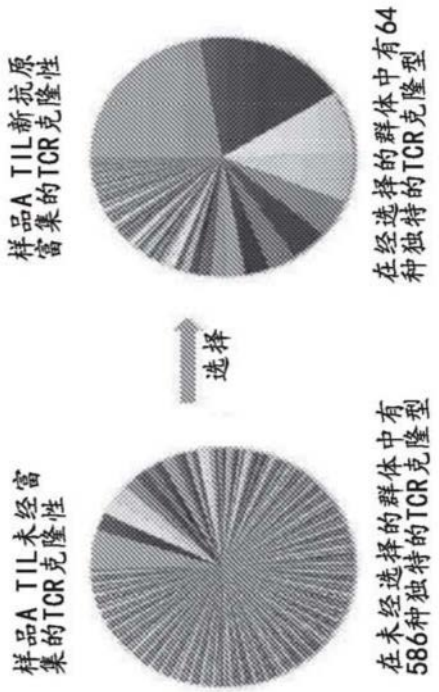


FIG.24C

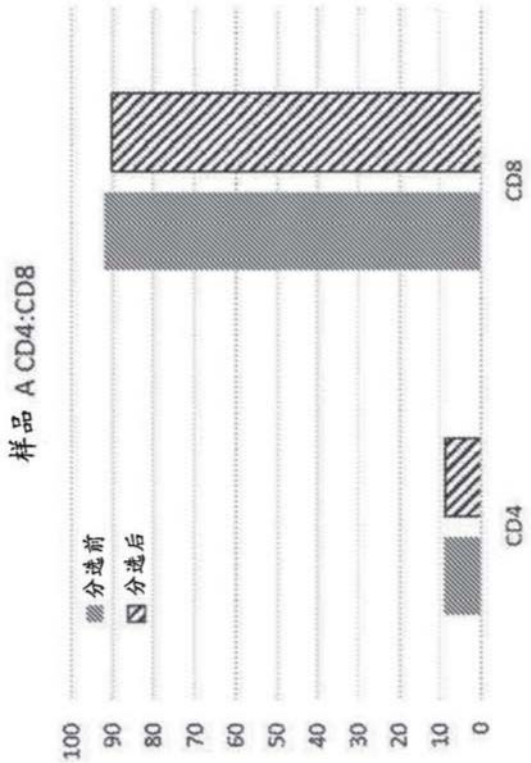


FIG.24D

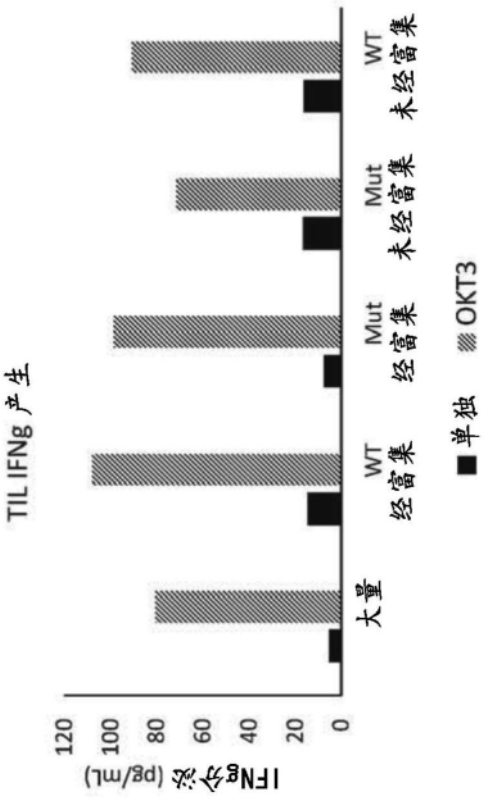


FIG.25A

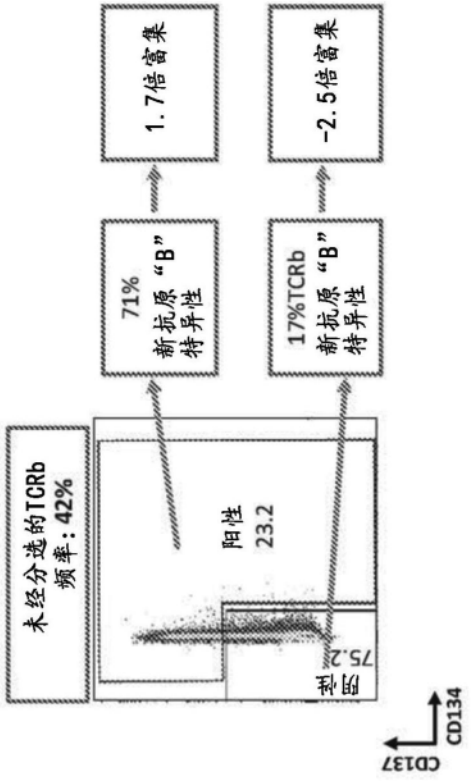


FIG.25B

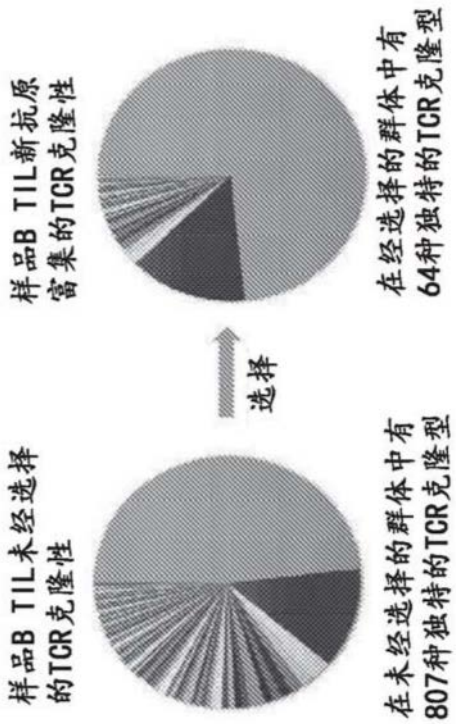


FIG.25C

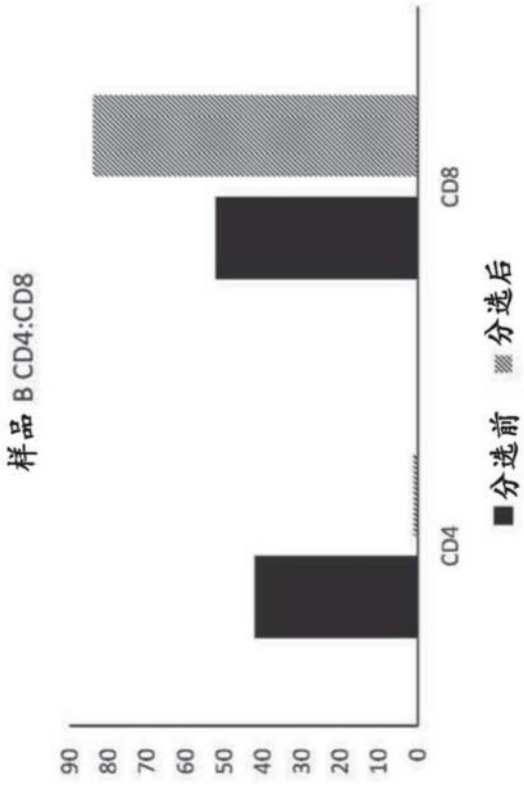


FIG.25D

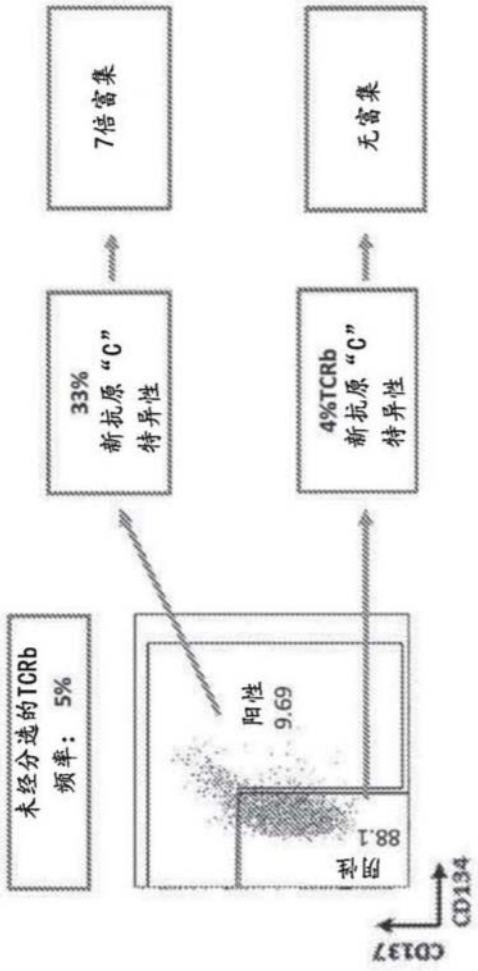

7倍富集
无富集
33%
新抗原“C”
特异性
4%TCRb
新抗原“C”
特异性
未经分选的TCRb
频率： 5%
阳性
9.69
88.1
CD134
CD137

FIG.26A

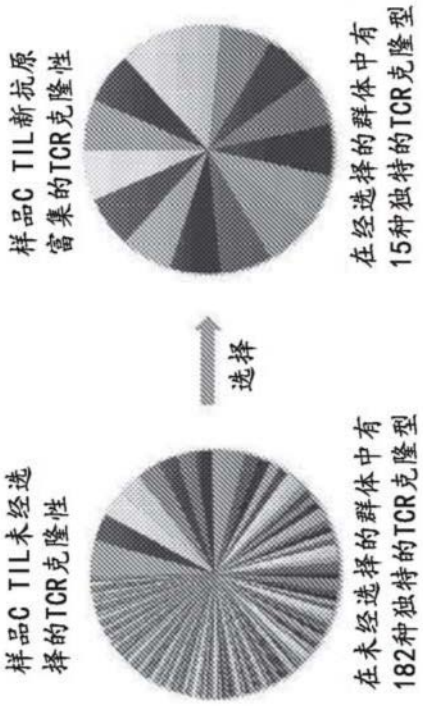

样品C TIL新抗原
富集的TCR克隆性
在经选择的群体中有
15种独特的TCR克隆型
选择
样品C TIL未经选
择的TCR克隆性
在未经选择的群体中有
182种独特的TCR克隆型

FIG.26B

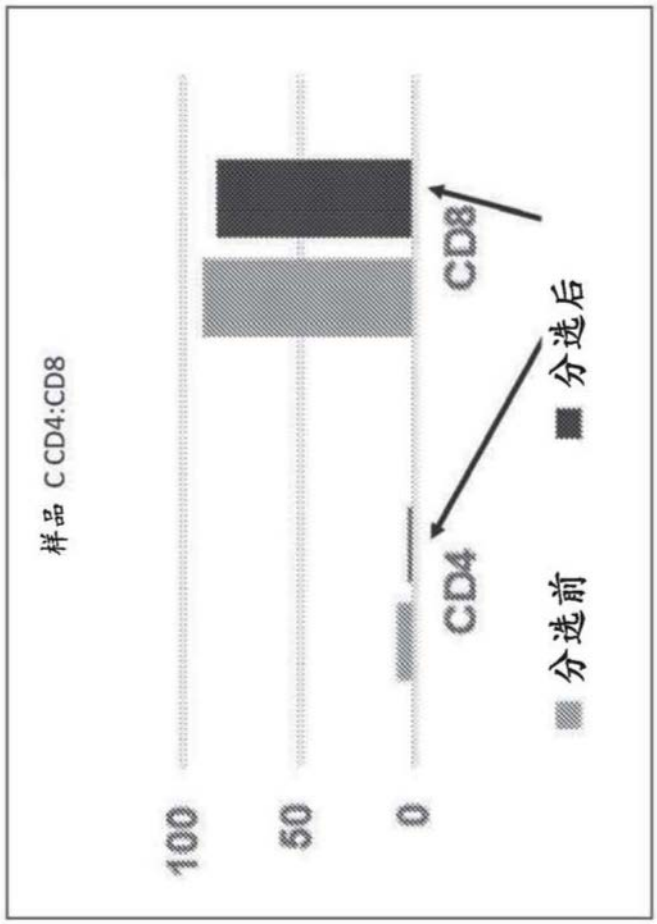


FIG.26C

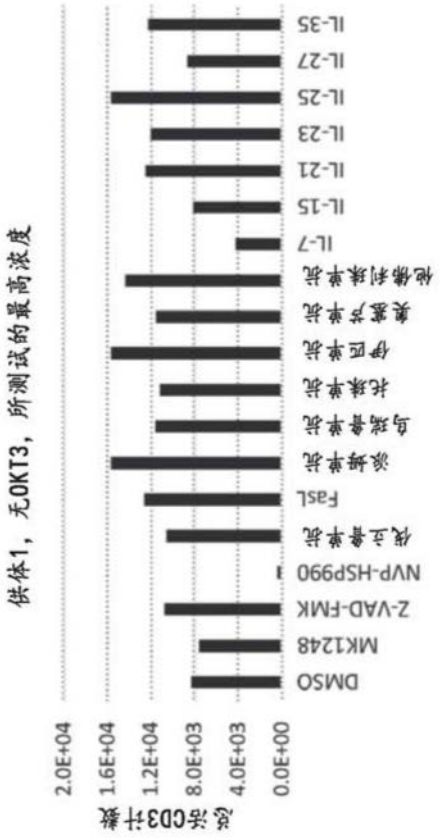

供体1，无OKT3，所测试的最高浓度
总活CD3计数
2.0E+04
1.6E+04
1.2E+04
8.0E+03
4.0E+03
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立昔单抗
FasL
泼姆单抗
乌瑞鲁单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芦单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.27A

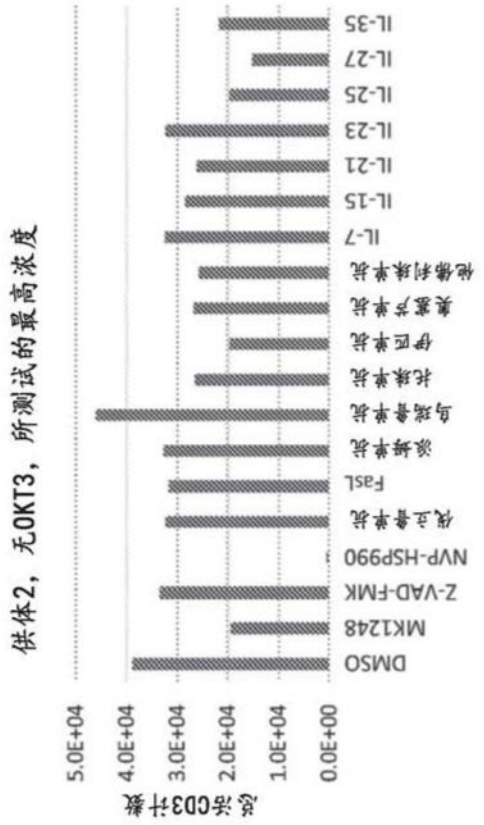

供体2，无OKT3，所测试的最高浓度
总活CD3计数
5.0E+04
4.0E+04
3.0E+04
2.0E+04
1.0E+04
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立昔单抗
FasL
奥姆单抗
乌司奴单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芦单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.27B

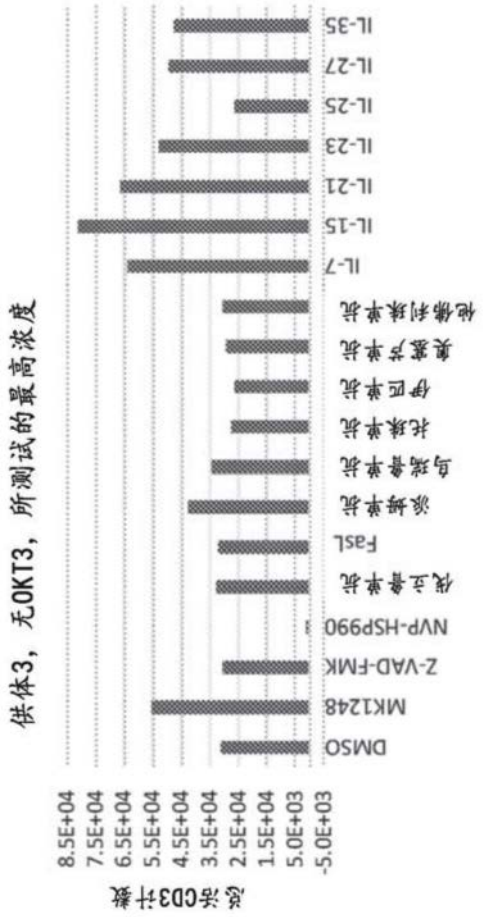

供体3，无OKT3，所测试的最高浓度
总活CD3计数
8.5E+04
7.5E+04
6.5E+04
5.5E+04
4.5E+04
3.5E+04
2.5E+04
1.5E+04
5.0E+03
-5.0E+03
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立鲁单抗
FasL
泼姆单抗
乌瑞鲁单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芬单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.27C

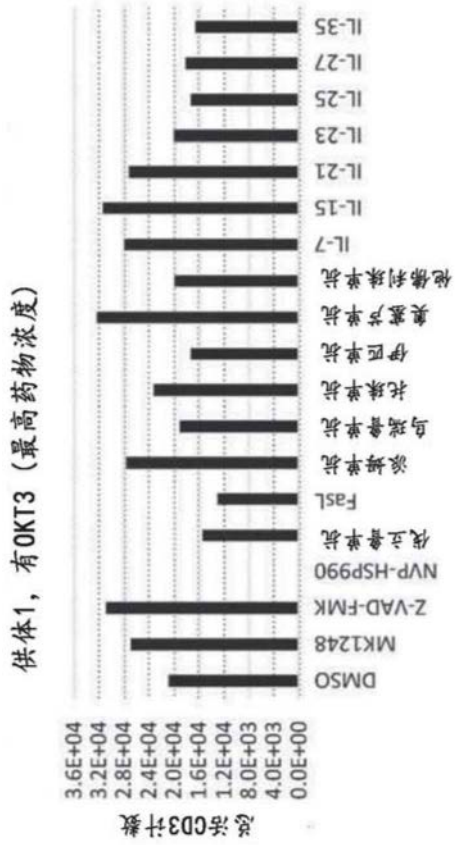

供体1，有OKT3（最高药物浓度）
总活CD3计数
3.6E+04
3.2E+04
2.8E+04
2.4E+04
2.0E+04
1.6E+04
1.2E+04
8.0E+03
4.0E+03
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立昔单抗
FasL
泼赛单抗
马瑞鲁单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芬单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.28A

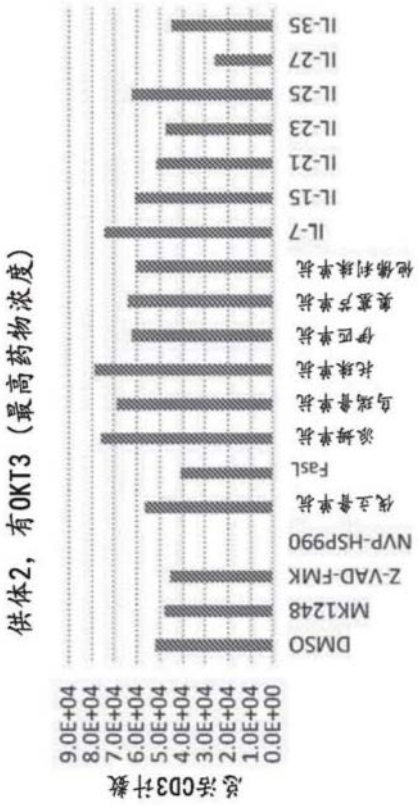

供体2，有OKT3（最高药物浓度）
总活CD3计数
9.0E+04
8.0E+04
7.0E+04
6.0E+04
5.0E+04
4.0E+04
3.0E+04
2.0E+04
1.0E+04
0.0E+00
DMSO
MK1248
Z-VAD-FMK
NVP-HSP990
伏立昔单抗
FasL
泼坦单抗
马戈鲁单抗
托珠单抗
伊匹单抗
奥塞芳单抗
他佛利珠单抗
IL-7
IL-15
IL-21
IL-23
IL-25
IL-27
IL-35

FIG.28B

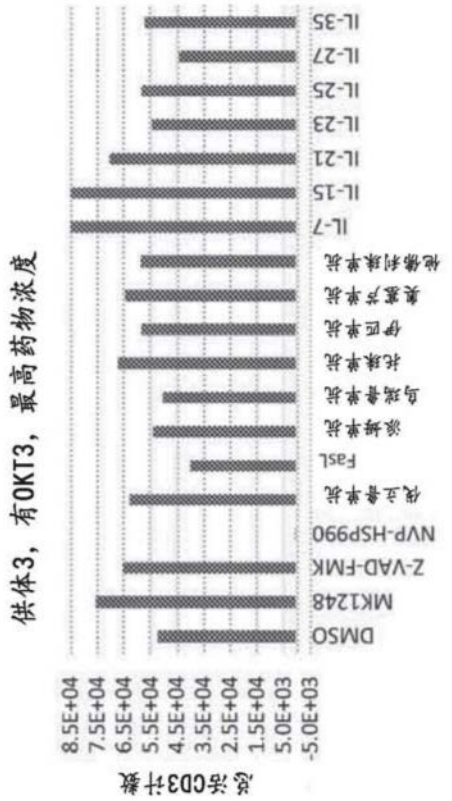


FIG.28C

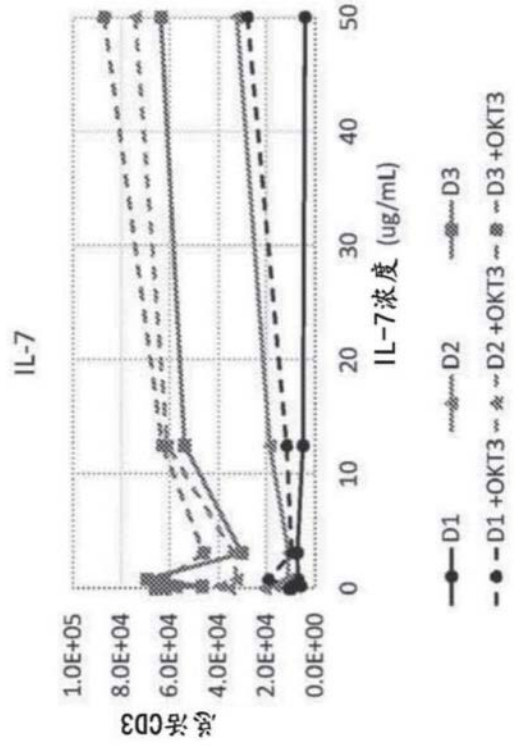


FIG.29A

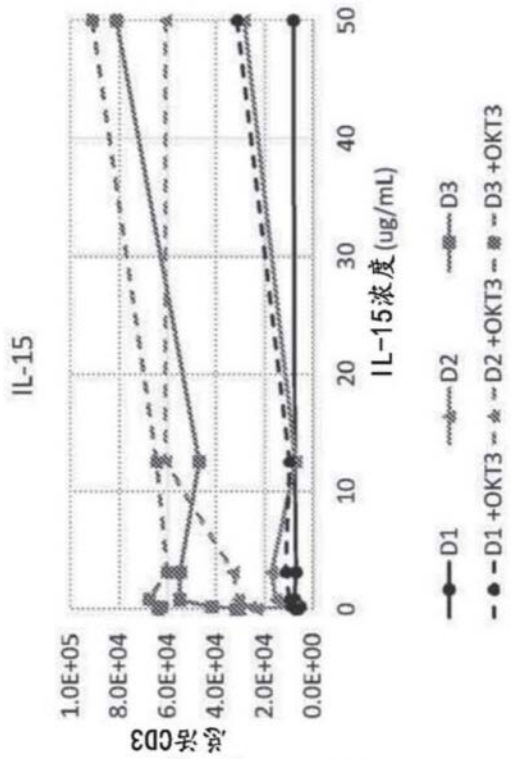

IL-15
1.0E+05
8.0E+04
6.0E+04
4.0E+04
2.0E+04
0.0E+00
0
10
20
30
40
50
IL-15浓度(ug/mL)
D1
D2
D3
D1 +OKT3
D2 +OKT3
D3 +OKT3

FIG.29B

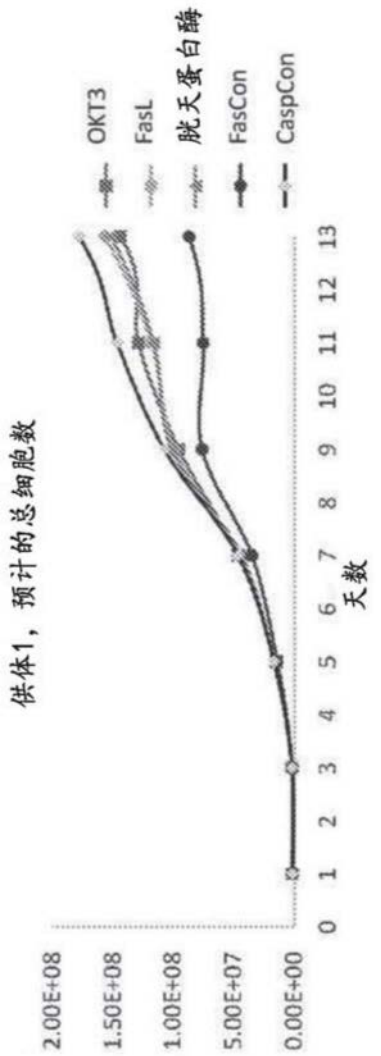

供体1，预计的总细胞数
2.00E+08
1.50E+08
1.00E+08
5.00E+07
0.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数
OKT3
FasL
肢天蛋白酶
FasCon
CaspCon

FIG.30A

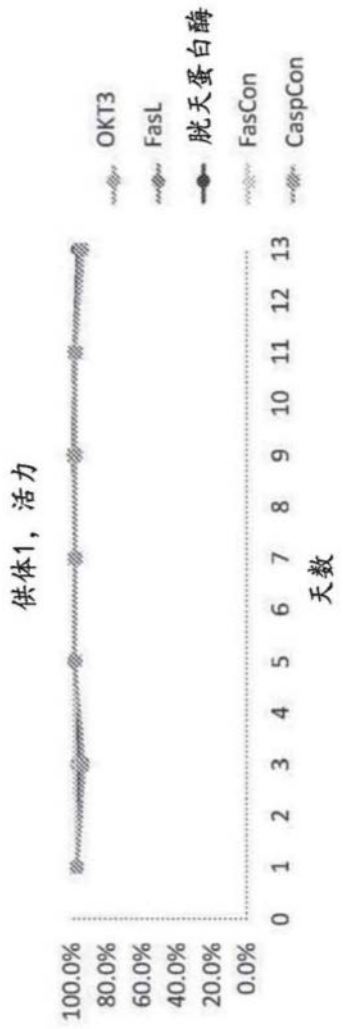

OKT3
FasL
脱天蛋白酶
FasCon
CaspCon
供体1，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数

FIG.30B

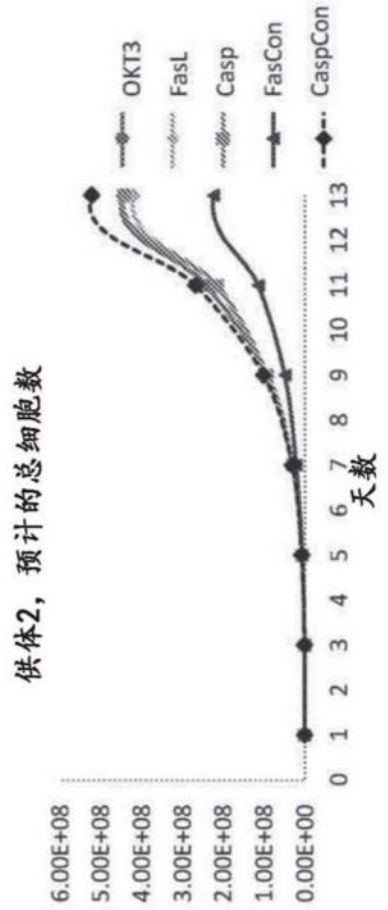

供体2，预计的总细胞数
6.00E+08
5.00E+08
4.00E+08
3.00E+08
2.00E+08
1.00E+08
0.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数
OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon

FIG.31A


OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon
供体2，活力
100.0%
50.0%
0.0%
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数

FIG.31B

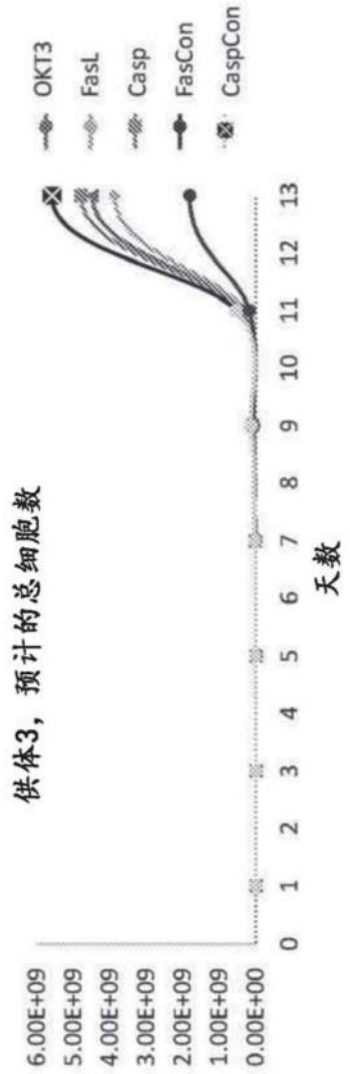

OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon
供体3，预计的总细胞数
6.00E+09
5.00E+09
4.00E+09
3.00E+09
2.00E+09
1.00E+09
0.00E+00
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
天数

FIG.32A

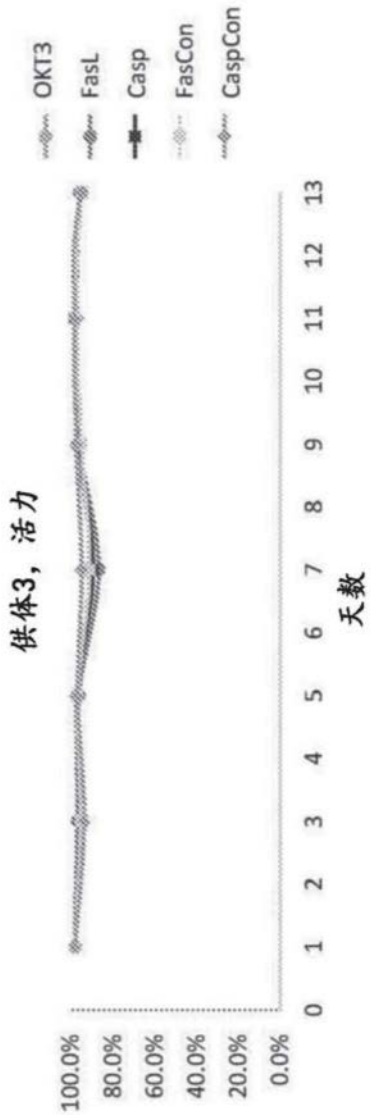

OKT3
FasL
Casp
FasCon
CaspCon
供体3，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
天数

FIG.32B

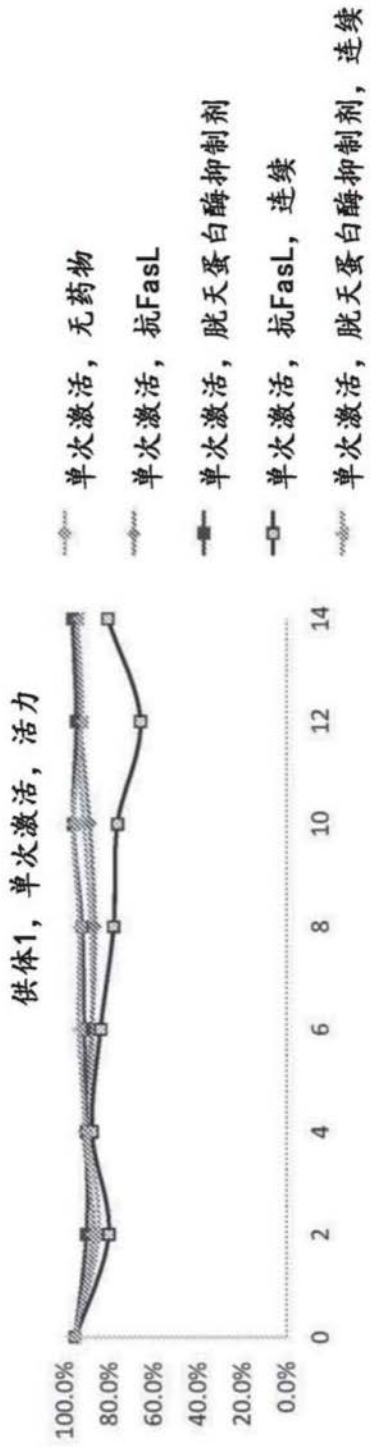

供体1，单次激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
单次激活，无药物
单次激活，抗FasL
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂
单次激活，抗FasL，连续
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续

FIG.33A


供体2，单次激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
单次激活，无药物
单次激活，抗FasL
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂
单次激活，抗FasL，连续
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续

FIG.33B


供体1，单次激活，预计的总细胞数
1.4E+09
1.2E+09
1E+09
800000000
600000000
400000000
200000000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
单次激活，无药物
单次激活，抗FasL
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂
单次激活，抗FasL，连续
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续

FIG.34A

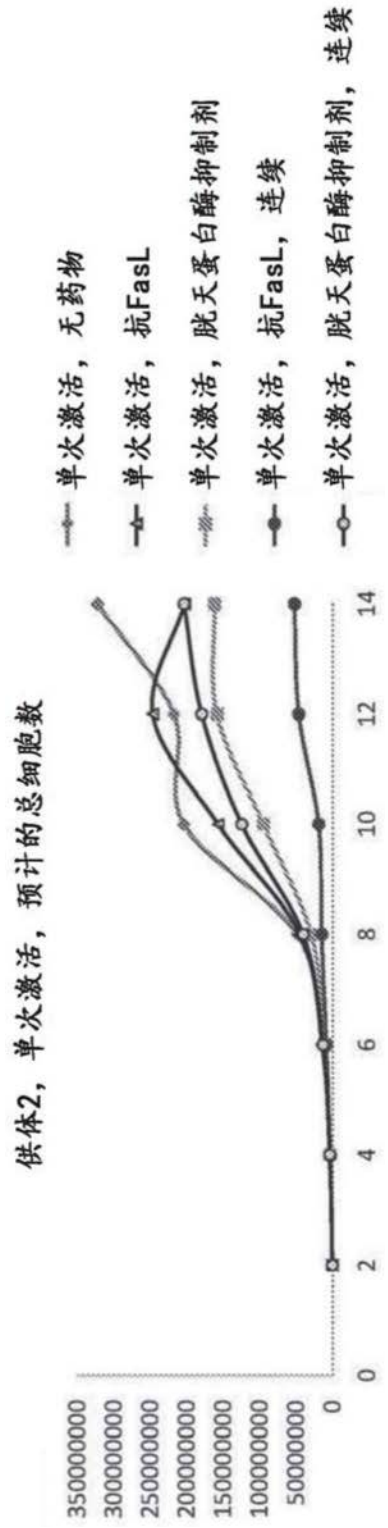

单次激活，无药物
单次激活，抗FasL
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂
单次激活，抗FasL，连续
单次激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续
供体2，单次激活，预计的总细胞数
350000000
300000000
250000000
200000000
150000000
100000000
50000000
0
0
2
4
6
8
10
12
14

FIG.34B

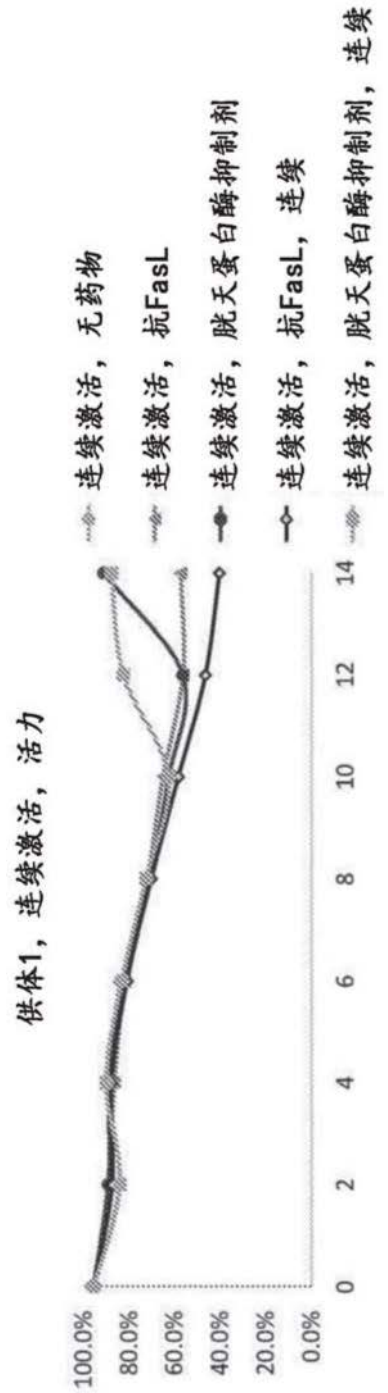

供体1，连续激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，胱天蛋白酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续
连续激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续

FIG.35A

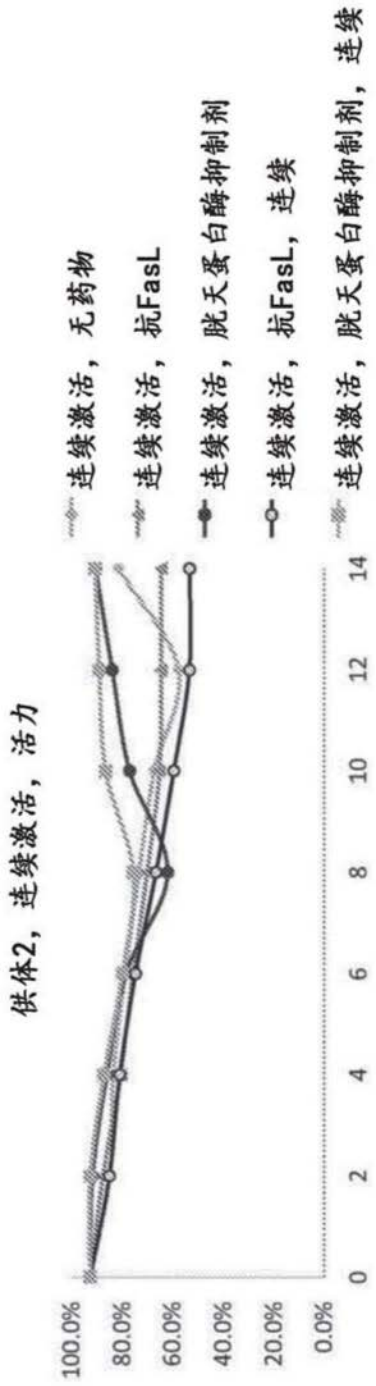

供体2，连续激活，活力
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
0
2
4
6
8
10
12
14
连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，胱天蛋白酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续
连续激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续

FIG.35B

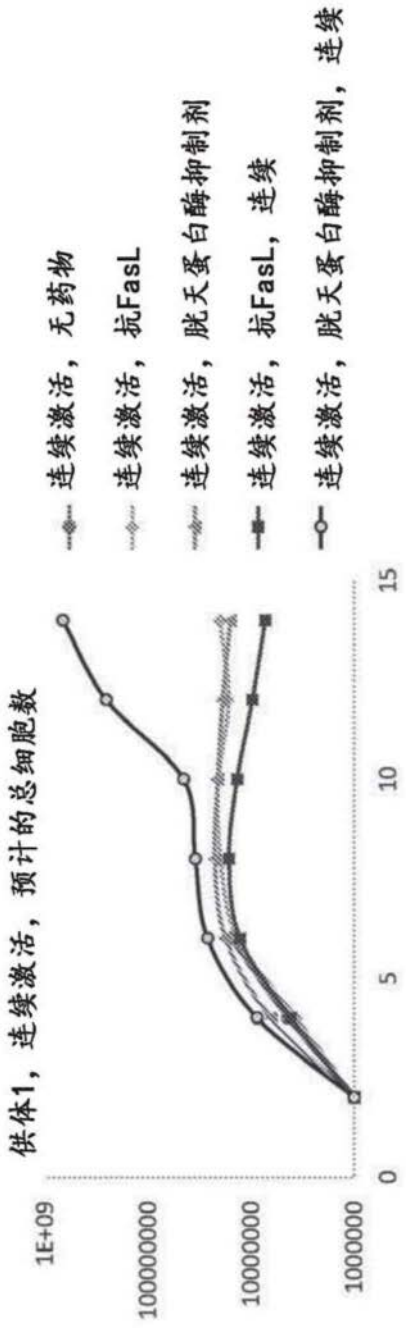

供体1，连续激活，预计的总细胞数
1E+09
100000000
10000000
1000000
0
5
10
15
连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，胱天蛋白酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续
连续激活，胱天蛋白酶抑制剂，连续

FIG.36A

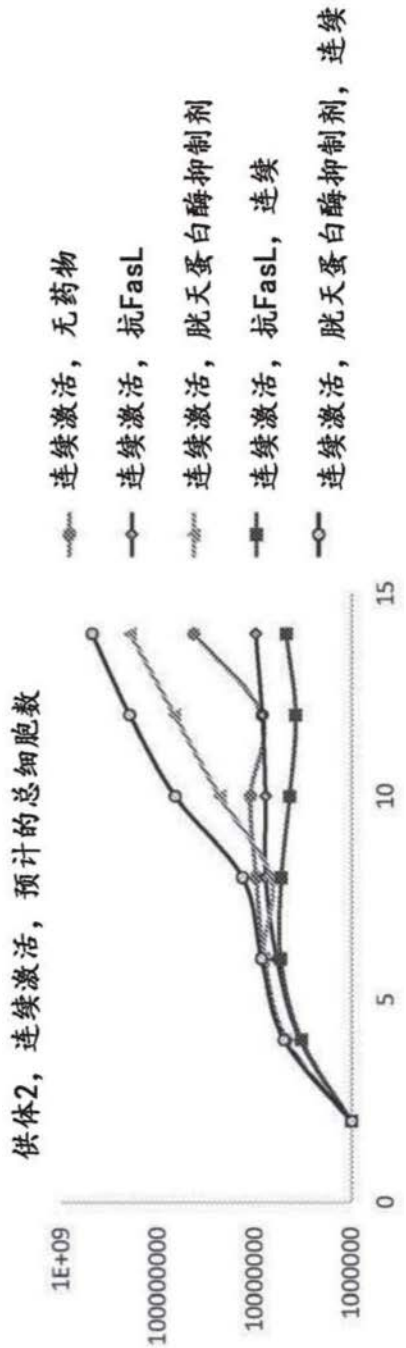
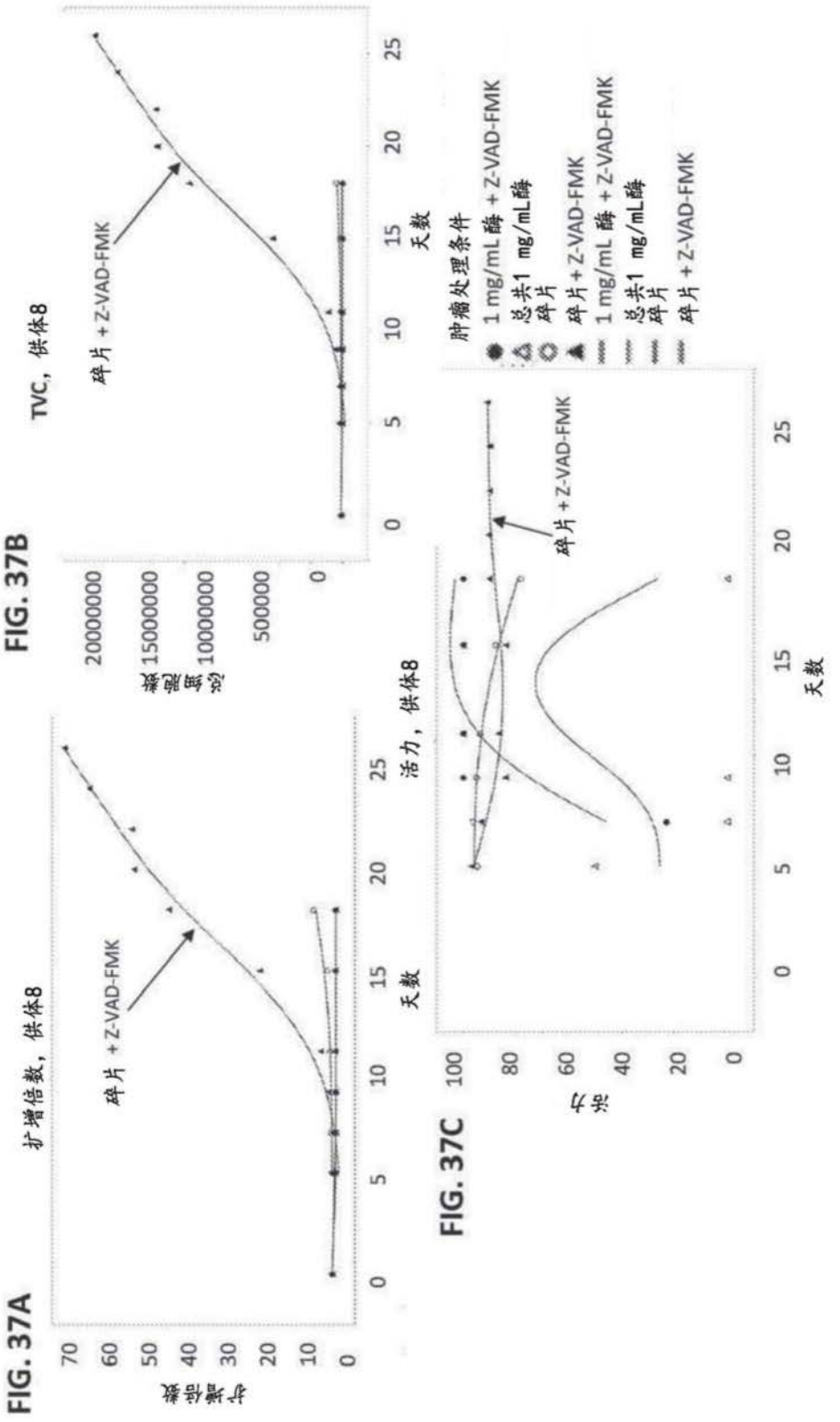

连续激活，无药物
连续激活，抗FasL
连续激活，脱天蚕白酶抑制剂
连续激活，抗FasL，连续
连续激活，脱天蚕白酶抑制剂，连续
供体2，连续激活，预计的总细胞数
1E+09
100000000
10000000
1000000
0
5
10
15

FIG.36B


FIG. 37A
扩增倍数，供体8
碎片 + Z-VAD-FMK
天数
FIG. 37B
TVC，供体8
碎片 + Z-VAD-FMK
天数
FIG. 37C
活力，供体8
碎片 + Z-VAD-FMK
天数
肿瘤处理条件
1 mg/mL 酶 + Z-VAD-FMK
总共1 mg/mL酶
碎片
碎片 + Z-VAD-FMK
1 mg/mL 酶 + Z-VAD-FMK
总共1 mg/mL酶
碎片
碎片 + Z-VAD-FMK

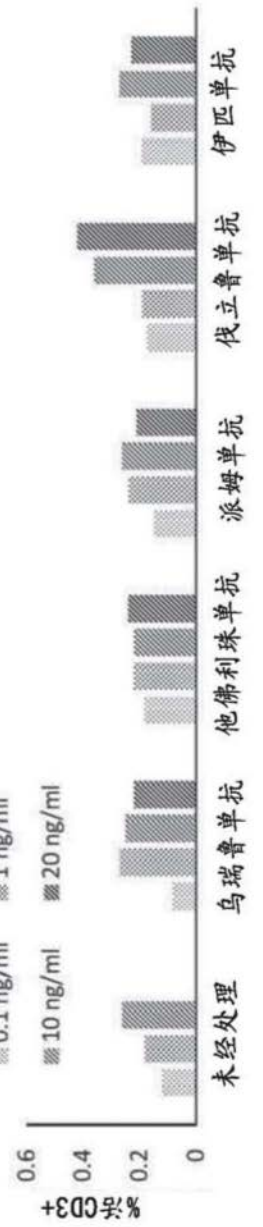

OX40表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
0.6
0.4
0.2
0
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.38A

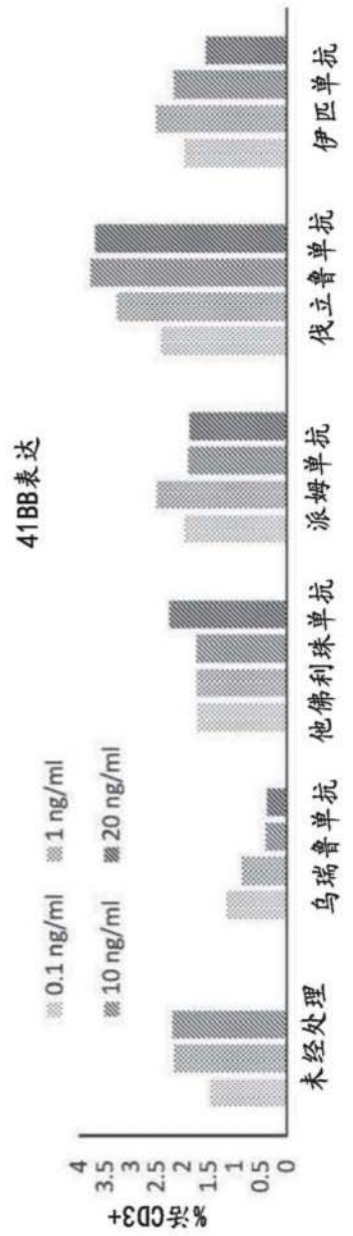
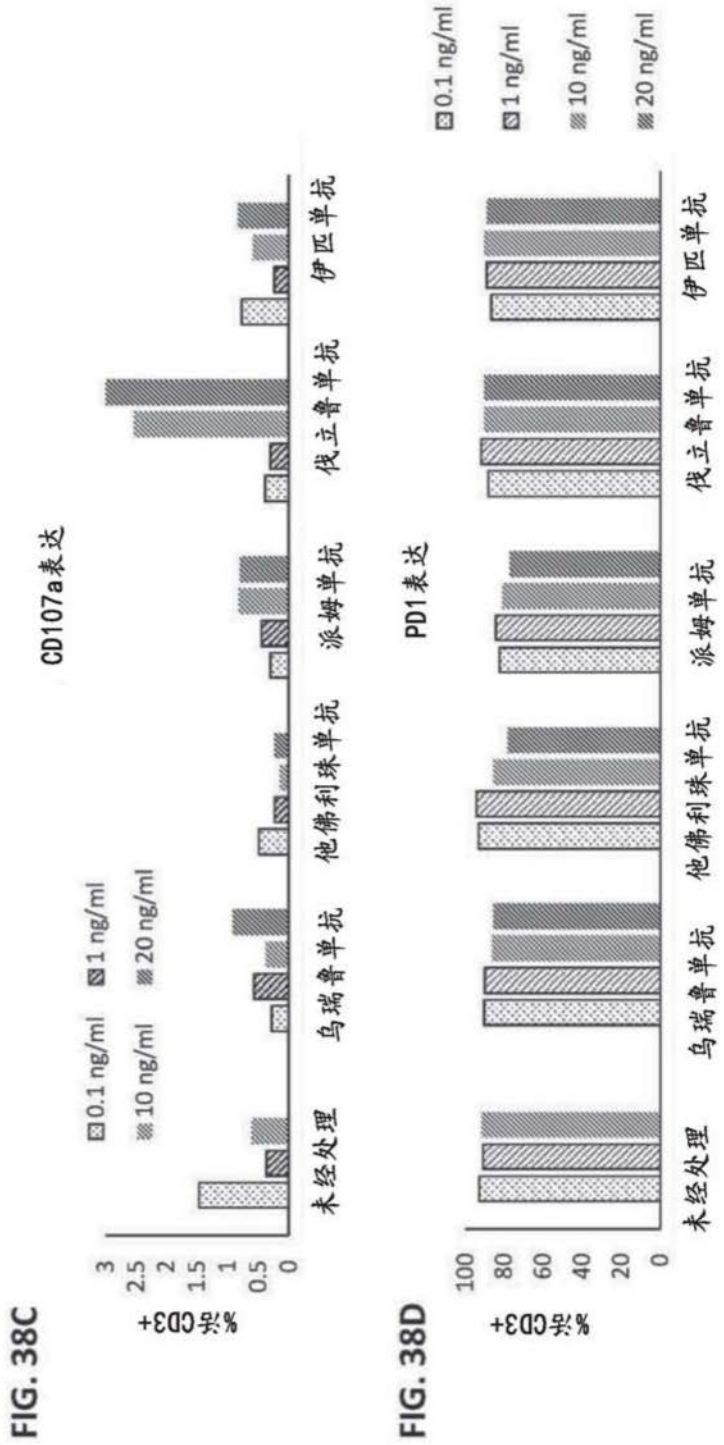

41BB表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0

FIG.38B


FIG. 38C
CD107a表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
%CD3+
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗
FIG. 38D
PD1表达
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
%CD3+
100
80
60
40
20
0
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

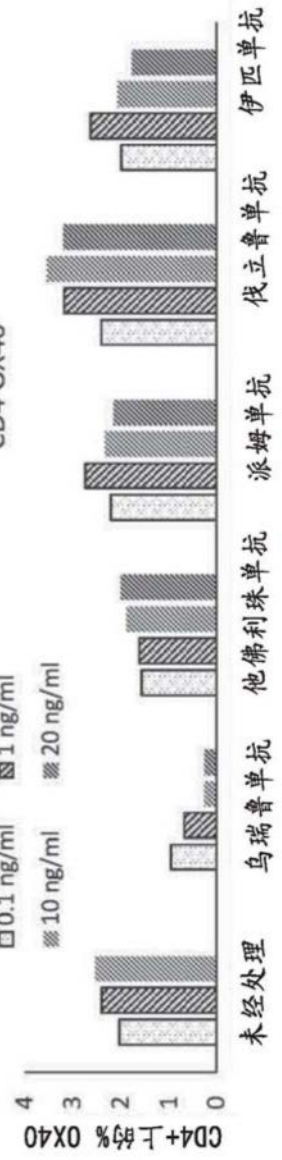

CD4 OX40
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+上的% OX40
0
1
2
3
4
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.39A

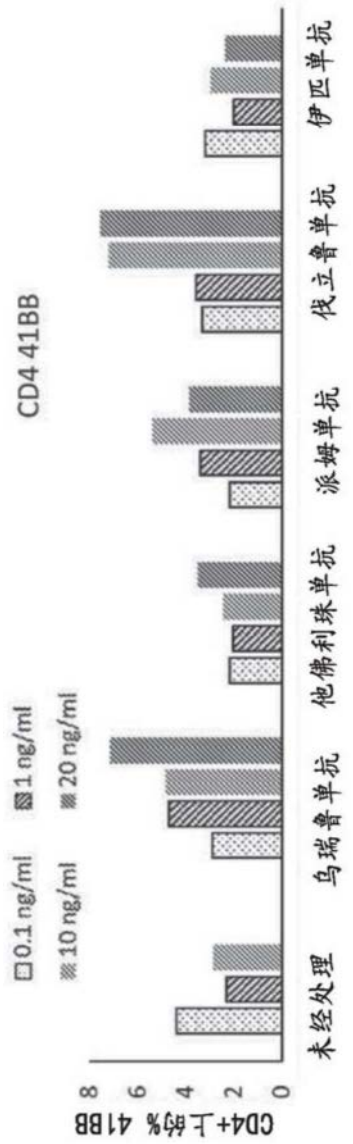

CD4 41BB
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD4+上的% 41BB
0
2
4
6
8
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.39B

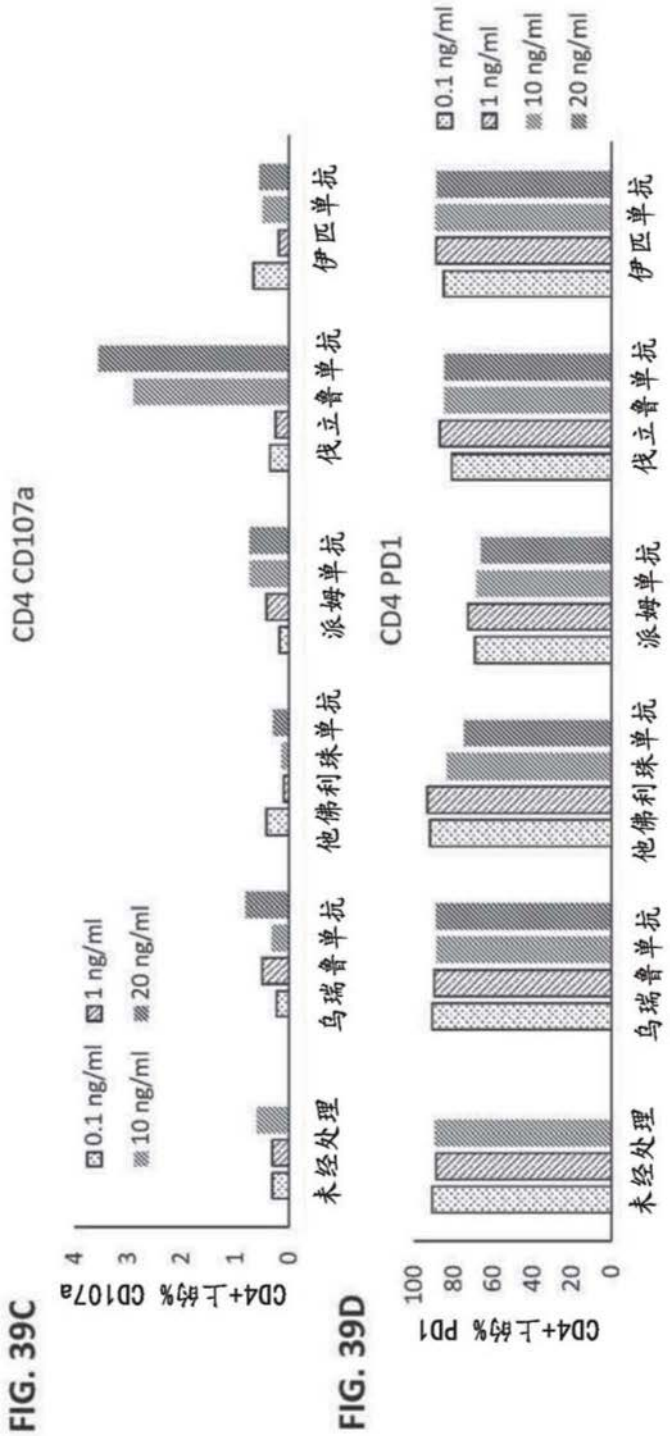


FIG. 39C

FIG. 39D

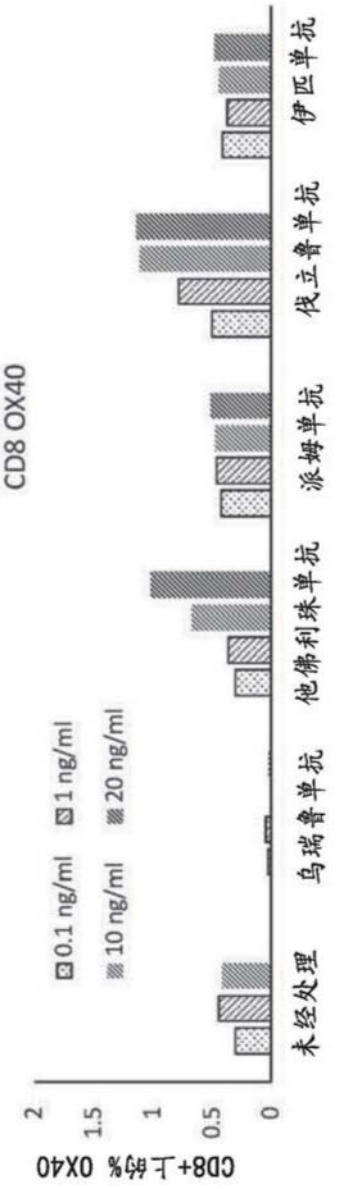

CD8 OX40
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8+上的% OX40
2
1.5
1
0.5
0
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40A

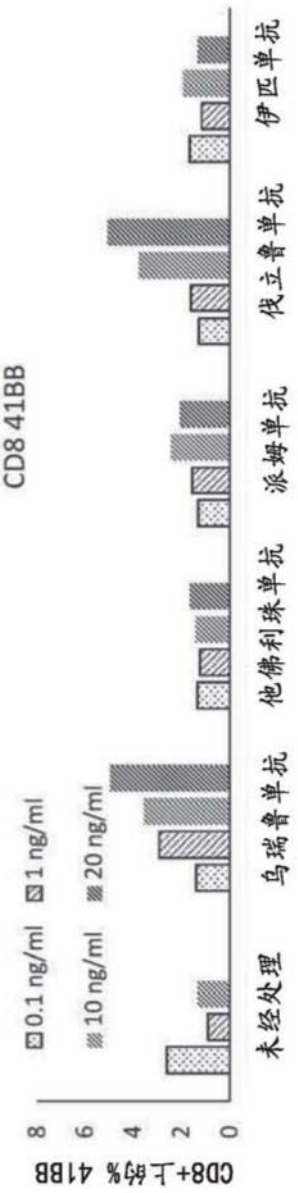

CD8 41BB
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8+上的% 41BB
0
2
4
6
8
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40B

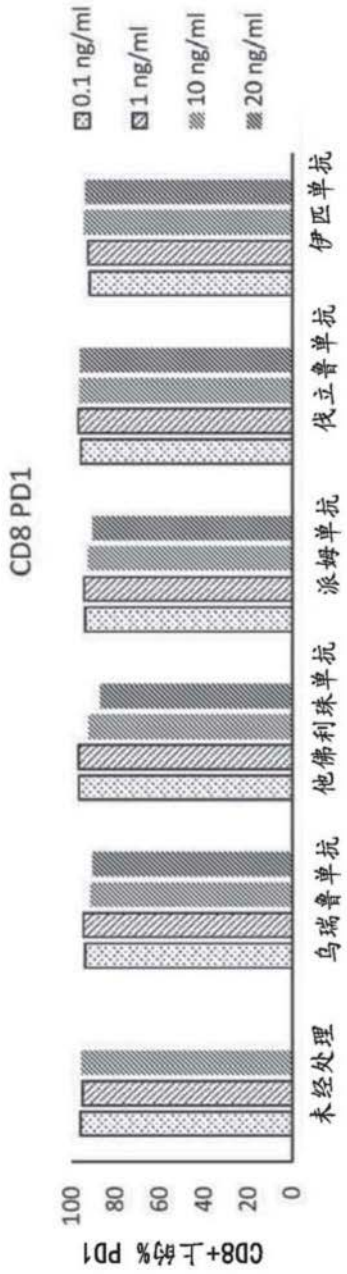

0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8 PD1
CD8+ T细胞% PD1
100
80
60
40
20
0
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40C

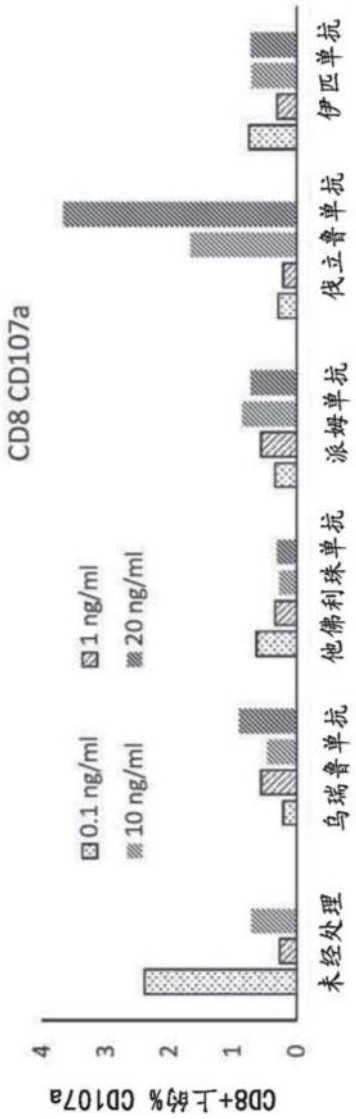

CD8 CD107a
0.1 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
20 ng/ml
CD8+ T 的% CD107a
0
1
2
3
4
未经处理
乌瑞鲁单抗
他佛利珠单抗
派姆单抗
伐立鲁单抗
伊匹单抗

FIG.40D

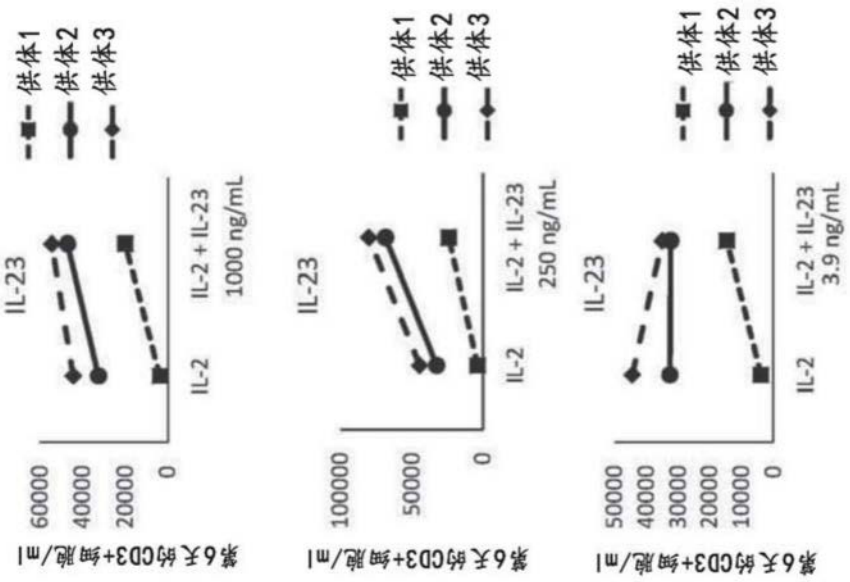


FIG.41A

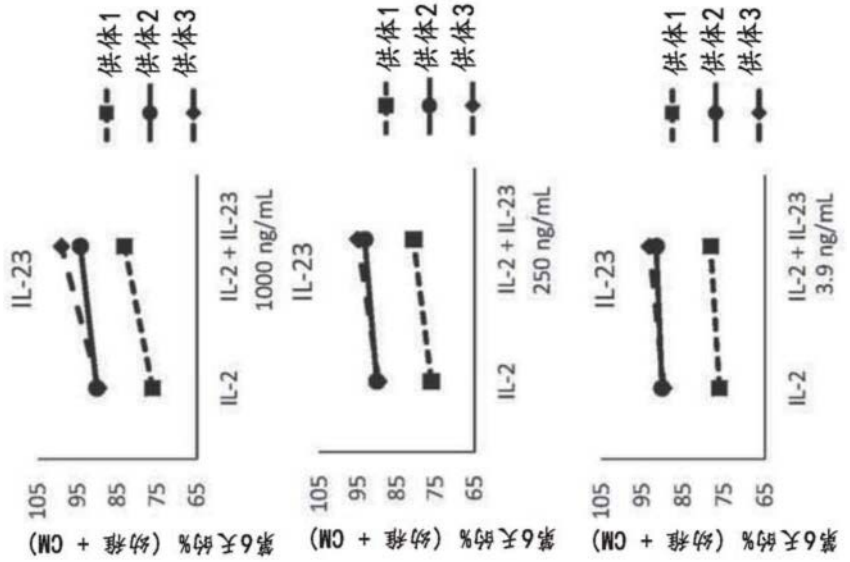


FIG.41B

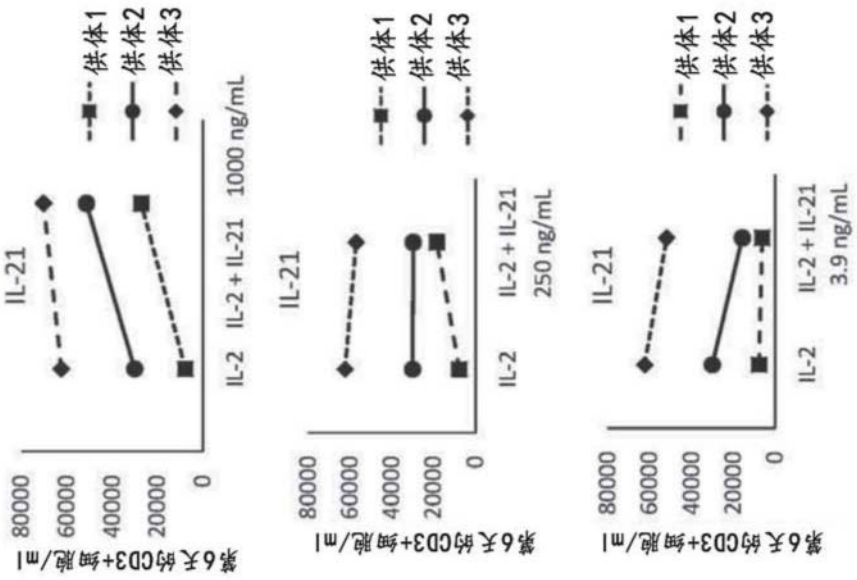


FIG.42A

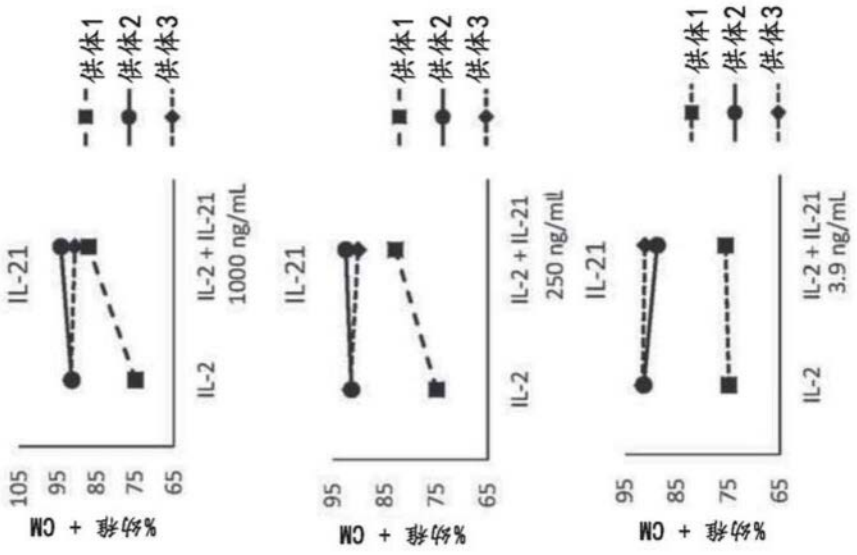


FIG.42B

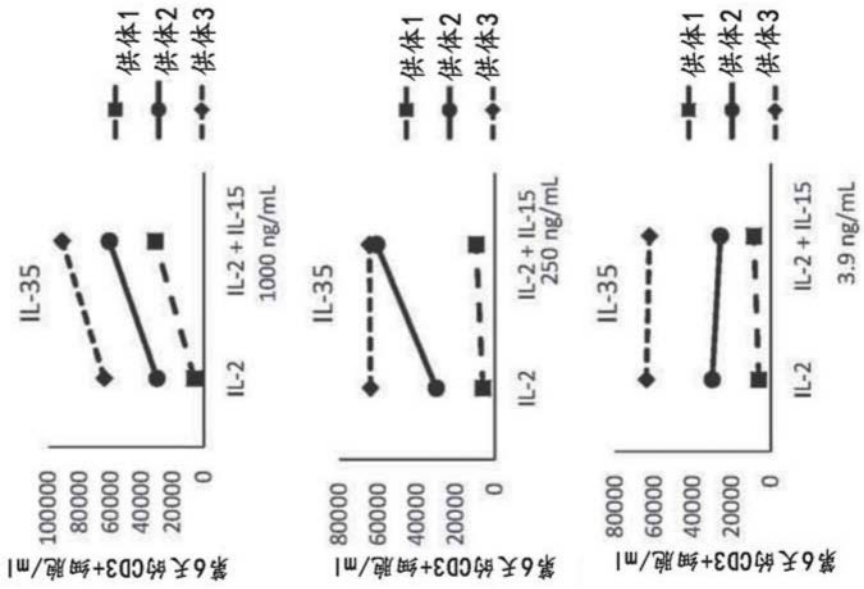


FIG.43A

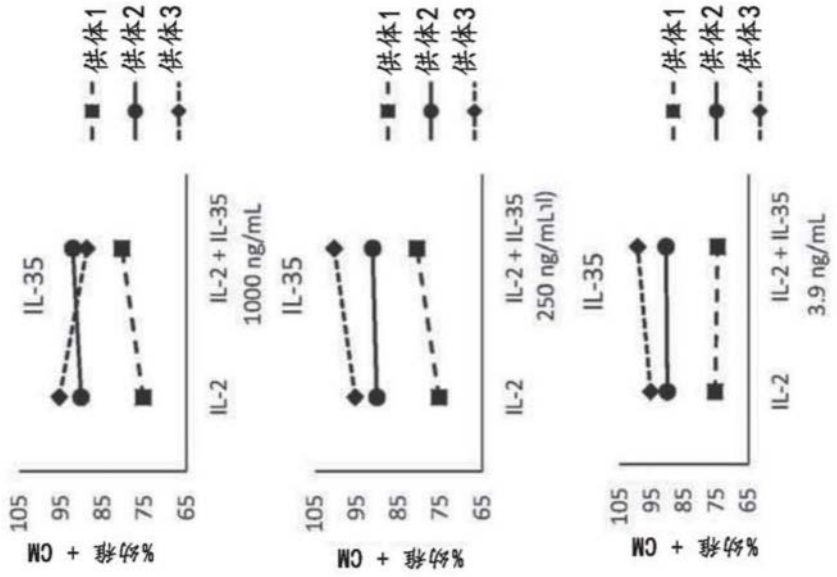


FIG.43B

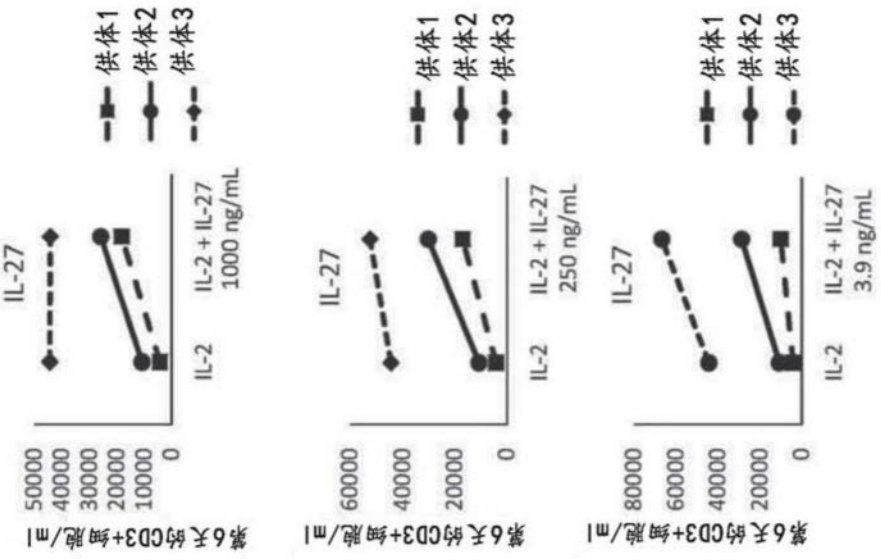


FIG.44A

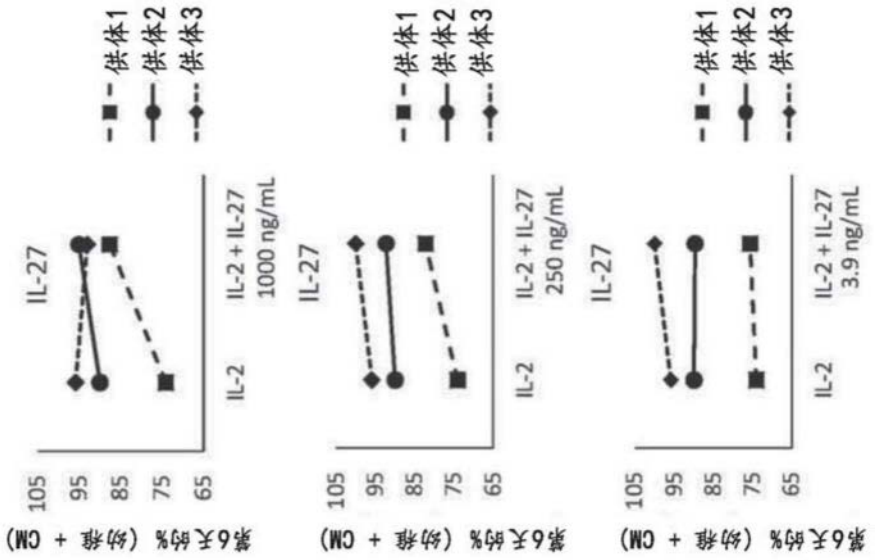


FIG.44B

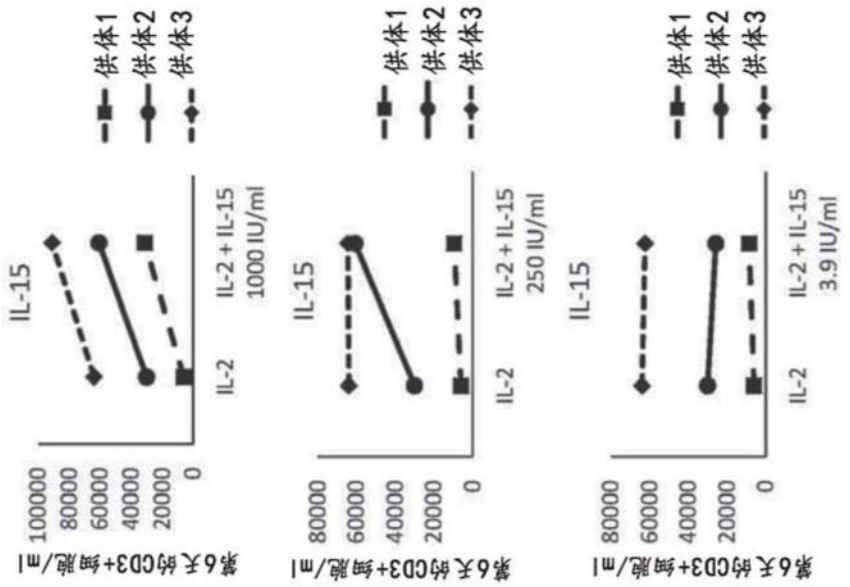


FIG.45A

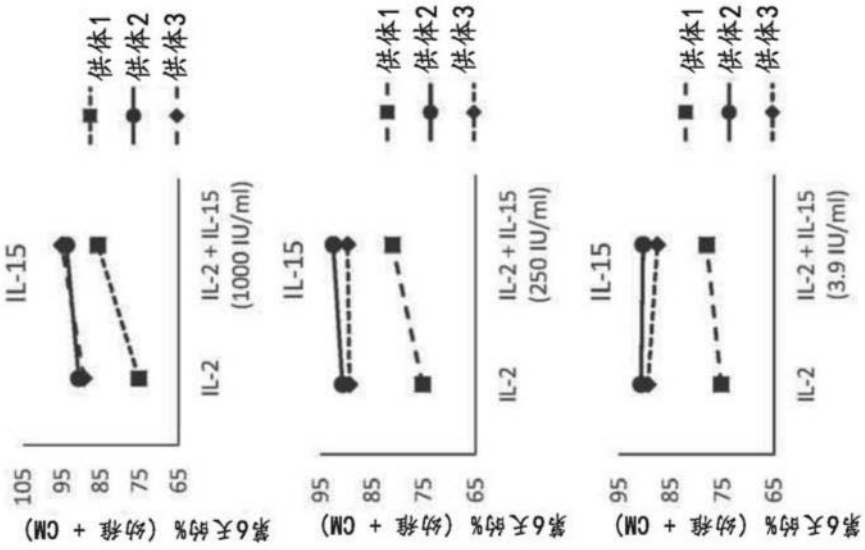


FIG.45B

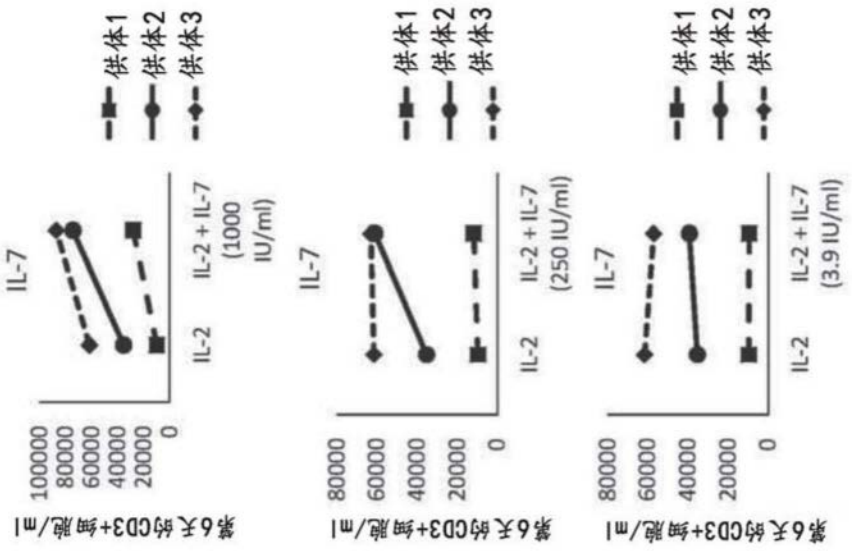


FIG.46A

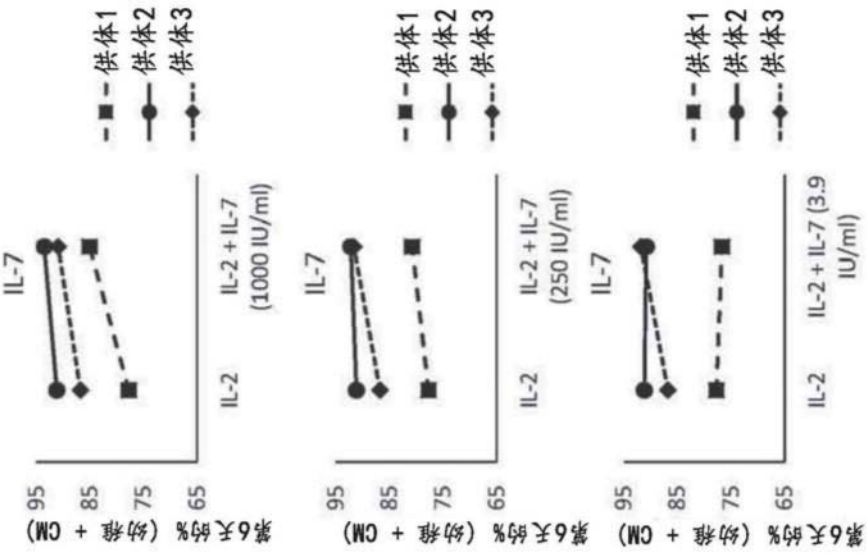


FIG.46B

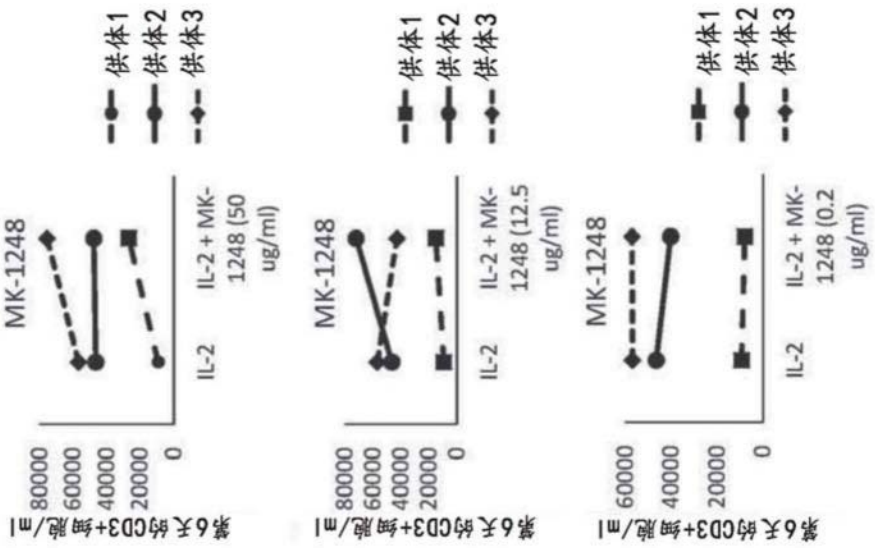


FIG.47A

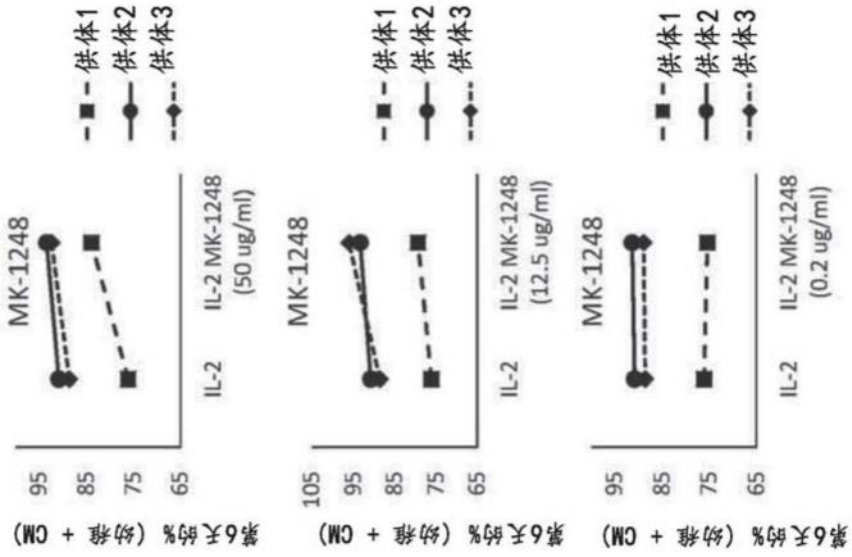


FIG.47B

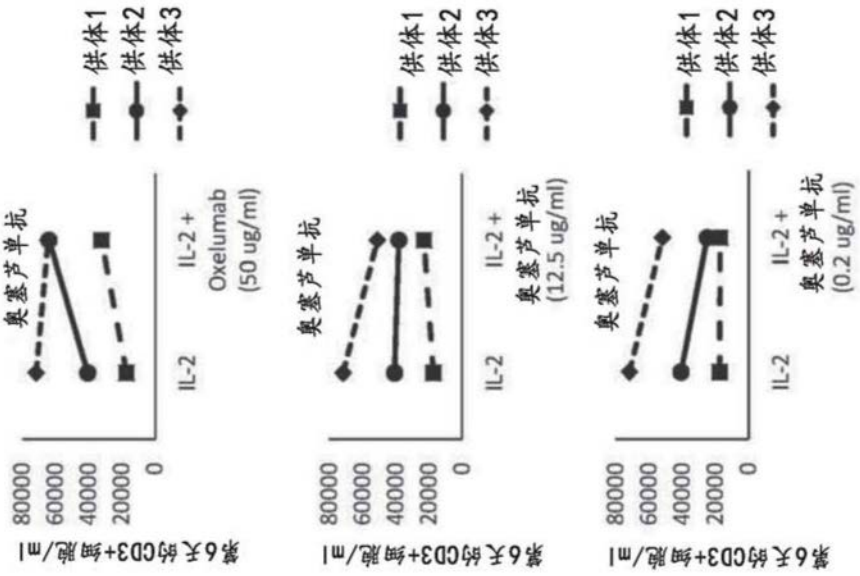


FIG.48A

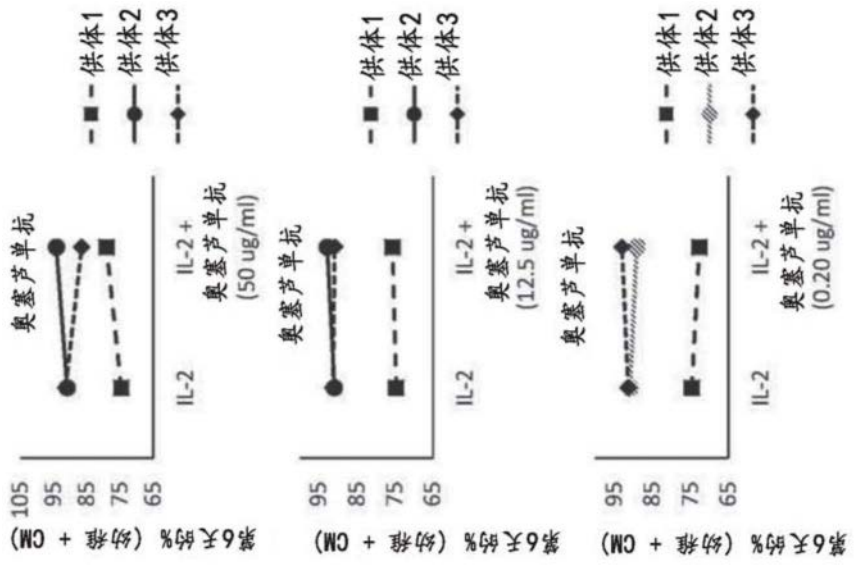


FIG.48B

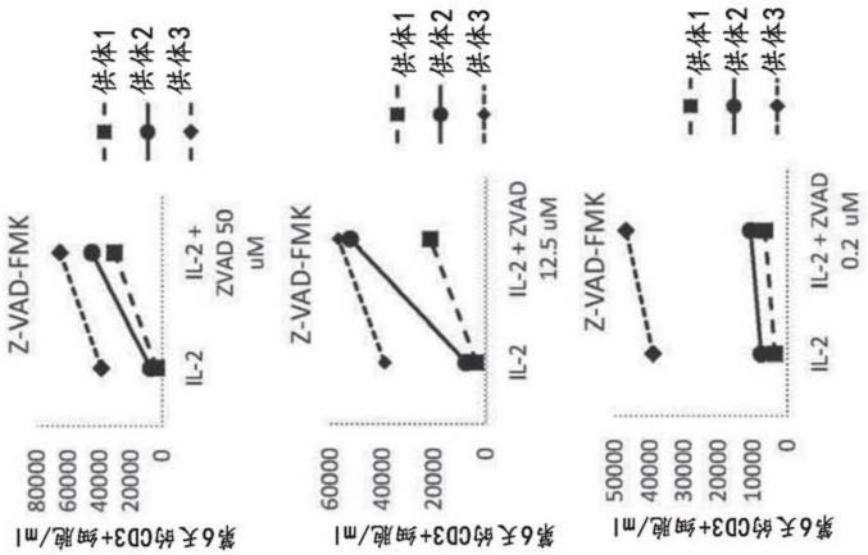


FIG.49A

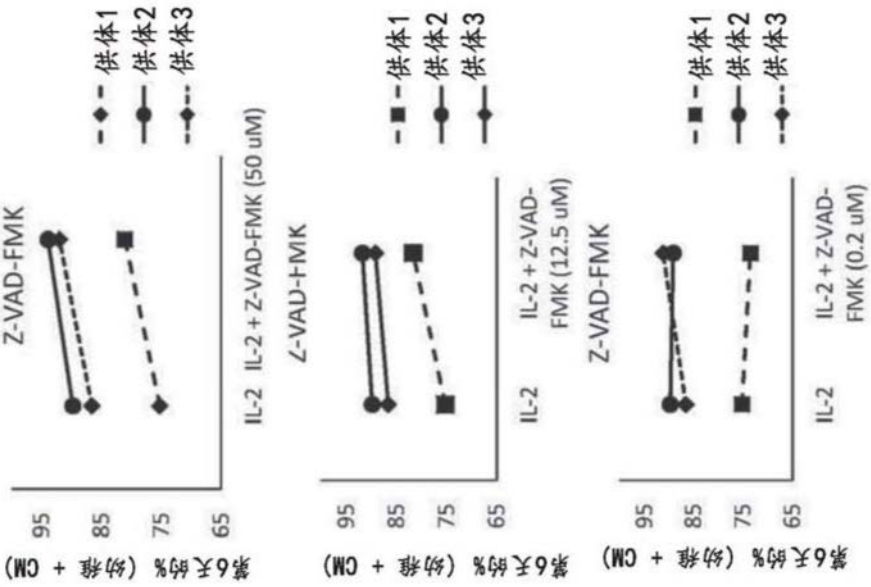


FIG.49B

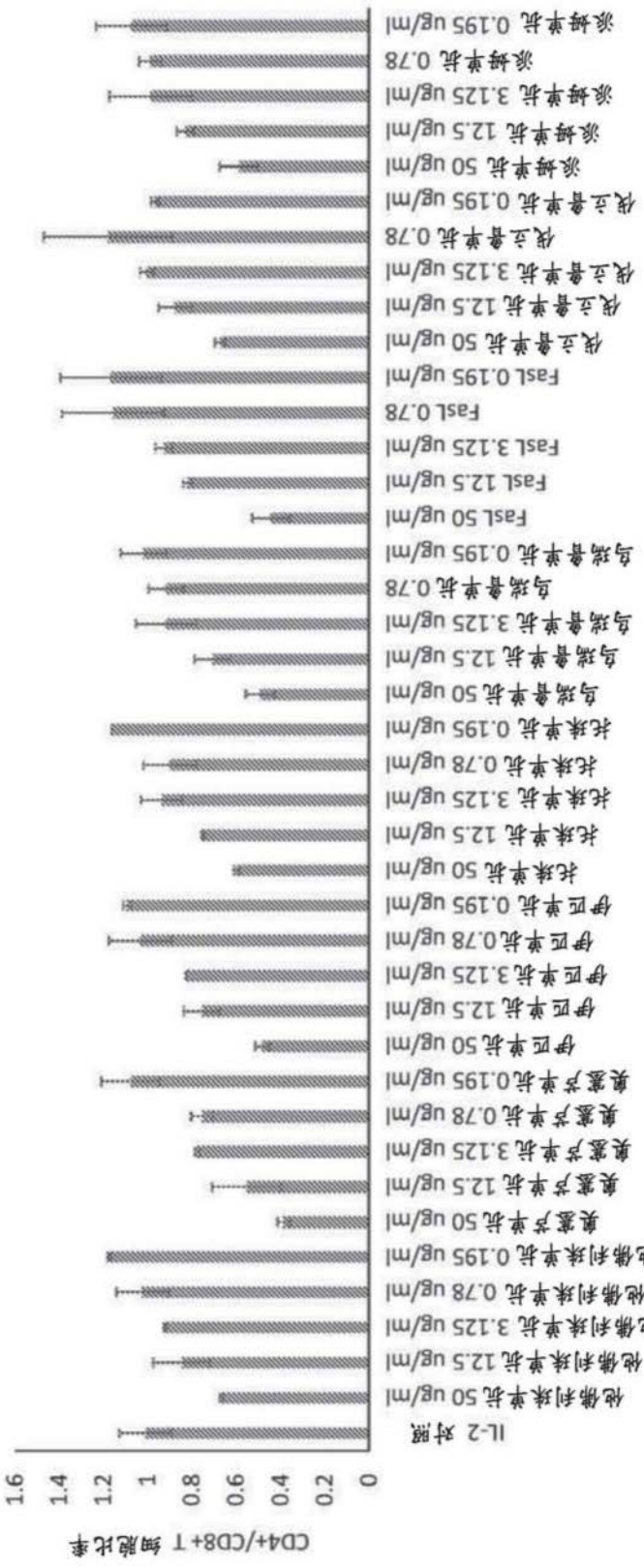

CD4+/CD8+ T 细胞比率
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
IL-2 对照
他佛利珠单抗 50 ug/ml
他佛利珠单抗 12.5 ug/ml
他佛利珠单抗 3.125 ug/ml
他佛利珠单抗 0.78 ug/ml
他佛利珠单抗 0.195 ug/ml
奥塞芦单抗 50 ug/ml
奥塞芦单抗 12.5 ug/ml
奥塞芦单抗 3.125 ug/ml
奥塞芦单抗 0.78 ug/ml
奥塞芦单抗 0.195 ug/ml
伊匹单抗 50 ug/ml
伊匹单抗 12.5 ug/ml
伊匹单抗 3.125 ug/ml
伊匹单抗 0.78 ug/ml
伊匹单抗 0.195 ug/ml
托珠单抗 50 ug/ml
托珠单抗 12.5 ug/ml
托珠单抗 3.125 ug/ml
托珠单抗 0.78 ug/ml
托珠单抗 0.195 ug/ml
乌瑞鲁单抗 50 ug/ml
乌瑞鲁单抗 12.5 ug/ml
乌瑞鲁单抗 3.125 ug/ml
乌瑞鲁单抗 0.78 ug/ml
乌瑞鲁单抗 0.195 ug/ml
FasL 50 ug/ml
FasL 12.5 ug/ml
FasL 3.125 ug/ml
FasL 0.78
FasL 0.195 ug/ml
伐立鲁单抗 50 ug/ml
伐立鲁单抗 12.5 ug/ml
伐立鲁单抗 3.125 ug/ml
伐立鲁单抗 0.78
伐立鲁单抗 0.195 ug/ml
派姆单抗 50 ug/ml
派姆单抗 12.5 ug/ml
派姆单抗 3.125 ug/ml
派姆单抗 0.78
派姆单抗 0.195 ug/ml

FIG.50A

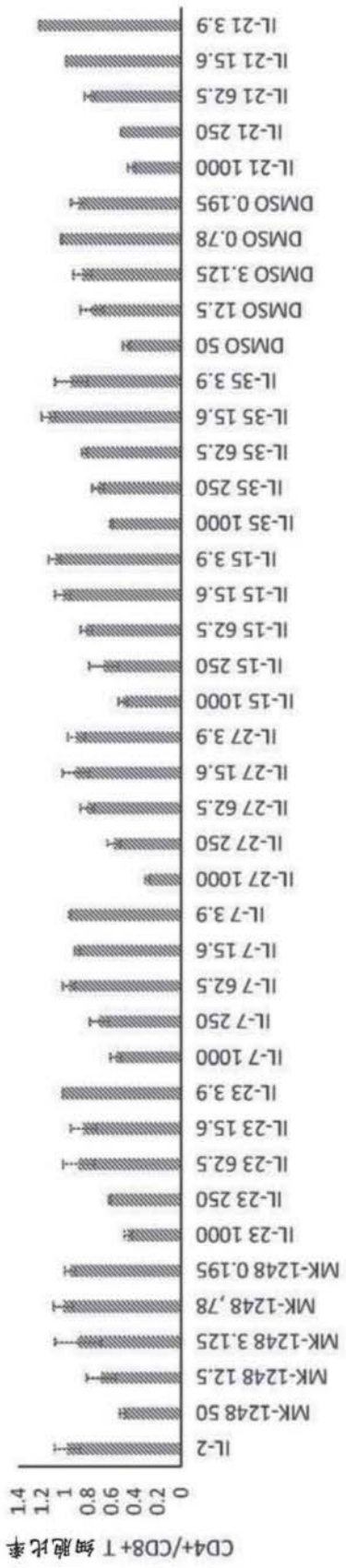

CD4+/CD8+ T 细胞比率
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
IL-2
MK-1248 50
MK-1248 12.5
MK-1248 3.125
MK-1248 ,78
MK-1248 0.195
IL-23 1000
IL-23 250
IL-23 62.5
IL-23 15.6
IL-23 3.9
IL-7 1000
IL-7 250
IL-7 62.5
IL-7 15.6
IL-7 3.9
IL-27 1000
IL-27 250
IL-27 62.5
IL-27 15.6
IL-27 3.9
IL-15 1000
IL-15 250
IL-15 62.5
IL-15 15.6
IL-15 3.9
IL-35 1000
IL-35 250
IL-35 62.5
IL-35 15.6
IL-35 3.9
DMSO 50
DMSO 12.5
DMSO 3.125
DMSO 0.78
DMSO 0.195
IL-21 1000
IL-21 250
IL-21 62.5
IL-21 15.6
IL-21 3.9

FIG.50B

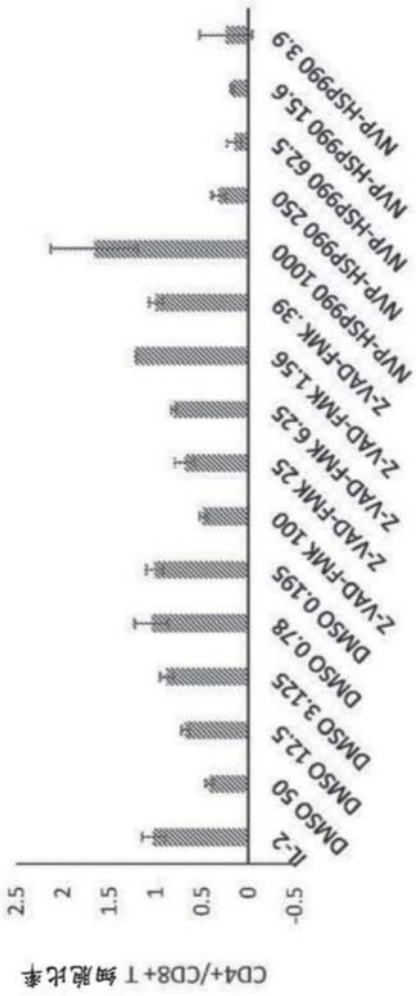

CD4+/CD8+ T 细胞比率
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
IL-2
DMSO 50
DMSO 12.5
DMSO 3.125
DMSO 0.78
DMSO 0.195
Z-VAD-FMK 100
Z-VAD-FMK 25
Z-VAD-FMK 6.25
Z-VAD-FMK 1.56
Z-VAD-FMK .39
NVP-HSP990 1000
NVP-HSP990 250
NVP-HSP990 62.5
NVP-HSP990 15.6
NVP-HSP990 3.9

FIG.50C