202346573

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202346573 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：112103170 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 01 月 30 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/078 (2010.01)* *A61K35/17 (2015.01)*
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2022/01/28 美國 63/304,498
2022/06/29 美國 63/356,933
2022/08/01 美國 63/394,267
2022/11/04 美國 63/382,493
2022/11/30 美國 63/429,114
2023/01/27 世界智慧財產權組織 PCT/US23/61474

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

(72)發明人：福格特 費德瑞克 VOGT, FREDERICK G. (US)；法笛斯 瑪利亞 FARDIS, MARIA (US)；夏提爾科陶德 賽西爾 CHARTIER-COURTAUD, CECILE (US)；庫巴斯 拉斐爾 CUBAS, RAFAEL (US)；張 永良 ZHANG, YONGLIANG (US)；伊娜馬 四世 帕斯誇 INNAMARATO, IV,PASQUALE PATRICK (US)；吉伯特 內森 GILBERT, NATHAN (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：225 項 圖式數：67 共 1590 頁

(54)名稱

細胞介素相關之腫瘤浸潤性淋巴球組合物及方法

(57)摘要

本文中提供用於使用經修飾之 TIL 治療癌症之組合物及方法，其中經修飾之 TIL 包括與其細胞表面結合之一或多種免疫調節劑(例如，細胞介素)。與 TIL 結合之免疫調節劑提供局部免疫刺激作用，其可有利地增強患者受體中之 TIL 存活、增殖及/或抗腫瘤活性。因此，本文中所揭示之組合物及方法提供有效癌症療法。

Provided herein are compositions and methods for the treatment of cancers using modified TILs, wherein the modified TILs include one or more immunomodulatory agents (e.g., cytokines) associated with their cell surface. The immunomodulatory agents associated with the TILs provide a localized immunostimulatory effect that can advantageously enhance TIL survival, proliferation and/or anti-tumor activity in a patient recipient. As such, the compositions and methods disclosed herein provide effective cancer therapies.

指定代表圖：

過程 2A:步驟 A - E持續約22天

1. 步驟**A**

獲得患者腫瘤樣品

2. 步驟**B**

片段化及第一擴增3天至14天

3. 步驟**C**

第一擴增至第二擴增之
轉變無儲存及密閉系統

4. 步驟**D**

第二擴增
IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞
密閉系統

5. 步驟**E**

自步驟D收集TIL
密閉系統

6. 步驟**F**

最終調配及/或轉移至輸注袋
（視情況冷凍保存）

【圖 1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

細胞介素相關之腫瘤浸潤性淋巴球組合物及方法

【英文發明名稱】

CYTOKINE ASSOCIATED TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES COMPOSITIONS AND METHODS

【中文】

本文中提供用於使用經修飾之TIL治療癌症之組合物及方法，其中經修飾之TIL包括與其細胞表面結合之一或多種免疫調節劑(例如，細胞介素)。與TIL結合之免疫調節劑提供局部免疫刺激作用，其可有利地增強患者受體中之TIL存活、增殖及/或抗腫瘤活性。因此，本文中所揭示之組合物及方法提供有效癌症療法。

【英文】

Provided herein are compositions and methods for the treatment of cancers using modified TILs, wherein the modified TILs include one or more immunomodulatory agents (*e.g.*, cytokines) associated with their cell surface. The immunomodulatory agents associated with the TILs provide a localized immunostimulatory effect that can advantageously enhance TIL survival, proliferation and/or anti-tumor activity in a patient recipient. As such, the compositions and methods disclosed herein provide effective cancer therapies.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細胞介素相關之腫瘤浸潤性淋巴球組合物及方法

【英文發明名稱】

CYTOKINE ASSOCIATED TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES COMPOSITIONS AND METHODS

【技術領域】

【0001】本發明涉及細胞介素相關之腫瘤浸潤性淋巴球組合物及方法。

【先前技術】

【0002】利用藉由快速擴增方案(REP)而離體培養之TIL的授受性細胞療法已在患有癌症之患者的宿主免疫抑制之後產生成功的授受性細胞療法。然而，在一些情況下，經轉移之TIL之存活及抗腫瘤活性可在轉移至患者後降低。

【0003】已研究投與支持性免疫刺激性藥劑(例如，細胞介素)以增強T細胞療法。然而，此類免疫刺激性藥劑需要高全身性劑量，其可引起不合需要的毒性。

【0004】因此，仍需要經改良之用於治療癌症之TIL療法。

【發明內容】

【0005】本文中提供用於使用經修飾之TIL治療癌症之組合物及方法，其中經修飾之TIL包括與其細胞表面結合之一或多種免疫調節劑(例如，細胞介素)。與TIL結合之免疫調節劑提供局部免疫刺激作用，其可有利地增強患者受體中之TIL存活、增殖及/或抗腫瘤活性。因此，本文中所揭示之組合物及方法提供有效癌症療法。

【0006】在一個態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，視情況其中患者或個體已接受至少一種先前療法，其中一部分TIL群體為經修飾之TIL，各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物。

【0007】在一個態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與經修飾之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-14天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-14天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之包含所收集之TIL群體之輸注袋；

(h) 向個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之輸注袋之第三TIL群體；及

(i) 在投與步驟(h)之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0008】在一個態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自個體切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-11天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之包含所收集之TIL群體之輸注袋；

(h) 向個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之輸注袋之第三TIL群體；及

(i) 在投與步驟(h)之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0009】在一個態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自患者或個體中之癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體，

(b) 將第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-11天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之包含所

收集之TIL群體之輸注袋；

(h) 向個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之輸注袋之第三TIL群體；及

(i) 在投與步驟(h)之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0010】在另一態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與經修飾之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體或患者切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段進行；

(b) 將腫瘤處理成多個腫瘤片段且將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-11天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之

密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之包含所收集之TIL群體之輸注袋；

(h) 向患有癌症之個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之輸注袋之第三TIL群體；及

(i) 在投與步驟(h)之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0011】在其他態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自個體或患者之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體；

(c) 使第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 在第一細胞培養基中進行第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視

情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基中進行第二TIL群體之快速第二擴增，以獲得第三TIL群體；其中第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中快速擴增進行14天或更短之時段，視情況快速第二擴增可在快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(f) 收集第三TIL群體；

(g) 向患有癌症之個體或患者投與治療有效部分之第三TIL群體；及

(h) 在投與步驟(g)之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0012】在另一態樣中，本文中提供用於治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體或患者中之癌症切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段進行；

(b) 將腫瘤片段化成腫瘤片段；

(c) 使腫瘤片段與第一細胞培養基接觸；

(d) 在第一細胞培養基中進行第一TIL群體之初始擴

增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基中進行第二TIL群體之快速第二擴增，以獲得第三TIL群體；其中第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中快速擴增進行14天或更短之時段，視情況快速第二擴增可在快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(f) 收集第三TIL群體；

(g) 向患有癌症之個體或患者投與治療有效部分之第三TIL群體；及

(h) 在投與步驟(g)之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0013】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得及/或接受來源於自個體中之癌症切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 自步驟(a)中之第一TIL群體選擇PD-1陽性TIL，以獲得富含PD-1之TIL群體；

(c) 藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)

之第一細胞培養基中培養富含PD-1之TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；

(d) 藉由在包含IL-2、OKT-3及APC之第二培養基中培養第二TIL群體來進行快速第二擴增，以產生治療性TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC之數目為在步驟(b)中添加之APC之數目之至少兩倍，其中快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得治療性TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，及

(g) 在該方法期間之任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0014】本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得及/或接受來源於自個體或患者中之癌症切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-14天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-14天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至輸注袋之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0015】本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得來源於自個體中之癌症切除之腫瘤之第一TIL群

體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-11天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至輸注袋之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0016】在另一態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自患者或個體中之癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體，

(b) 將第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-11天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中轉移至輸注袋之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0017】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤

性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體或患者中之癌症切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段進行；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中第一擴增進行約3-11天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-11天以獲得第三TIL群體，其中第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中轉移至輸注袋之前的任何時間修飾第

一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0018】在本文中所提供之方法之一些實施例中，第一擴增分成第一步驟及第二步驟，其中方法進一步包含藉由在含有IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增之第一步驟，以產生由腫瘤片段或樣品釋放之TIL，分離腫瘤片段或樣品中殘留之TIL與由腫瘤片段或樣品釋放之TIL，視情況消化腫瘤片段或樣品以產生腫瘤消化物，及藉由在細胞培養基中培養腫瘤片段或樣品或腫瘤消化物中之剩餘TIL來進行第一擴增之第二步驟，以產生第二TIL群體。

【0019】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自個體或患者中之癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體；

(b) 使第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(c) 在第一細胞培養基中進行第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(d) 在第二細胞培養基中進行第二TIL群體之快速第

二擴增，以獲得第三TIL群體；其中第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中快速擴增進行14天或更短之時段，視情況快速第二擴增可在快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(e) 收集第三TIL群體；及

(f) 在步驟(f)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0020】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體或患者中之癌症切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的腫瘤樣品之手段進行；

(b) 將腫瘤片段化成腫瘤片段；

(c) 使腫瘤片段與第一細胞培養基接觸；

(d) 在第一細胞培養基中進行第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基中進行第二TIL群體之快速第

二擴增，以獲得第三TIL群體；其中第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中快速擴增進行14天或更短之時段，視情況快速第二擴增可在快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(f) 收集第三TIL群體；及

(g) 在步驟(f)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0021】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得及/或接受來源於自個體中之癌症切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 藉由在包含IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包含抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；

(c) 藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；

(d) 收集自步驟(c)獲得之治療性TIL群體；及

(e) 在步驟(d)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0022】在此方法之一些實施例中，步驟(b)中之細胞培養基進一步包含抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中之培養基中之APC之數目大於步驟(b)中之培養基中之APC之數目。

【0023】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

(a) 藉由在包含IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，該第一TIL群體可藉由將來源於自個體中之癌症切除之腫瘤的腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；

(b) 藉由使第二TIL群體與第二TIL群體之具有額外的IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增中之APC之數目為步驟(a)中之APC之數目之至少兩倍，其中快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；

(c) 收集自步驟(b)獲得之治療性TIL群體；及

(d) 在步驟(c)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0024】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

(a) 藉由在包含IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包含抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；

(b) 藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；

(c) 收集自步驟(b)獲得之治療性TIL群體；及

(d) 在步驟(c)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0025】在此方法之一些實施例中，步驟(a)中之細胞培養基進一步包含抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中之培養基中之APC之數目大於步驟(b)中之培養基中之APC之數目。

【0026】在本文中所提供之方法之一些實施例中，啟

始第一擴增分成第一步驟及第二步驟，其中方法進一步包含藉由在含有IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增之第一步驟，以產生由腫瘤片段或樣品釋放之TIL，分離腫瘤片段或樣品中殘留之TIL與由腫瘤片段或樣品釋放之TIL，視情況消化腫瘤片段或樣品以產生腫瘤消化物，及藉由在細胞培養基中培養腫瘤片段或樣品或腫瘤消化物中之剩餘TIL來進行啟始第一擴增之第二步驟，以產生第二TIL群體。

【0027】在一個態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

(a) 藉由將腫瘤樣品在包含IL-2之第一細胞培養基中培養約3天來獲得及/或接受來自腫瘤樣品之第一TIL群體，該腫瘤樣品係由來自個體中之癌症之腫瘤之一或多次小型生檢、芯針生檢或穿刺生檢獲得；

(b) 藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中啟始第一擴增進行約7或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；

(c) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之第二細胞培養基來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC之數目為在步驟b)中添加之APC之數目之至少兩倍，其中快速第二擴

增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；

(d) 收集自步驟(c)獲得之治療性TIL群體；

(e) 將來自步驟(d)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋；及

(f) 在步驟(e)中之轉移至輸注袋之前的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0028】在另一態樣中，本文中提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

(a) 藉由將腫瘤樣品在包含IL-2之第一細胞培養基中培養約3天來獲得及/或接受來自腫瘤樣品之第一TIL群體，該腫瘤樣品係由來自個體中之癌症之腫瘤之一或多次小型生檢、芯針生檢或穿刺生檢獲得；

(b) 藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增進行約7或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；

(c) 藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；

(d) 收集自步驟(c)獲得之治療性TIL群體；及

(e) 在步驟(f)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【0029】在本文中所提供之方法之一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。

【0030】在一個態樣中，本文中提供用於擴增T細胞之方法，其包含：

(a) 藉由培養第一T細胞群體以實現生長及啟始第一T細胞群體之活化來進行自供體獲得之第一T細胞群體之啟始第一擴增；

(b) 在步驟(a)中啟始之第一T細胞群體之活化開始衰減之後，藉由培養第一T細胞群體以實現生長及增強第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之快速第二擴增，以獲得第二T細胞群體；

(c) 收集第二T細胞群體；及

(d) 在步驟(c)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一或第二T細胞群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之T細胞。

【0031】在另一態樣中，本文中提供用於擴增T細胞之方法，其包含：

(a) 藉由培養第一T細胞群體以實現生長及啟始第一T細胞群體之活化來進行來自腫瘤樣品之第一T細胞群體之啟始第一擴增，該腫瘤樣品係由供體中之腫瘤之一或多次小型生檢、芯針生檢或穿刺生檢獲得；

(b) 在步驟(a)中啟始之第一T細胞群體之活化開始衰減之後，藉由培養第一T細胞群體以實現生長及增強第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之快速第二擴增，以獲得第二T細胞群體；

(c) 收集第二T細胞群體；及

(d) 在步驟(e)中之收集之前或之後的任何時間修飾第一或第二T細胞群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之T細胞。

【0032】在一個態樣中，本文中提供用於擴增來自周邊血液之周邊血液淋巴球(PBL)之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 獲得來自患者之周邊血液之周邊血液單核細胞(PBMC)之樣品；

(b) 將該等PBMC在包含第一細胞培養基之培養物中培養選自由以下組成之群的時段：約9天、約10天、約11天、約12天、約13天及約14天，該第一細胞培養基具有IL-2、抗CD3/抗CD28抗體及第一抗生素組合，藉此實現來自該等PBMC之周邊血液淋巴球(PBL)之擴增；

(c) 自步驟(b)中之培養物收集PBL；及

(d) 在步驟(c)中之收集之前或之後的任何時間修飾一

部分PBL，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之PBL。

【0033】在一些實施例中，患者預先經依魯替尼(ibrutinib)或另一種介白素-2可誘導之T細胞激酶(ITK)抑制劑治療。在某些實施例中，患者難以用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療。

【0034】在一些實施例中，免疫調節組合物包含一或多種薄錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。

【0035】在例示性實施例中，一或多種免疫調節劑包含一或多種細胞介素。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。

【0036】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-2或其變異體。在一些實施例中，IL-2為人類IL-2。在例示性實施例中，人類IL-2具有SEQ ID NO:272之胺基酸序列。

【0037】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-12或其變異體中之一或多者。在某些實施例中，IL-12包含連接至人類IL-12 p40子單元之人類IL-12 p35子單元。在某些實施例中，人類IL-12 p35子單元具有SEQ ID NO:267之胺基酸序列且人類IL-12 p40子單元具有SEQ ID NO:268之胺基酸序列。

【0038】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。在一些實施例中，IL-15為人類IL-15。在例示性實施例中，人類IL-15具有SEQ ID NO:258之胺基酸序列。

【0039】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體。在一些實施例中，IL-18為人類IL-18。在某些實施例中，人類IL-18具有SEQ ID NO:269、270及331-385中之任一者之胺基酸序列。

【0040】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。在某些實施例中，IL-21為人類IL-21。在一些實施例中，人類IL-21具有SEQ ID NO:251之胺基酸序列。

【0041】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體及IL-21或其變異體。在一些實施例中，IL-15為人類IL-15且IL-21為人類IL-21。在某些實施例中，人類IL-15具有SEQ ID NO:258之胺基酸序列且人類IL-21具有SEQ ID NO:271之胺基酸序列。

【0042】在一些實施例中，一或多種免疫調節劑包含CD40促效劑。在某些實施例中，CD40促效劑為抗CD40結合域或CD40L。在例示性實施例中，CD40促效劑為包含可變重鏈域(VH)及可變輕鏈域(VL)之CD40結合域。在一些實施例中，CD40結合域之VH及VL係選自以下：a)具有SEQ ID NO:274之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:275之胺基酸序列之VL；b)具有SEQ ID NO:277之胺基酸序列

之VH及具有SEQ ID NO:278之胺基酸序列之VL；c)具有SEQ ID NO:280之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:281之胺基酸序列之VL；及d)具有SEQ ID NO:283之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:284之胺基酸序列之VL。在例示性實施例中，CD40結合域為scFv。

【0043】在一些實施例中，CD40促效劑為具有SEQ ID NO:273之胺基酸序列之人類CD40L。

【0044】在一些實施例中，自N端至C端，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。

【0045】在一些實施例中，細胞膜錨部分包含CD8a跨膜細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。在例示性實施例中，細胞膜錨部分包含B7-1跨膜域。在一些實施例中，細胞膜錨部分具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【0046】在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其中不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質中之每一者各自包含不同的免疫調節劑。在一些實施例中，不同的免疫調節劑係選自：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體，及CD40促效劑。在一些實施例中，不同的免疫調節劑係選自：IL-12及IL-15、IL-15及

IL-18、IL-15及IL-21、CD40L及IL-15、IL-15及IL-21、IL-2及IL-12，及其變異體。

【0047】在一些實施例中，經修飾之TIL包含第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質及第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【0048】在一些實施例中，第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-15或其變異體且第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-21或其變異體。

【0049】在例示性實施例中，第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質及第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質之表現係由經修飾之TIL中之NFAT啟動子控制。

【0050】在例示性實施例中，自N端至C端，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。在一些實施例中，IA為細胞介素。在例示性實施例中，IA係選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。在一些實施例中，IA為IL-2或其變異體。在某些實施例中，IA為IL-12或其變異體。在一些實施例中，IA為IL-15或其變異體。在一些實施例中，IA為IL-18或其變異體。在一些實施例中，IA為DR-IL-18。在某些實施例中，IA為IL-21或其變異體。

【0051】舉例而言，自N端至C端，一或多種膜錨定

之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S1-IA1-L1-C1-L2-S2-IA2-L3-C2，其中S1及S2各自獨立地為信號肽，IA1及IA2各自獨立地為免疫調節劑，L1-L3各自獨立地為連接子，且C1及C2各自獨立地為細胞膜錨部分。在一些實施例中，S1與S2係相同的。在某些實施例中，C1與C2係相同的。在一些實施例中，L2為可裂解連接子。在例示性實施例中，L2為弗林蛋白酶(furin)可裂解連接子。在一些實施例中，IA1及IA2各自獨立地為細胞介素。

【0052】在一些實施例中，IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。在一些實施例中，IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群，IL-2及IL-12，其限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-2且另一者為IL-12。在一些實施例中，IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群：IL-15及IL-21，其限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-15且另一者為IL-21。

【0053】在某些實施例中，修飾包含將編碼融合蛋白質之異源核酸引入一部分TIL中且在經修飾之TIL之表面上表現融合蛋白質。

【0054】在某些實施例中，修飾包含將編碼融合蛋白質之異源核酸引入一部分TIL中且在經修飾之TIL之表面上表現融合蛋白質。在一些實施例中，異源核酸包含病毒載體(例如，腺病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體或

腺相關載體(AAV))。在一些實施例中，異源核酸包含piggyBac轉位子。在一些實施例中，異源核酸包含NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子。

【0055】在一些實施例中，免疫調節組合物包含融合蛋白質，該融合蛋白質包含連接至TIL表面抗原結合域之一或多種免疫調節劑。在一些實施例中，一或多種免疫調節劑包含一或多種細胞介素。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-12或其變異體。在某些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。在某些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體(例如，DR-IL-18)。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。在某些實施例中，TIL表面抗原結合域包含抗體可變重鏈域及可變輕鏈域。在一些實施例中，TIL表面抗原結合域包含抗體或其片段。在一些實施例中，TIL表面抗原結合域對以下TIL表面抗原中之一或多者呈現親和力：CD45、CD4、CD8、CD3、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD25、CD127、CD19、CD20、CD22、HLA-DR、CD197、CD38、CD27、CD196、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CD84、CD229、CCR1、CCR5、CCR4、CCR6、CCR8、CCR10、CD 16、CD56、CD 137、OX40或GITR。在某些實施例中，修飾包含將融

合蛋白質與一部分TIL一起在允許融合蛋白質與該部分TIL結合之條件下培育。

【0056】在一些實施例中，免疫調節組合物包含奈米粒子，該奈米粒子包含複數種免疫調節劑。在一些實施例中，複數種免疫調節劑藉由可降解連接子共價連接在一起。在某些實施例中，奈米粒子包含奈米粒子表面上之至少一種聚合物、陽離子性聚合物或陽離子性嵌段共聚物。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。在某些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-12。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-15。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-21。在一些實施例中，奈米粒子為脂質體、蛋白質奈米凝膠、核苷酸奈米凝膠、聚合物奈米粒子或固體奈米粒子。在一些實施例中，奈米粒子為奈米凝膠。在某些實施例中，奈米粒子進一步包含結合於以下抗原中之一或多者之抗原結合域：CD45、CD11a(整合素α-L)、CD18(整合素β-2)、CD11b、CD11c、CD25、CD8或CD4。在一些實施例中，修飾包含將免疫調節組合物連接至該部分TIL之表面。

【0057】在本文中所提供之方法之某些實施例中，對來自第一擴增之TIL或來自第二擴增之TIL或其兩者進行修飾。在某些實施例中，對來自啟始第一擴增之TIL或來自快速第二擴增之TIL或其兩者進行修飾。

【0058】在本文中所提供之方法之一些實施例中，在第一擴增之後且在第二擴增之前進行修飾。在一些實施例中，在啟始第一擴增之後且在快速第二擴增之前或此兩者時進行修飾。在某些實施例中，在第二擴增之後進行修飾。在一些實施例中，在快速第二擴增之後進行修飾。在一些實施例中，在收集之後進行修飾。

【0059】在某些實施例中，第一擴增進行約11天之時段。在一些實施例中，啟始第一擴增進行約11天之時段。

【0060】在本文中所提供之方法之一些實施例中，在第一擴增中，IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於細胞培養基中。在某些實施例中，在啟始第一擴增中，IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於細胞培養基中。

【0061】在一些實施例中，在第二擴增步驟中，IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且OKT-3抗體係以約30 ng/mL之初始濃度存在。在一些實施例中，在快速第二擴增步驟中，IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且OKT-3抗體係以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【0062】在一些實施例中，使用透氣容器進行第一擴增。在某些實施例中，使用透氣容器進行啟始第一擴增。在一些實施例中，使用透氣容器進行第二擴增。在某些實施例中，使用透氣容器進行快速第二擴增。

【0063】在本文中所提供之方法之一些實施例中，第

一擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。在某些實施例中，啟始第一擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。在一些實施例中，第二擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。在某些實施例中，快速第二擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【0064】在本文中所提供之治療方法之一些實施例中，方法進一步包含在向患者投與TIL之前用非清髓性淋巴球耗減方案治療患者之步驟。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱(fludarabine)持續三天。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。在某些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺且以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續一天。在某些實施例中，將環磷醯胺與美司鈉(mesna)一起投與。

【0065】在本文中所提供之治療方法之一些實施例中，方法進一步包含在向患者投與TIL之後第二天開始用IL-2療法治療患者之步驟。在本文中所提供之治療方法之一些實施例中，方法進一步包含在向患者投與TIL之同一天開始用IL-2療法治療患者之步驟。在一些實施例中，IL-2方案為包括600,000或720,000 IU/kg阿地介白素(aldesleukin)或其生物類似物或變異體之低劑量IL-2方案，其以每八小時一次15分鐘推注型靜脈內輸注形式投與直至耐受。

【0066】在本文中所提供之方法之一些實施例中，投與治療有效TIL群體且包含約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL。

【0067】在本文中所提供之方法之一些實施例中，啟始第一擴增及快速第二擴增進行21天或更短之時段。在一些實施例中，啟始第一擴增及快速第二擴增進行16或17天或更短之時段。在某些實施例中，啟始第一擴增進行7或8天或更短之時段。在一些實施例中，快速第二擴增進行11天或更短之時段。

【0068】在本文中所提供之方法之一些實施例中，步驟(c)中之第一擴增及步驟(d)中之第二擴增係各自在11天之週期內單獨進行。在本文中所提供之方法之一些實施例中，步驟(a)至(f)進行約10天至約22天。

【0069】在本文中所提供之方法之一些實施例中，經修飾之TIL進一步包含基因修飾，其引起至少一部分治療

性TIL群體中之緘默或減少之一或多種免疫檢查點基因之表現。在一些實施例中，一或多種免疫檢查點基因係選自包含以下之群：PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。在某些實施例中，一或多種免疫檢查點基因係選自包含以下之群：PD-1、TGIT、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ及PKA。在某些實施例中，免疫檢查點基因為PD-1。在某些實施例中，基因修飾係使用RNA干擾方法(例如，shRNA)來產生。

【0070】在一些實施例中，經修飾之TIL進一步包含基因修飾，其引起至少一部分治療性TIL群體中之待增強之一或多種免疫檢查點基因之表現，該一或多種免疫檢查點基因係選自包含以下之群：CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配

位體mDLL1。在某些實施例中，使用可程式化核酸酶進行基因修飾，該可程式化核酸酶介導該一或多種免疫檢查點基因處之雙股或單股斷裂之產生。在一些實施例中，使用選自以下之一或多種方法進行基因修飾：RNA干擾方法(例如，shRNA)、CRISPR方法、TALE方法、鋅指方法、Cas-CLOVER方法及其組合。在某些實施例中，使用CRISPR方法進行基因修飾。在一些實施例中，CRISPR方法為CRISPR/Cas9方法。在某些實施例中，使用TALE方法進行基因修飾。在一些實施例中，使用鋅指方法進行基因修飾。在一些實施例中，使用Cas-CLOVER方法進行基因修飾。

【0071】在一些實施例中，經修飾之TIL暫時表現細胞表面上之免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其中各融合蛋白質包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。

【0072】在例示性實施例中，一或多種免疫調節劑包含一或多種細胞介素。在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。

【0073】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-2或其變異體。在一些實施例中，IL-2為人類IL-2。在例示性實施例中，人類IL-2具有SEQ ID NO:272之胺基酸序列。

【0074】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-12或其變異體。在某些實施例中，IL-12包含連接至人類IL-12 p40子單元之人類IL-12 p35子單元。在某些實施例中，人類IL-12 p35子單元具有SEQ ID NO:267之胺基酸序列且人類IL-12 p40子單元具有SEQ ID NO:268之胺基酸序列。

【0075】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。在一些實施例中，IL-15為人類IL-15。在例示性實施例中，人類IL-15具有SEQ ID NO:258之胺基酸序列。

【0076】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體(例如DR-IL-18)。在某些實施例中，IL-18為人類IL-18。在某些實施例中，人類IL-18具有SEQ ID NO:269、270及331-385中之任一者之胺基酸序列。

【0077】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。在某些實施例中，IL-21為人類IL-21。在一些實施例中，人類IL-21具有SEQ ID NO:271之胺基酸序列。

【0078】在一些實施例中，一或多種細胞介素包含IL-15及IL-21。在一些實施例中，IL-15為人類IL-15且IL-21為人類IL-21。在某些實施例中，人類IL-15具有SEQ ID NO:258之胺基酸序列且人類IL-21具有SEQ ID NO:271之胺基酸序列。

【0079】在一些實施例中，一或多種免疫調節劑包含

CD40促效劑。在某些實施例中，CD40促效劑為抗CD40結合域或CD40L。在例示性實施例中，CD40促效劑為包含可變重鏈域(VH)及可變輕鏈域(VL)之CD40結合域。在一些實施例中，CD40結合域之VH及VL係選自以下：a)具有SEQ ID NO:274之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:275之胺基酸序列之VL；b)具有SEQ ID NO:277之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:278之胺基酸序列之VL；c)具有SEQ ID NO:280之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:281之胺基酸序列之VL；及d)具有SEQ ID NO:283之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:284之胺基酸序列之VL。在例示性實施例中，CD40結合域為scFv。

【0080】在一些實施例中，CD40促效劑為具有SEQ ID NO:273之胺基酸序列之人類CD40L。在一些實施例中，自N端至C端，膜錨定之免疫調節融合蛋白質係根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。

【0081】在一些實施例中，細胞膜錨部分包含CD8a跨膜細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。在例示性實施例中，細胞膜錨部分包含B7-1跨膜域。在一些實施例中，細胞膜錨部分具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【0082】在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其中不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質中之每一者各自包含不同

的免疫調節劑。在一些實施例中，不同的免疫調節劑係選自：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體，及CD40促效劑。在一些實施例中，不同免疫調節劑係選自：IL-12及IL-15、IL-15及IL-18、CD40L、IL-15及IL-21，及IL-15，以及IL-2及IL-12。

【0083】在一些實施例中，經修飾之TIL係藉由用編碼融合蛋白質之核酸轉染TIL以暫時表現細胞表面上之融合蛋白質來修飾，該融合蛋白質包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。在一些實施例中，核酸為RNA。在一些實施例中，RNA為mRNA。在一些實施例中，TIL係藉由電致孔而經mRNA轉染。在一些實施例中，TIL係在第一擴增之後且在第二擴增之前藉由電致孔而經mRNA轉染。在一些實施例中，TIL係在第一擴增之前藉由電致孔而經mRNA轉染。在一些實施例中，該方法進一步包含在用mRNA轉染TIL之前，藉由與抗CD3促效劑一起培育來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑為OKT-3。在一些實施例中，在用mRNA轉染TIL之前，藉由將TIL與抗CD3促效劑一起培育約1至3天來活化TIL。

【0084】在一些實施例中，藉由使用微流體裝置暫時破壞TIL之細胞膜，藉此實現核酸之轉染而用編碼融合蛋白質之核酸轉染經修飾之TIL。

【0085】在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替APC。在一些實施例中，aAPC包含表現HLA-

A/B/C、CD64、CD80、ICOS-L及CD58之細胞。在一些實施例中，aAPC包含MOLM-14細胞。在一些實施例中，aAPC包含MOLM-13細胞。在一些實施例中，aAPC包含MOLM-14細胞，其內源性表現HLA-A/B/C、CD64、CD80、ICOS-L及CD58。在一些實施例中，aAPC包含MOLM-14細胞，其內源性表現HLA-A/B/C、CD64、CD80、ICOS-L及CD58，其中MOLM-14細胞經永久基因編輯以表現CD86。在一些實施例中，用一或多種病毒載體轉導MOLM-14細胞，其中該一或多種病毒載體包含編碼CD86之核酸序列及編碼4-1BBL之核酸序列，且其中MOLM-14細胞表現CD86及4-1BBL。在一些實施例中，aAPC經暫時基因編輯以在細胞表面上暫時表現包含免疫調節融合蛋白質之免疫調節組合物。在一些實施例中，aAPC在細胞表面上暫時表現免疫調節融合蛋白質，該融合蛋白質包含與細胞介素融合之膜錨。在一些實施例中，aAPC在細胞表面上暫時表現與選自由以下組成之群之細胞介素融合之膜錨：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15及IL-21。在一些實施例中，aAPC在細胞表面上暫時表現與選自由以下組成之群之細胞介素融合之膜錨：IL-2、IL-12、IL-15及IL-21。在一些實施例中，aAPC在細胞表面上暫時表現與選自由以下組成之群之細胞介素融合之膜錨：IL-12、IL-15及IL-21。

【0086】在一些實施例中，經修飾之TIL經基因修飾以在細胞表面上表現免疫調節組合物。在一些實施例中，

免疫調節組合物包含一或多種薄錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。在一些實施例中，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-2或其變異體。在某些實施例中，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-15或其變異體。在例示性實施例中，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-18或其變異體(例如DR-IL-18)。在一些實施例中，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-21或其變異體。

【0087】在某些實施例中，經修飾之TIL包含第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質及第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-15且第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-21。在一些實施例中，第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質及第二免疫調節融合蛋白質之表現係由經修飾之TIL中之NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子控制。

【0088】在一些實施例中，自N端至C端，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。在一些實施例中，IA為細胞介素。在例示性實施例中，IA係選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。在一些實施例中，IA為IL-2。在某些實施例中，IA

為IL-12。在一些實施例中，IA為IL-15。在某些實施例中，IA為IL-21。在一些實施例中，L為CD8a跨膜細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。在某些實施例中，L為B7-1跨膜域。在一些實施例中，L具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【0089】在例示性實施例中，自N端至C端，一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S1-IA1-L1-C1-L2-S2-IA2-L3-C2，其中S1及S2各自獨立地為信號肽，IA1及IA2各自獨立地為免疫調節劑，L1-L3各自獨立地為連接子，且C1及C2各自獨立地為細胞膜錨部分。在一些實施例中，S1與S2係相同的。在例示性實施例中，C1與C2係相同的。在一些實施例中，L2為可裂解連接子。在某些實施例中，L2為弗林蛋白酶可裂解連接子。

【0090】在一些實施例中，IA1及IA2各自獨立地為細胞介素。在一些實施例中，IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。在一些實施例中，IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群，IL-2及IL-12，其限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-2且另一者為IL-12。在一些實施例中，IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群：IL-15及IL-21，其限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-15且另一者為IL-21。

【0091】在例示性實施例中，C1及C2各自獨立地為

CD8a跨膜細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。在一些實施例中，C1及C2各自為B7-1跨膜域。在一些實施例中，C1及C2各具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【0092】在某些實施例中，經修飾之TIL在NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子之控制下表現一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，用反轉錄病毒載體轉導經修飾之TIL以表現一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，用載體(例如，慢病毒載體、反轉錄病毒載體或腺相關載體(AAV))或piggyBac轉位子轉導經修飾之TIL以表現一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【0093】亦提供包括由本文中所描述之方法中之任一者產生的經修飾之TIL的組合物。

【圖式簡單說明】

【0094】

[**圖1**]：例示性Gen 2(方法2A)圖表，其提供步驟A至F之概述。

[**圖2A**]-[**圖2C**]：用於TIL製造之Gen 2(方法2A)之實施例的方法流程圖。

[**圖3**]：展示經冷凍保存之TIL例示性製造方法(約22天)的實施例之圖。

[**圖4**]：展示Gen 2(方法2A，亦即，一種用於TIL製造

之22天方法)之實施例的圖。

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

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

[**圖7**]：例示性Gen 3型TIL製造方法。

[**圖8A**]至[**圖8D**]：**A)**展示2A方法(約22天型方法)與用於TIL製造之Gen 3方法(約14天至16天型方法)的實施例之間的比較。**B)**例示性方法Gen 3圖表，其提供步驟A至F之概述(約14天至16天型方法)。**C)**提供三種例示性Gen 3方法之圖表，其中概述三種方法變化形式中之每一者的步驟A至F(約14天或16天型方法)。**D)**例示性經修改之類Gen 2方法，其提供步驟A至F之概述(約22天型方法)。

[**圖9**]：提供Gen 2(方法2A)與Gen 3方法之間的可比較性之實驗流程圖。

[**圖10**]：展示各種Gen 2(方法2A)與Gen 3.1方法實施例之間的比較。

[**圖11**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0方法之實施例之各種特徵之表。

[**圖12**]：Gen 3方法(稱為Gen 3.1)之實施例之培養基條件的概述。

[**圖13**]：描述Gen 2、Gen 2.1及Gen 3.0方法之實施例之各種特徵之表。

[**圖14**]：比較Gen 2及Gen 3.0過程之實施例之各種特

徵的表。

[**圖15**]：提供所描述之擴增方法之各種實施例中的培養基用途的表。

[**圖16**]：Gen 3方法(16天型方法)之例示性實施例之示意圖。

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

[**圖18**]：提供結構I-A及I-B。圓柱體係指個別多肽結合域。結構I-A及I-B包括三個線性連接的衍生自例如4-1BBL或結合4-1BB的抗體的TNFRSF結合域，其摺疊形成三價蛋白質，該三價蛋白質接著經由IgG1-Fc(包含CH3和CH2域)與第二三價蛋白質連接，該IgG1-Fc隨後經由雙硫鍵(小長橢圓形)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而穩定結構並提供能夠將六個受體之細胞內信號傳導域與信號傳導蛋白集合在一起以形成信號傳導複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包含例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包含親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。

[**圖19**]：Gen 3方法(16天型方法)之例示性實施例之示意圖。

[**圖20**]：提供Gen 3.1方法(16天型方法)之例示性實施例的方法概述。

[**圖21**]：Gen 3.1測試方法(16天至17天型方法)之例示性實施例之示意圖。

[**圖 22**]：Gen 3方法(16天型方法)之例示性實施例之示意圖。

[**圖 23A**]-[**圖 23B**]：例示性Gen 2及例示性Gen 3方法之比較表。

[**圖 24**]：Gen 3方法(16天-17天型方法)製備時刻表之例示性實施例之示意圖。

[**圖 25**]：Gen 3方法(14天至16天型方法)之例示性實施例之示意圖。

[**圖 26A**]-[**圖 26B**]：Gen 3方法(16天型方法)之例示性實施例之示意圖。

[**圖 27**]：Gen 3方法(16天型方法)之例示性實施例之示意圖。

[**圖 28**]：Gen 2、Gen 2.1與Gen 3方法(16天型方法)之實施例的比較。

[**圖 29**]：Gen 2、Gen 2.1與Gen 3方法(16天型方法)之實施例的比較。

[**圖 30**]：Gen 3實施例組分。

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

[**圖 32**]：展示Gen 3方法(16天-17天型方法)之例示性實施例之組分。

[**圖 33**]：驗收準則表。

[**圖 34**]：用於與基因編輯方法(包括如本文中所描述之TALEN、鋅指核酸酶及CRISPR方法)一起使用之包括電致

孔步驟之TIL製造方法之一些實施例之描述。

[圖35]：用於與基因編輯方法(包括如本文中所描述之TALEN、鋅指核酸酶及CRISPR方法)一起使用之包括電致孔步驟之TIL製造方法之實施例之描述。

[圖36A]-**[圖36J]**：本文中所描述之TIL中可包括之例示性膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

[圖37A]-**[圖37D]**：本文中所描述之TIL中可包括之例示性膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

[圖38A]-**[圖38C]**：用於評估經膜結合之IL-15/IL-21轉導之前REP TIL之表現及信號傳導的研究概述。

[圖39A]-**[圖39B]**：用於評估經mIL-15/IL-21轉導之REP TIL中之mIL-15/IL21以及CD8及CD4 T細胞子集之表現的研究概述。

[圖40A]-**[圖40C]**：用於評估經mIL-15/IL-21轉導之CD8+ REP TIL之表現型的研究概述。

[圖41A]-**[圖41C]**：用於評估經mIL-15/IL-21轉導之CD4+之表現型的研究概述。

[圖42]：用於評估在本文中所描述之基因轉導及11天REP方法後表現TeIL-18及TeDR-IL18之TIL之擴增倍數、細胞存活率及轉導效率的研究概述。

[圖43A]-**[圖43B]**：用於評估表現TeIL-18及TeDR-IL18之TIL上IL-18及DRIL-18之表面表現的研究概述。

[圖44]：使用抗CD3抗體OKT3評估表現TeIL-18及TeDR-IL18之TIL在有及沒有TCR刺激之情況下產生IFN-γ

的研究概述。

[**圖 45**]：用於評估表現TeIL-18及TeDR-IL18之REP TIL之表現及IL-18活性的研究概述，其中TeIL-18及TeDRIL-18在誘導型NFAT啟動子之控制下。

[**圖 46A**]-[**圖 46C**]：使用KILR-THP-I細胞毒性分析之TeIL-IL18及TeDRIL-18 REP TIL功能研究概述。(A)-(C)新鮮解凍之TIL。(B)及(C)包括重複刺激TIL之額外實驗。

[**圖 47A**]-[**圖 47B**]：藉由TeIL-18及TeDRIL-18 ub KILR-THP-I細胞毒性分析評估IFN-γ產生之概述。

[**圖 48A**]-[**圖 48H**]：TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL之表現型及功能分析概述。(A)及(B)：評估新鮮解凍之CD4+(A)及CD8+(B)TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL的分化。(C)及(D)：評估重複刺激之CD4+(C)及CD8+(D)TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL的分化。(E)及(F)：評估新鮮解凍(E)及重複刺激(F)之TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL的活化。(F)及(G)：評估重複刺激之CD4+及CD8+ TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL的活化。

[**圖 49A**]-[**圖 49B**]：用於評估TeIL-18及TeDRIL-18對THP-I MHC-I及MHC-II表現之影響的研究概述。

[**圖 50**]描繪允許在本文中提供之標的TIL之實施例中表現成員錨定IL-12(TeIL-12)及PD-1 shRNA之例示性核酸。

[**圖 51**]描繪用於製備表現TeIL-12及/或NFAT-TeIL-12之TIL以投與至個體的例示性工作流程。

[**圖 52A**]-[**圖 52B**]：用於評估REP TIL中之TeIL-12及/或NFAT-TeIL-12表現的研究概述。(A)在REP收集後，TeIL-12在TeIL12 TIL上之表面表現係藉由流動式分析法用IL-12P70流動抗體(B)進行研究。NFAT-TeIL-12轉導之REP-TIL用具有指定稀釋度之TransACT或PMA刺激。刺激後48小時，研究表面表現TeIL-12表現。

[**圖 53**]：用於評估表現TeIL-12之TIL中之IL-12活性的研究概述。

[**圖 54A**]-[**圖 54B**]：用於評估轉導表現TeIL-12或NFAT-TeIL-12之REP後TIL之(A)擴增及(B)存活率的研究概述。

[**圖 55A**]-[**圖 55B**]：用於評估(A)TeIL-12及/或NFAT-TeIL-12在來自不同組織(包括兩個肺、一個頭頸、一個乳房及一個卵巢腫瘤樣品)之REP TIL群體中之頻率及(B)每個細胞之病毒基因體複本數(VCN)的研究概述。

[**圖 56A**]-[**圖 56D**]：用於評估(A)及(B)基於THP-1之同種異體細胞毒性分析中之細胞毒性，(C)及(D)TeIL-12 REP-TIL及NFAT驅動之誘導型TeIL-12 REP-TIL之IFN-γ產生的研究概述。

[**圖 57A**]-[**圖 57B**]：亦藉由使用兩個目標細胞群體(A)及(B)之xCelligence RTCA分析評估用於評估表現TeIL-12之TIL之細胞毒性的研究概述。

[**圖 58A**]-[**圖 58C**]：用於評估TIL殺傷功效之研究概述。進行(A)實驗設計示意圖。(B)KILR® THP-1細胞毒性

分析及IFN-g定量，及(C)Xcellgene RTCA殺傷分析。

[**圖59**]描繪用於評估CD8+、CD4+及CD4+/FoxP3- T細胞在經轉導以表現TeIL-12或NFAT-TeIL-12之REP TIL群體內之分佈的研究概述。

[**圖60A**]-[**圖60B**]：用於評估(A)CD8+及(B)CD4+ T細胞在經轉導以表現TeIL-12或NFAT-TeIL-12之REP TIL群體內如藉由各種細胞標記物量測之T細胞分化的研究概述。

[**圖61A**]-[**圖61B**]：用於評估(A)CD8+及(B)CD4+ T細胞在經轉導以表現TeIL-12或NFAT-TeIL-12之REP TIL群體內如藉由各種細胞標記物量測之T細胞耗竭的研究概述。

[**圖62A**]-[**圖62B**]：用於評估(A)CD8+及(B)CD4+ T細胞在經轉導以表現TeIL-12或NFAT-TeIL-12之REP TIL群體內如藉由各種細胞標記物量測之T細胞活化的研究概述。

[**圖63A**]-[**圖63B**]：用於評估(A)CD8+及(B)CD4+ T細胞在經轉導以表現TeIL-12或NFAT-TeIL-12之REP TIL群體內如藉由各種細胞標記物量測之T細胞功能的研究概述。

[**圖64A**]-[**圖64B**]：顯示以下程序後TeIL-15之(A)細胞擴增及(B)表面表現：在TeIL-15慢病毒基因轉導後，用飼養細胞、3000IU/ml IL-2及aCD3 Ab OKT3或HIT3a處理預REP TIL以進行REP擴增。在設置REP過程後之不同天數(第0天、第2天及第4天)，將OKT3(30ng/ml)或HIT3a(30ng/ml)添加至REP培養基中。REP擴增11天后，收集REP後TIL且分析。

[**圖65A**]-[**圖65B**]：顯示以下程序後TeIL-15/TeIL-21之(A)細胞擴增及(B)表面表現：在TeIL-15/TeIL-21慢病毒

基因轉導後，用飼養細胞、3000IU/ml IL-2及aCD3 Ab OKT3或HIT3a處理預REP TIL以進行REP擴增。在設置REP過程後之不同天數(第0天、第2天及第4天)，將OKT3(30ng/ml)或HIT3a(30ng/ml)添加至REP培養基中。REP擴增11天后，收集REP後TIL且分析。

[**圖66A**]-[**圖66B**]：顯示以下程序後TeIL-15之(A)細胞擴增及(B)表面表現：在TeIL-15慢病毒基因轉導後，用飼養細胞、3000IU/ml IL-2及指定濃度之OKT3處理預REP TIL以進行11天REP擴增。REP擴增11天后，收集REP後TIL且分析。

[**圖67A**]-[**圖67B**]：顯示以下程序後TeIL-15/TeIL-21之(A)細胞擴增及(B)表面表現：在TeIL-15/TeIL-21慢病毒基因轉導後，用飼養細胞、3000IU/ml IL-2及指定濃度之OKT3處理預REP TIL以進行REP擴增。REP擴增11天后，收集REP後TIL且分析。

序列表之簡要說明

【0095】SEQ ID NO:1為莫羅單抗(muromonab)之重鏈之胺基酸序列。

【0096】SEQ ID NO:2為莫羅單抗之輕鏈之胺基酸序列。

【0097】SEQ ID NO:3為重組人類IL-2蛋白之胺基酸序列。

【0098】SEQ ID NO:4為阿地介白素(aldesleukin)之胺

基酸序列。

【0099】SEQ ID NO:5為IL-2形式。

【0100】SEQ ID NO:6為奈瓦紐金α(nemvaleukin alfa)之胺基酸序列。

【0101】SEQ ID NO:7為IL-2形式。

【0102】SEQ ID NO:8為黏蛋白域多肽。

【0103】SEQ ID NO:9為重組人類IL-4蛋白質之胺基酸序列。

【0104】SEQ ID NO:10為重組人類IL-7蛋白質之胺基酸序列。

【0105】SEQ ID NO:11為重組人類IL-15蛋白質之胺基酸序列。

【0106】SEQ ID NO:12為重組人類IL-21蛋白質之胺基酸序列。

【0107】SEQ ID NO:13為IL-2序列。

【0108】SEQ ID NO:14為IL-2突變蛋白序列。

【0109】SEQ ID NO:15為IL-2突變蛋白序列。

【0110】SEQ ID NO:16為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2。

【0111】SEQ ID NO:17為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2。

【0112】SEQ ID NO:18為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3。

【0113】SEQ ID NO:19為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 kabat。

【0114】SEQ ID NO:20為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2

kabat。

【0115】SEQ ID NO:21為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 kabat。

【0116】SEQ ID NO:22為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 clothia。

【0117】SEQ ID NO:23為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 clothia。

【0118】SEQ ID NO:24為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 clothia。

【0119】SEQ ID NO:25為IgG.IL2R67A.H1之HCDR1_IL-2 IMGT。

【0120】SEQ ID NO:26為IgG.IL2R67A.H1之HCDR2 IMGT。

【0121】SEQ ID NO:27為IgG.IL2R67A.H1之HCDR3 IMGT。

【0122】SEQ ID NO:28為IgG.IL2R67A.H1之V_H鏈。

【0123】SEQ ID NO:29為IgG.IL2R67A.H1之重鏈。

【0124】SEQ ID NO:30為IgG.IL2R67A.H1之LCDR1 kabat。

【0125】SEQ ID NO:31為IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 kabat。

【0126】SEQ ID NO:32為IgG.IL2R67A.H1之LCDR3 kabat。

【0127】SEQ ID NO:33為IgG.IL2R67A.H1之LCDR1

chothia。

【0128】SEQ ID NO:34為IgG.IL2R67A.H1之LCDR2 chothia。

【0129】SEQ ID NO:35為IgG.IL2R67A.H1之LCDR3 chothia。

【0130】SEQ ID NO:36為V_L鏈。

【0131】SEQ ID NO:37為輕鏈。

【0132】SEQ ID NO:38為輕鏈。

【0133】SEQ ID NO:39為輕鏈。

【0134】SEQ ID NO:40為人類4-1BB之胺基酸序列。

【0135】SEQ ID NO:41為鼠類4-1BB之胺基酸序列。

【0136】SEQ ID NO:42為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(utomilumab)(PF-05082566)之重鏈。

【0137】SEQ ID NO:43為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈。

【0138】SEQ ID NO:44為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈可變區(V_H)。

【0139】SEQ ID NO:45為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈可變區(V_L)。

【0140】SEQ ID NO:46為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR1。

【0141】SEQ ID NO:47為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR2。

【0142】SEQ ID NO:48為4-1BB促效劑單株抗體烏圖

木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR3。

【0143】SEQ ID NO:49為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR1。

【0144】SEQ ID NO:50為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR2。

【0145】SEQ ID NO:51為4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR3。

【0146】SEQ ID NO:52為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(urelumab)(BMS-663513)之重鏈。

【0147】SEQ ID NO:53為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈。

【0148】SEQ ID NO:54為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈可變區(V_H)。

【0149】SEQ ID NO:55為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈可變區(V_L)。

【0150】SEQ ID NO:56為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR1。

【0151】SEQ ID NO:57為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR2。

【0152】SEQ ID NO:58為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR3。

【0153】SEQ ID NO:59為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR1。

【0154】SEQ ID NO:60為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞

魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR2。

【0155】SEQ ID NO:61為4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR3。

【0156】SEQ ID NO:62為TNFRSF促效劑融合蛋白質之Fc域。

【0157】SEQ ID NO:63為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0158】SEQ ID NO:64為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0159】SEQ ID NO:65為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0160】SEQ ID NO:66為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0161】SEQ ID NO:67為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0162】SEQ ID NO:68為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0163】SEQ ID NO:69為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0164】SEQ ID NO:70為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0165】SEQ ID NO:71為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0166】SEQ ID NO:72為TNFRSF促效劑融合蛋白質

之連接子。

【0167】SEQ ID NO:73為TNFRSF促效劑融合蛋白質之Fc域。

【0168】SEQ ID NO:74為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0169】SEQ ID NO:75為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0170】SEQ ID NO:76為TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0171】SEQ ID NO:77為4-1BB配位體(4-1BBL)胺基酸序列。

【0172】SEQ ID NO:78為4-1BBL多肽之可溶部分。

【0173】SEQ ID NO:79為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之重鏈可變區(V_H)。

【0174】SEQ ID NO:80為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式1之輕鏈可變區(V_L)。

【0175】SEQ ID NO:81為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之重鏈可變區(V_H)。

【0176】SEQ ID NO:82為4-1BB促效劑抗體4B4-1-1型式2之輕鏈可變區(V_L)。

【0177】SEQ ID NO:83為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區(V_H)。

【0178】SEQ ID NO:84為4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區(V_L)。

【0179】SEQ ID NO:85為人類OX40之胺基酸序列。

【0180】SEQ ID NO:86為鼠類OX40之胺基酸序列。

【0181】SEQ ID NO:87為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)之重鏈。

【0182】SEQ ID NO:88為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈。

【0183】SEQ ID NO:89為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈可變區(V_H)。

【0184】SEQ ID NO:90為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈可變區(V_L)。

【0185】SEQ ID NO:91為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR1。

【0186】SEQ ID NO:92為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR2。

【0187】SEQ ID NO:93為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR3。

【0188】SEQ ID NO:94為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR1。

【0189】SEQ ID NO:95為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR2。

【0190】SEQ ID NO:96為OX40促效劑單株抗體塔沃西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR3。

【0191】SEQ ID NO:97為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈。

【0192】SEQ ID NO:98為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈。

【0193】SEQ ID NO:99為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區(V_H)。

【0194】SEQ ID NO:100為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈可變區(V_L)。

【0195】SEQ ID NO:101為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1。

【0196】SEQ ID NO:102為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2。

【0197】SEQ ID NO:103為OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3。

【0198】SEQ ID NO:104為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1。

【0199】SEQ ID NO:105為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2。

【0200】SEQ ID NO:106為OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3。

【0201】SEQ ID NO:107為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈。

【0202】SEQ ID NO:108為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈。

【0203】SEQ ID NO:109為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區(V_H)。

【0204】SEQ ID NO:110為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區(V_L)。

【0205】SEQ ID NO:111為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1。

【0206】SEQ ID NO:112為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR2。

【0207】SEQ ID NO:113為OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR3。

【0208】SEQ ID NO:114為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR1。

【0209】SEQ ID NO:115為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR2。

【0210】SEQ ID NO:116為OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈CDR3。

【0211】SEQ ID NO:117為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈可變區(V_H)。

【0212】SEQ ID NO:118為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈可變區(V_L)。

【0213】SEQ ID NO:119為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR1。

【0214】SEQ ID NO:120為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR2。

【0215】SEQ ID NO:121為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之重鏈CDR3。

【0216】SEQ ID NO:122為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR1。

【0217】SEQ ID NO:123為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR2。

【0218】SEQ ID NO:124為OX40促效劑單株抗體Hu119-122之輕鏈CDR3。

【0219】SEQ ID NO:125為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈可變區(V_H)。

【0220】SEQ ID NO:126為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈可變區(V_L)。

【0221】SEQ ID NO:127為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR1。

【0222】SEQ ID NO:128為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR2。

【0223】SEQ ID NO:129為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之重鏈CDR3。

【0224】SEQ ID NO:130為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR1。

【0225】SEQ ID NO:131為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR2。

【0226】SEQ ID NO:132為OX40促效劑單株抗體Hu106-222之輕鏈CDR3。

【0227】SEQ ID NO:133為OX40配位體(OX40L)胺基酸序列。

【0228】SEQ ID NO:134為OX40L多肽之可溶部分。

【0229】SEQ ID NO:135為OX40L多肽之替代性可溶部分。

【0230】SEQ ID NO:136為OX40促效劑單株抗體008之重鏈可變區(V_H)。

【0231】SEQ ID NO:137為OX40促效劑單株抗體008之輕鏈可變區(V_L)。

【0232】SEQ ID NO:138為OX40促效劑單株抗體011之重鏈可變區(V_H)。

【0233】SEQ ID NO:139為OX40促效劑單株抗體011之輕鏈可變區(V_L)。

【0234】SEQ ID NO:140為OX40促效劑單株抗體021之重鏈可變區(V_H)。

【0235】SEQ ID NO:141為OX40促效劑單株抗體021之輕鏈可變區(V_L)。

【0236】SEQ ID NO:142為OX40促效劑單株抗體023之重鏈可變區(V_H)。

【0237】SEQ ID NO:143為OX40促效劑單株抗體023之輕鏈可變區(V_L)。

【0238】SEQ ID NO:144為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0239】SEQ ID NO:145為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0240】SEQ ID NO:146為OX40促效劑單株抗體之重

鏈可變區(V_H)。

【0241】SEQ ID NO:147為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0242】SEQ ID NO:148為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0243】SEQ ID NO:149為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0244】SEQ ID NO:150為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0245】SEQ ID NO:151為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0246】SEQ ID NO:152為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0247】SEQ ID NO:153為人類化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0248】SEQ ID NO:154為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0249】SEQ ID NO:155為人類化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0250】SEQ ID NO:156為OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0251】SEQ ID NO:157為OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0252】SEQ ID NO:158為PD-1抑制劑納武單抗

(nivolumab)之重鏈胺基酸序列。

【0253】SEQ ID NO:159為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0254】SEQ ID NO:160為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0255】SEQ ID NO:161為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0256】SEQ ID NO:162為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0257】SEQ ID NO:163為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0258】SEQ ID NO:164為PD-1抑制劑納武單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0259】SEQ ID NO:165為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0260】SEQ ID NO:166為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0261】SEQ ID NO:167為PD-1抑制劑納武單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0262】SEQ ID NO:168為PD-1抑制劑帕博利珠單抗(pembrolizumab)之重鏈胺基酸序列。

【0263】SEQ ID NO:169為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0264】SEQ ID NO:170為PD-1抑制劑帕博利珠單抗

之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0265】SEQ ID NO:171為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0266】SEQ ID NO:172為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0267】SEQ ID NO:173為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0268】SEQ ID NO:174為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0269】SEQ ID NO:175為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0270】SEQ ID NO:176為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0271】SEQ ID NO:177為PD-1抑制劑帕博利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0272】SEQ ID NO:178為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗(durvalumab)之重鏈胺基酸序列。

【0273】SEQ ID NO:179為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0274】SEQ ID NO:180為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0275】SEQ ID NO:181為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0276】SEQ ID NO:182為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之

重鏈CDR1胺基酸序列。

【0277】SEQ ID NO:183為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0278】SEQ ID NO:184為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0279】SEQ ID NO:185為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0280】SEQ ID NO:186為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0281】SEQ ID NO:187為PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0282】SEQ ID NO:188為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈胺基酸序列。

【0283】SEQ ID NO:189為PD-L1抑制劑阿維魯單抗(avelumab)之輕鏈胺基酸序列。

【0284】SEQ ID NO:190為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0285】SEQ ID NO:191為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0286】SEQ ID NO:192為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0287】SEQ ID NO:193為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0288】SEQ ID NO:194為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之

重鏈CDR3胺基酸序列。

【0289】SEQ ID NO:195為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0290】SEQ ID NO:196為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0291】SEQ ID NO:197為PD-L1抑制劑阿維魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0292】SEQ ID NO:198為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗(atezolizumab)之重鏈胺基酸序列。

【0293】SEQ ID NO:199為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0294】SEQ ID NO:200為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0295】SEQ ID NO:201為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0296】SEQ ID NO:202為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0297】SEQ ID NO:203為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0298】SEQ ID NO:204為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0299】SEQ ID NO:205為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0300】SEQ ID NO:206為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗

之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0301】SEQ ID NO:207為PD-L1抑制劑阿替利珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0302】SEQ ID NO:208為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗(ipilimumab)之重鏈胺基酸序列。

【0303】SEQ ID NO:209為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0304】SEQ ID NO:210為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈可變區(VH)胺基酸序列。

【0305】SEQ ID NO:211為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈可變區(VL)胺基酸序列。

【0306】SEQ ID NO:212為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0307】SEQ ID NO:213為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0308】SEQ ID NO:214為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0309】SEQ ID NO:215為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0310】SEQ ID NO:216為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0311】SEQ ID NO:217為CTLA-4抑制劑伊匹木單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0312】SEQ ID NO:218為CTLA-4抑制劑曲美單抗

(tremelimumab)之重鏈胺基酸序列。

【0313】SEQ ID NO:219為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0314】SEQ ID NO:220為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0315】SEQ ID NO:221為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0316】SEQ ID NO:222為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0317】SEQ ID NO:223為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0318】SEQ ID NO:224為CTLA-4抑制劑曲美單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0319】SEQ ID NO:225為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0320】SEQ ID NO:226為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0321】SEQ ID NO:227為CTLA-4抑制劑曲美單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0322】SEQ ID NO:228為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗(zalifrelimab)之重鏈胺基酸序列。

【0323】SEQ ID NO:229為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0324】SEQ ID NO:230為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗

之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0325】SEQ ID NO:231為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0326】SEQ ID NO:232為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0327】SEQ ID NO:233為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0328】SEQ ID NO:234為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0329】SEQ ID NO:235為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0330】SEQ ID NO:236為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0331】SEQ ID NO:237為CTLA-4抑制劑澤弗利單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0332】SEQ ID NO:238為CD8a跨膜域。

【0333】SEQ ID NO:239為B7-1跨膜細胞內域。

【0334】SEQ ID NO:240-245為適用於本文中所描述之免疫調節融合蛋白質中之例示性甘胺酸-絲胺酸連接子。

【0335】SEQ ID NO:246為適用於本文中所描述之免疫調節融合蛋白質中之例示性連接子。

【0336】SEQ ID NO:247為2A肽C端序列。

【0337】SEQ ID NO:248為豬捷申病毒(teschovirus)-1

2A肽。

【0338】SEQ ID NO:249為馬鼻炎A病毒2A肽。

【0339】SEQ ID NO:250為口蹄疫病毒2A肽。

【0340】SEQ ID NO:251為例示性弗林蛋白酶可裂解2A肽。

【0341】SEQ ID NO:252及253為人類IgE信號肽序列。SEQ ID NO:254為人類IL-2信號肽序列。

【0342】SEQ ID NO:255為6X NFAT IL-2最小啟動子。

【0343】SEQ ID NO:256為NFAT反應元件。

【0344】SEQ ID NO:257為人類IL-2啟動子序列。

【0345】SEQ ID NO:258為人類IL-15(N72D突變體)。

【0346】SEQ ID NO:259為人類IL-15R-α-Su/Fc域。

【0347】SEQ ID NO:260為人類IL-15R-α-Su(65aa截短型細胞外域)。

【0348】SEQ ID NO:261為人類IL-15同功異型物2。

【0349】SEQ ID NO:262為人類IL-15同功異型物1。

【0350】SEQ ID NO:263為人類IL-15(不具有信號肽)。

【0351】SEQ ID NO:264為人類IL-15R-α(85 aa截短型細胞外域)。

【0352】SEQ ID NO:265為人類IL-15R-α(182aa截短型細胞外域)。

【0353】SEQ ID NO:266為人類IL-15R-α。

【0354】SEQ ID NO:267為人類IL-12 p35子單元。

【0355】SEQ ID NO:268為人類IL-12 p40子單元。

【0356】SEQ ID NO:269為人類IL-18。

【0357】SEQ ID NO:270為人類IL-18變異體。

【0358】SEQ ID NO:271為人類IL-21。

【0359】SEQ ID NO:272為人類IL-2。

【0360】SEQ ID NO:273為人類CD40L。

【0361】SEQ ID NO:274為促效性抗人類CD40 VH(索替加單抗(Sotigalimab))。

【0362】SEQ ID NO:275為促效性抗人類CD40 VL(索替加單抗)。

【0363】SEQ ID NO:276為促效性抗人類CD40 scFv(索替加單抗)。

【0364】SEQ ID NO:277為促效性抗人類CD40 VH(達西珠單抗(Dacetuzumab))。

【0365】SEQ ID NO:278為促效性抗人類CD40 VL(達西珠單抗)。

【0366】SEQ ID NO:279為促效性抗人類CD40 scFv(達西珠單抗)。

【0367】SEQ ID NO:280為促效性抗人類CD40 VH(魯卡珠單抗(Lucatutuzumab))。

【0368】SEQ ID NO:281為促效性抗人類CD40 VL(魯卡珠單抗)。

【0369】SEQ ID NO:282為促效性抗人類CD40

scFv(魯卡珠單抗)。

【0370】SEQ ID NO:283為促效性抗人類CD40 VH(塞立路單抗(Selicrelumab))。

【0371】SEQ ID NO:284為促效性抗人類CD40 VL(塞立路單抗)。

【0372】SEQ ID NO:285為促效性抗人類CD40 scFv(塞立路單抗)。

【0373】SEQ ID NO:286為目標PD-1序列。

【0374】SEQ ID NO:287為目標PD-1序列。

【0375】SEQ ID NO:288為重複PD-1左重複序列。

【0376】SEQ ID NO:289為重複PD-1右重複序列。

【0377】SEQ ID NO:290為重複PD-1左重複序列。

【0378】SEQ ID NO:291為重複PD-1右重複序列。

【0379】SEQ ID NO:292為PD-1左TALEN核酸酶序列。

【0380】SEQ ID NO:293為PD-1右TALEN核酸酶序列。

【0381】SEQ ID NO:294為PD-1左TALEN核酸酶序列。

【0382】SEQ ID NO:295為PD-1右TALEN核酸酶序列。

【0383】SEQ ID NO:296為編碼SEQ ID NO:328之所拴繫之IL-15之核酸序列。

【0384】SEQ ID NO:297為編碼SEQ ID NO:402之所拴

繫之IL-21融合蛋白質之核酸序列。

【0385】SEQ ID NO:298為編碼SEQ ID NO:328之所拴繫之IL-15融合蛋白質且拴繫SEQ ID NO:402之IL-21融合蛋白質之核酸序列。

【0386】SEQ ID NO:299為編碼SEQ ID NO:303之所拴繫之IL-12融合蛋白質之核酸序列。核酸序列包括NFAT啟動子。

【0387】SEQ ID NO:300為編碼SEQ ID NO:328之所拴繫之IL-15融合蛋白質之核酸序列。核酸序列包括NFAT啟動子。

【0388】SEQ ID NO:301為編碼SEQ ID NO:402之所拴繫之IL-21融合蛋白質之核酸序列。核酸序列包括NFAT啟動子。

【0389】SEQ ID NO:302為編碼SEQ ID NO:328之所拴繫之IL-15融合蛋白質且拴繫SEQ ID NO:402之IL-21融合蛋白質之核酸序列。核酸序列包括NFAT啟動子。

【0390】SEQ ID NO:303為例示性所拴繫之IL-12(所拴繫之IL-12-Lr1-Ar2)之胺基酸序列。

【0391】SEQ ID NO:304為編碼SEQ ID NO:303之所拴繫之IL-12之核酸序列。

【0392】SEQ ID NO:305為例示性所拴繫之IL-18(所拴繫之IL-18-Lr1-Ar2)之胺基酸序列。

【0393】SEQ ID NO:306為編碼SEQ ID NO:305之所拴繫之IL-18之核酸序列。

【0394】SEQ ID NO:307為例示性所拴繫之變異型IL-18(所拴繫之DR-IL-18(6-27變異體)-Lr1-Ar2)之胺基酸序列。

【0395】SEQ ID NO:308為編碼SEQ ID NO:307之所拴繫之變異型IL-18之核酸序列。

【0396】SEQ ID NO:309為例示性所拴繫之IL-12/IL-15之胺基酸序列。

【0397】SEQ ID NO:310為編碼SEQ ID NO:309之所拴繫之IL-12/IL-15之核酸序列。

【0398】SEQ ID NO:311為例示性所拴繫之IL-18/IL-15之胺基酸序列。

【0399】SEQ ID NO:312為編碼SEQ ID NO:311之所拴繫之IL-18/IL-15之核酸序列。

【0400】SEQ ID NO:313為例示性所拴繫之抗CD40scFV(APX005M)之胺基酸序列。

【0401】SEQ ID NO:314為編碼SEQ ID NO:313之所拴繫之抗CD40scFV(APX005M)之核酸序列。

【0402】SEQ ID NO:315為例示性所拴繫之抗CD40scFV(達西珠單抗)之胺基酸序列。

【0403】SEQ ID NO:316為編碼SEQ ID NO:315之所拴繫之抗CD40scFV(達西珠單抗)之核酸序列。

【0404】SEQ ID NO:317為例示性所拴繫之抗CD40scFV(魯卡珠單抗)之胺基酸序列。

【0405】SEQ ID NO:318為編碼SEQ ID NO:317之所拴

繫之抗CD40scFV(魯卡珠單抗)之核酸序列。

【0406】SEQ ID NO:319為例示性所拴繫之抗CD40scFV(塞立路單抗)之胺基酸序列。

【0407】SEQ ID NO:320為編碼SEQ ID NO:319之所拴繫之抗CD40scFV(塞立路單抗)之核酸序列。

【0408】SEQ ID NO:321為編碼SEQ ID NO:273之CD40L之核酸序列。

【0409】SEQ ID NO:322為例示性所拴繫之CD40L/IL-15之胺基酸序列。

【0410】SEQ ID NO:323為編碼SEQ ID NO:311之所拴繫之CD40L/IL-15之核酸序列。

【0411】SEQ ID NO:324為例示性所拴繫之IL-2之胺基酸序列。

【0412】SEQ ID NO:325為編碼SEQ ID NO:313之所拴繫之IL-2之核酸序列。

【0413】SEQ ID NO:326為例示性所拴繫之IL-12之胺基酸序列。

【0414】SEQ ID NO:327為編碼SEQ ID NO:315之所拴繫之IL-12之核酸序列。

【0415】SEQ ID NO:328為例示性所拴繫之IL-15之胺基酸序列。

【0416】SEQ ID NO:329為編碼SEQ ID NO:317之所拴繫之IL-15之核酸序列。

【0417】SEQ ID NO:330為編碼GFP之核酸序列。

【0418】SEQ ID NOS:331-385為額外變異體IL-18 (例如，抗誘餌IL-18或“DR-IL18”)之核酸。

【0419】SEQ ID NO:386為例示性Clo05 1核酸酶域胺基酸序列。

【0420】SEQ ID NO:387為例示性piggyBac (PB)轉位酶胺基酸序列。

【0421】SEQ ID NO:388為例示性睡美人轉位酶胺基酸序列。

【0422】SEQ ID NO:389為例示性超活性睡美人(SB100X)轉位酶胺基酸序列。

【0423】SEQ ID NO:390為6XNFAT結合模體之例示性核酸序列。

【0424】SEQ ID NO:391為IL-2min啟動子之例示性核酸序列。

【0425】SEQ ID NO:392為所拴繫之IL-12 (TeIL-12)。

【0426】SEQ ID NO:393為IRES之例示性核酸序列。

【0427】SEQ ID NO:394為U6啟動子之例示性核酸序列。

【0428】SEQ ID NO:395- SEQ ID NO:401為PD-1 shRNA之例示性核酸序列。

【實施方式】

相關申請案之交叉引用

【0429】本申請案主張2022年1月28日申請之美國臨

時申請案第63/304,498號；2022年6月29日申請之美國臨時申請案第63/356,933號；2022年8月1日申請之美國臨時申請案第63/394,267號；2022年11月4日申請之美國臨時申請案第63/382,493號；及2022年11月30日申請之美國臨時申請案第63/429,114號之權利，其皆以全文引用之方式併入本文中。

I. 說明

【0430】利用TIL之授受性細胞療法為誘導各種癌症(包括白血病及黑色素瘤)中之腫瘤消退之有效方法。已發現使用包括免疫刺激性藥劑之佐劑可增強授受性細胞療法且將此類療法擴展至其他實體腫瘤。然而，諸如細胞介素(例如，介白素)之免疫調節劑之共同投藥可因所需高劑量而引起不合需要的毒性。因此，在正確的時間及位點提供此類佐劑對於避免此類不合需要的作用而言顯得至關重要。

【0431】本文中提供用於使用經修飾之TIL治療癌症之組合物及方法，其中經修飾之TIL包括與其細胞表面結合之一或多種免疫調節劑(例如，細胞介素)。與TIL結合之免疫調節劑提供局部免疫刺激作用，其可有利地增強患者受體中之TIL存活及/或抗腫瘤活性。因此，本文中所揭示之組合物及方法提供有效癌症療法。

II. 定義

【0432】除非另有定義，否則本文所用的所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域的技術人員通常所理解的含義相同的含義。本文所提及之所有專利及公開案皆以全文引用的方式併入本文中。

【0433】如本文中所使用，術語「共同投與(co-administration/co-administering)」、「與……組合投與(administered in combination with/administering in combination with)」、「同時(simultaneous)」及「並行(concurrent)」涵蓋向個體投與兩種或更多種活性醫藥成分(在本發明之較佳實施例中，例如複數種TIL)，使得活性醫藥成分及/或其代謝物兩者同時存在於個體中。共同投與包含以分開的組合物同時投給予、以分開的組合物在不同時間投與或以其中存在兩種或更多種活性醫藥成分之組合物之形式投與。以分開的組合物同時投與及以其中存在兩種試劑之組合物之形式投與為較佳的。

【0434】術語「活體內」係指發生於個體體內之事件。

【0435】術語「活體外」係指發生於個體體外之事件。活體外分析法涵蓋採用活細胞或死細胞的基於細胞之分析法，且亦可涵蓋不採用完整細胞的不含細胞之分析法。

【0436】術語「離體」係指涉及對已自個體身體移除的細胞、組織及/或器官進行治療或執行程序的事件。適當地，細胞、組織及/或器官可利用手術或治療方法返回

至個體體內。

【0437】術語「快速擴增」意謂抗原特異性TIL之數目在一週時間內增加至少約3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍)，更佳地在一週時間內增加至少約10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍)，或最佳在一週時間內增加至少約100倍。下文中揭示多種快速擴增方案。

【0438】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包括(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包括初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文所概述之自患者組織樣品獲得之TIL(有時稱為「新鮮收集」)，且「繼代TIL」係任何如本文中所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體，包括(但不限於)主體TIL及經擴增之TIL(「REP TIL」或「REP後TIL」)。TIL細胞群體可包含經基因修飾之TIL。

【0439】本文中之「細胞群體」(包含TIL)意指許多具有共同特質之細胞。通常，群體之數目在1×10^6至1×10^{10}之範圍內，其中不同的TIL群體包含不同數目。例如，初代TIL在IL-2的存在下的初始生長產生大約1×10^8個細胞之主體TIL群體。一般進行REP擴增以提供1.5×10^9至1.5×10^{10}個細胞群體用於輸注。

【0440】本文中「冷凍保存之TIL」意謂在約-150℃

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

【0441】本文中「解凍之冷凍保存之TIL」意謂先前經冷凍保存且隨後處理以恢復至室溫或更高溫度(包含但不限於細胞培養溫度或可向患者投與TIL之溫度)的TIL群體。

【0442】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標記物)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標記物中之一或多者分類：CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地，TIL可藉由重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。

【0443】術語「冷凍保存培養基(cryopreservation media/cryopreservation medium)」係指可用於冷凍保存細胞之任何培養基。此類培養基可包含包括7%至10% DMSO之培養基。例示性培養基包含CryoStor CS10、HypoThermosol以及其組合。術語「CS10」係指獲自幹細胞科技公司(Stemcell Technologies)或Biolife Solutions之冷凍保存培養基。CS10培養基可以商品名「CryoStor®CS10」來指代。CS10培養基為包括DMSO之

無血清、無動物成分的培養基。

【0444】術語「中央記憶T細胞」係指在人類中為CD45R0+且組成性表現CCR7 (CCR7^{hi})及CD62L (CD62^{hi})之T細胞子集。中央記憶T細胞之表面表現型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞之轉錄因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2及BMI1。中央記憶T細胞在TCR引發之後主要分泌IL-2及CD40L作為效應分子。中央記憶T細胞主要存在於血液的CD4隔室中，且在人類中按比例富集於淋巴結及扁桃體中。

【0445】術語「效應記憶T細胞」係指人類或哺乳動物T細胞之子集，如中央記憶T細胞，為CD45R0+，但已經失去對CCR7的組成性表現(CCR7^{lo})並且對於CD62L表現而言為異質的或低的(CD62L^{lo})。中央記憶T細胞之表面表現型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞之轉錄因子包含BLIMP1。效應記憶T細胞在抗原刺激之後快速分泌高含量發炎性細胞介素，包括干擾素-γ、IL4-及IL-5。效應記憶T細胞主要存在於血液的CD8隔室中，且在人類中按比例富集於肺、肝臟及腸道中。CD8+效應記憶T細胞攜帶大量的穿孔素。

【0446】術語「密閉系統」係指對外部環境密閉之系統。適用於細胞培養方法之任何密閉系統均可用於本發明之方法。密閉系統包括例如(但不限於)密閉G容器。一旦將腫瘤區段添加至密閉系統中，該系統不對外部環境開放，直至TIL準備好向患者投與為止。

【0447】如本文所用，術語「片段化(fragmenting)」、「片段(fragment)」及「片段化的(fragmented)」描述將腫瘤破壞之過程，包括機械片段化方法，諸如壓碎、切片、分割及粉碎腫瘤組織，以及任何其他用於破壞腫瘤組織之物理結構的方法。

【0448】術語「周邊血液單核細胞」及「PBMC」係指具有圓形細胞核之周邊血液細胞，包括淋巴球(T細胞、B細胞、NK細胞)及單核球。當用作抗原呈現細胞(PBMC為一種類型之抗原呈現細胞)時，周邊血液單核細胞較佳係經照射之同種異體周邊血液單核細胞。

【0449】術語「周邊血液淋巴球」及「PBL」係指自周邊血液擴增的T細胞。在一些實施例中，PBL係與來自供體之全血或血球分離術產物分離。在一些實施例中，PBL係藉由正向或負向選擇T細胞表現型(諸如CD3+ CD45+之T細胞表現型)而與來自供體之全血或血球分離術產物分離。

【0450】術語「抗CD3抗體」係指針對成熟T細胞之T細胞抗原受體中之CD3受體的抗體或其變異體，例如單株抗體，且包括人類、人類化、嵌合、鼠類或哺乳動物抗體。抗CD3抗體包括OKT-3，亦稱為莫羅單抗(muromonab)。抗CD3抗體亦包括UHCT1純系，亦稱為T3及CD3ε。其他抗CD3抗體包括例如奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizuma)及維西珠單抗(visilizumab)。

【0451】術語「OKT-3」(在本文中亦被稱為「OKT3」)

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

表1. 莫羅單抗(例示性OKT-3抗體)之胺基酸序列

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

【0452】術語「IL-2」(在本文中亦稱為「IL2」)係指稱為介白素-2之T細胞生長因子，且包括所有形式之IL-2，包括人類及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變異體。IL-2係描述於例如Nelson的《免疫學雜誌(*J . Immunol .*)》**2004,** *172,* 3983-88及

Malek, 《免疫學年度評論(*Annu. Rev. Immunol.*)》**2008,** *26,* 453-79，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之重組人類IL-2之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:3)。舉例而言，術語IL-2涵蓋人類重組形式之IL-2，諸如阿地介白素(PROLEUKIN，可購自多個供應商，每單次使用小瓶含22百萬IU)以及由美國新罕布什爾州次茅斯的CellGenix, Inc.(CELLGRO GMP)或美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-209-b)供應的重組IL-2形式及來自其他供應商的其他商業等效物。阿地介白素(去丙胺醯基-1，絲胺酸-125人類IL-2)為分子量大約15 kDa之非醣基化人類重組形式的IL-2。適用於本發明之阿地介白素之胺基酸序列於表2中給出(SEQ ID NO:4)。術語IL-2亦涵蓋如本文中所描述之聚乙二醇化形式的IL-2，包括聚乙二醇化IL2前藥貝培阿地介白素(bempegaldesleukin) (NKTR-214，如同SEQ ID NO:4之聚乙二醇化人類重組IL-2，其中平均6個離胺酸殘基係經[(2,7-雙{[甲基聚(氧乙烯)]胺基甲醯基}-9H-茀-9-基)甲氧基]羰基取代的N^6)，其可購自美國加利福尼亞州南舊金山的Nektar Therapeutics，或可藉由此項技術中已知之方法製備，諸如國際專利申請公開案第WO 2018/132496 A1號之實例19中描述之方法或美國專利申請公開案第US 2019/0275133 A1號之實例1中描述之方法，該等公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之貝培阿地白介素(NKTR-214)及其他聚乙二醇化IL2分子描述於

美國專利申請公開案第US 2014/0328791 A1號及國際專利申請公開案第WO 2012/065086 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之替代形式的結合IL-2描述於美國專利案第4,766,106號、第5,206,344號、第5,089,261號及第4,902,502號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。適用於本發明之IL-2調配物描述於美國專利案第6,706,289號中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0453】在一些實施例中，適合用於本發明之IL-2形式為可購自Synthorx,Inc.之THOR-707。THOR-707及適用於本發明之另外替代形式之IL-2的製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2020/0181220 A1號及第US 2020/0330601 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為介白素2(IL-2)結合物，其包含：分離及純化之IL-2多肽；及在選自以下之胺基酸位置結合至分離及純化之IL-2多肽的結合部分：K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107，其中胺基酸殘基之編號對應於SEQ ID NO:5。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自T37、T41、F42、F44、Y45、P65、

V69、L72及Y107。在一些實施例中，胺基酸位置選自R38及K64。在一些實施例中，胺基酸位置選自E61、E62及E68。在一些實施例中，胺基酸位置在E62。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成離胺酸、半胱胺酸或組胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成半胱胺酸。在一些實施例中，胺基酸殘基突變成離胺酸。在一些實施例中，選自K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72及Y107之胺基酸殘基進一步突變成非天然胺基酸。在一些實施例中，非天然胺基酸包含N6-疊氮基乙氧基-L-離胺酸(AzK)、N6-炔丙基乙氧基-L-離胺酸(PraK)、BCN-L-離胺酸、降冰片烯離胺酸、TCO-離胺酸、甲基四□井離胺酸、烯丙氧基羰基離胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、2-胺基-8-側氧基辛酸、對乙醯基-L-苯丙胺酸、對疊氮基甲基-L-苯丙胺酸(pAMF)、對碘-L-苯丙胺酸、間乙醯基苯丙胺酸、2-胺基-8-側氧基壬酸、對炔丙基氧基苯丙胺酸、對炔丙基-苯丙胺酸、3-甲基-苯丙胺酸、L-多巴(L-Dopa)、氟化苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、對疊氮基-L-苯丙胺酸、對醯基-L-苯丙胺酸、對苯甲醯基-L-苯丙胺酸、對溴苯基丙胺酸、對胺基-L-苯丙胺酸、異丙基-L-苯丙胺酸、O-烯丙基酪胺酸、O-甲基-L-酪胺酸、O-4-烯丙基-L-酪胺酸、4-丙基-L-酪胺酸、膦醯基酪胺酸、三-O-乙醯基-GlcNAcp-絲胺酸、L-磷絲胺酸、膦

醯基絲胺酸、L-3-(2-萘基)丙胺酸、2-胺基-3-((2-((3-(苯甲氧基)-3-側氧基丙基)胺基)乙基)硒烷基)丙酸、2-胺基-3-(苯基硒烷基)丙酸或硒半胱胺酸。在一典實施例中，相對於野生型IL-2多肽，IL-2結合物與IL-2受體α(IL-2Rα)次單元之親和力降低。在一典實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係與IL-2Rα之結合親和力降低約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或大於99%。在一典實施例中，相對於野生型IL-2多肽，降低之親和力係約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍、1000倍或更大。在一典實施例中，結合部分削弱或阻斷IL-2與IL-2Rα之結合。在一典實施例中，結合部分包含水溶性聚合物。在一典實施例中，另外的結合部分包含水溶性聚合物。在一典實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含聚乙二醇(PEG)、聚(丙二醇)(PPG)、乙二醇及丙二醇之共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯吡咯啶酮)、聚(羥烷基甲基丙烯醯胺)、聚(羥烷基甲基丙烯酸酯)、聚(醚)、聚(α-羥基酸)、聚(乙烯醇)、聚磷氮烯、聚噁唑啉(POZ)、聚(N-丙烯醯嗎啉)或其組合。在一典實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含PEG。在一典實施例中，PEG為線性PEG或分支鏈PEG。在一典實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含多醣。在一典實施例中，多醣包含聚葡萄糖、聚唾液酸(PSA)、玻尿酸(HA)、直鏈澱粉、肝素、硫酸乙醯肝素(HS)、糊精或羥乙基澱粉

(HES)。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含聚醣。在一些實施例中，水溶性聚合物各獨立地包含多元胺。在一些實施例中，結合部分包含蛋白質。在一些實施例中，另外的結合部分包含蛋白質。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包含白蛋白、轉鐵蛋白(transferrin)或運甲狀腺素蛋白(transthyretin)。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包含Fc部分。在一些實施例中，蛋白質各獨立地包含IgG之Fc部分。在一些實施例中，結合部分包含多肽。在一些實施例中，另外的結合部分包含多肽。在一些實施例中，多肽各獨立地包含XTEN肽、富甘胺酸高胺基酸聚合物(HAP)、PAS多肽、彈性蛋白樣多肽(ELP)、CTP肽或明膠樣蛋白質(GLK)聚合物。在一些實施例中，分離及純化之IL-2多肽藉由麩胺醯化修飾。在一些實施例中，結合部分直接結合至分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，結合部分經由連接子間接結合至分離及純化之IL-2多肽。在一些實施例中，連接子包含同型雙官能連接子。在一些實施例中，同型雙官能連接子包含羅曼特氏試劑(Lomant's reagent)二硫代雙(琥珀醯亞胺基丙酸酯)DSP、3'3'-二硫代雙(丙酸磺基琥珀醯亞胺酯)(DTSSP)、辛二酸二琥珀醯亞胺酯(DSS)、辛二酸雙(磺基琥珀醯亞胺酯)(BS)、酒石酸二琥珀醯亞胺酯(DST)、酒石酸二磺基琥珀醯亞胺酯(磺基DST)、糖基雙(琥珀醯亞胺基丁二酸)伸乙酯(EGS)、戊二酸二琥珀醯亞胺酯(DSG)、碳酸N,N'-二琥珀醯亞胺酯(DSC)、二亞胺代二酸二甲酯(DMA)、庚二亞胺酸二甲酯

(DMP)、辛二亞胺酸二甲酯(DMS)、二甲基-3,3'-二硫代雙丙醯亞胺酸酯(DTBP)、1,4-二(3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺基)丁烷(DPDPB)、雙順丁烯二醯亞胺基己烷(BMH)、含有芳基鹵化物之化合物(DFDNB)(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯或1,3-二氟-4,6-二硝基苯)、4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基碸(DFDNPS)、雙-[β-(4-疊氮基柳基醯胺基)乙基]二硫化物(BASED)、甲醛、戊二醛、1,4-丁二醇二縮水甘油醚、己二酸二醯肼、碳醯肼、鄰甲苯胺、3,3'-二甲基聯苯胺、聯苯胺、α,α'-對二胺基聯苯、二碘-對二甲苯磺酸、N,N'-伸乙基-雙(碘乙醯胺)或N,N'-六亞甲基-雙(碘乙醯胺)。在一些實施例中，連接子包含異型雙官能連接子。在一些實施例中，異型雙官能連接子包含3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(sPDP)、長鏈3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(LC-sPDP)、水溶性長鏈3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-琥珀醯亞胺酯(磺基-LC-sPDP)、琥珀醯亞胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯(sMPT)、磺基琥珀醯亞胺基-6-\-[α-甲基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯醯胺基]己酸酯(磺基-LC-sMPT)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯(MBs)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-MBs)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(sIAB)、(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸磺基琥珀醯亞

胺酯(磺基-sIAB)、琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(sMPB)、磺基琥珀醯亞胺基-4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸酯(磺基-sMPB)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)琥珀醯亞胺酯(GMBs)、N-(γ-順丁烯二醯亞胺基丁醯氧基)磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-GMBs)、6-((碘乙醯基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIAX)、6-[6-(((碘乙醯基)胺基)己醯基)胺基]己酸琥珀醯亞胺酯(sIAXX)、4-(((碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(sIAC)、6-(((((4-碘乙醯基)胺基)甲基)環己烷-1-羰基)胺基)己酸琥珀醯亞胺酯(sIACX)、碘乙酸對硝苯酯(NPIA)、羰基反應性及硫氫基反應性交聯劑，諸如4-(4-N-順丁烯二醯亞胺基苯基)丁酸醯肼(MPBH)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-醯肼-8(M_2C_2H)、3-(2-吡啶基二硫基)丙醯基醯肼(PDPH)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-疊氮柳酸(NHs-AsA)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-疊氮水楊酸(磺基-NHs-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-(4-疊氮柳基醯胺基己酸酯(磺基-NHs-LC-AsA)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(對疊氮柳基醯胺基)乙基-1,3'-二硫丙酸酯(sAsD)、N-羥基琥珀醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(HsAB)、N-羥基磺基琥珀醯亞胺基-4-疊氮苯甲酸酯(磺基-HsAB)、N-琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(sANPAH)、磺基琥珀醯亞胺基-6-(4'-疊氮基-2'-硝基苯基胺基)己酸酯(磺基-sANPAH)、N-5-疊氮基-2-硝基苯甲醯氧基丁二醯亞胺(ANB-NOs)、磺基琥珀醯亞胺基-2-(間疊氮基-鄰硝基苯甲醯胺基)-乙基-1,3'-二硫丙酸酯

(sAND)、N-琥珀醯亞胺基-4(4-疊氮苯基)1,3'-二硫丙酸酯(sADP)、(4-疊氮苯基)-1,3'-二硫丙酸N-磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sADP)、4-(對疊氮苯基)丁酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAPB)、2-(7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙醯胺)乙基-1,3'-二硫丙酸磺基琥珀醯亞胺酯(sAED)、7-疊氮基-4-甲基香豆素-3-乙酸磺基琥珀醯亞胺酯(磺基-sAMCA)、重氮丙酮酸對硝苯酯(ρNPDP)、對硝苯基-2-重氮-3,3,3-三氟丙酸酯(PNP-DTP)、1-(對疊氮基柳基醯胺基)-4-(碘乙醯胺基)丁烷(AsIB)、N-[4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁基]-3'-(2'-吡啶基二硫基)丙醯胺(APDP)、二苯甲酮-4-碘乙醯胺、對疊氮基苯甲醯基醯肼(ABH)、4-(對疊氮基柳基醯胺基)丁胺(AsBA)或對疊氮苯基乙二醛(APG)。在一些實施例中，連接子包含可裂解連接子，視情況包含二肽連接子。在一些實施例中，二肽連接子包含Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala或Val-Lys。在一些實施例中，連接子包含不可裂解連接子。在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺基，視情況包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(mc)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(sMCC)或磺基琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-sMCC)。在一些實施例中，連接子進一步包含間隔子。在一些實施例中，間隔子包含對胺基苯甲基醇(PAB)、對胺基苯甲氧基羰基(PABC)、其衍生物或類似物。在一些實施例中，結合部分能夠延長IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，另外的結合部分能夠延長

IL-2結合物之血清半衰期。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為本文所描述之任一種IL-2形式的片段。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式係如美國專利申請公開案US 2020/0181220 A1號及美國專利申請公開案US 2020/0330601 A1號中所揭示般聚乙二醇化。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少80%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，IL-2多肽包含相對於SEQ ID NO:5之一個殘基的N端缺失。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式缺乏IL-2R α鏈接合，但保持與中間親和力IL-2R β-γ信號傳導複合物的正常結合。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-離胺酸(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少90%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-離胺酸

(AzK)，其共價連接於包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及參照SEQ ID NO:5中的胺基酸位置對於位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸的AzK取代物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為IL-2結合物，其包含：IL-2多肽，其包含N6-疊氮基乙氧基-L-離胺酸(AzK)，其共價連接至包含聚乙二醇(PEG)之結合部分，其中：IL-2多肽包含與SEQ ID NO:5具有至少98%序列一致性之胺基酸序列；及參考SEQ ID NO:5中的胺基酸位置，對位置K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69或L72處的胺基酸之AzK取代。

【0454】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為奈瓦紐金α(亦稱為ALKS-4230(SEQ ID NO:6)，其可購自阿爾凱默斯公司(Alkermes, Inc.))。奈瓦紐金α亦被稱為人類介白素2片段(1-59)變異體($Cys^{125}>Ser^{51}$)，其經由肽基連接子($^{60}GG^{61}$)融合至人類介白素2片段(62-132)，該片段經由肽基連接子($^{133}GSGGGS^{138}$)融合至人類介白素2受體α鏈片段(139-303)，在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中產生，經醣基化；人類介白素2(IL-2)(75-133)-肽[Cys^{125}(51)>Ser]-突變體(1-59)，其經由G_2肽連接子(60-61)融合至人類介白素2(IL-2)(4-74)-肽(62-132)且經由GSG_3S肽連接子(133-138)融合至人類介白素2受體α鏈(IL2R子單元α、IL2Rα、IL2RA)(1-165)-肽(139-303)，在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞

中產生，糖型α。奈瓦紐金α之胺基酸序列提供於SEQ ID NO:6中。在一些實施例中，奈瓦紐金α呈現以下轉譯後修飾：在以下位置處之二硫橋鍵：31-116、141-285、184-242、269-301、166-197或166-199、168-199或168-197(使用SEQ ID NO:6中之編號)，及在以下位置處之醣基化位點：N187、N206、T212(使用SEQ ID NO:6中之編號)。奈瓦紐金α之製備及特性以及適用於本發明之IL-2的其他替代形式描述於美國專利申請公開案第US 2021/0038684 A1號及美國專利案第10,183,979號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為與SEQ ID NO:6具有至少80%、至少90%、至少95%或至少90%序列一致性之蛋白質。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式具有SEQ ID NO:6中所提供之胺基酸序列或其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包含SEQ ID NO:7之胺基酸24-452之融合蛋白質或其變異體、片段或衍生物。在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包含與SEQ ID NO:7之胺基酸24-452具有至少80%、至少90%、至少95%或至少90%序列一致性之胺基酸序列之融合蛋白質，或其變異體、片段或衍生物。適用於本發明之其他IL-2形式描述於美國專利案第10,183,979號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。視情況，在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式為包含第一融合搭配物之融合蛋白質，該第一融合搭配物藉由黏蛋白域多肽連接子連接至第二融合搭配物，其中該第一

融合搭配物為IL-1Rα或與IL-1Rα具有至少98%胺基酸序列一致性且具有IL-Rα的受體拮抗劑活性的蛋白質，且其中第二融合搭配物包含全部或一部分包含Fc區的免疫球蛋白，其中黏蛋白域多肽連接子包含SEQ ID NO:8或與SEQ ID NO:8具有至少90%序列一致性的胺基酸序列，且其中與第一融合搭配物在不存在黏蛋白域多肽連接子的情況下與第二融合搭配物的融合相比，融合蛋白質的半衰期有所改良。

表2. 介白素的胺基酸序列。

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

SEQ ID NO:12 重組人類 IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【0455】在一些實施例中，適用於本發明之IL-2形式包括抗體細胞介素移植蛋白質，該抗體細胞介素移植蛋白質包含：重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及移植至V_H或V_L之CDR中之IL-2分子或其片段，其中相對於調節性T細胞，該抗體細胞介素移植蛋白質優先擴增T效應細胞。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該IL-2分子為突變蛋白，並且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，IL-2方案包含投與美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中所描述之抗體，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含：重鏈可變區(VH)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(VL)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及移植至V_H或V_L之CDR中之IL-2分子或其片段，其中該IL-2分子為突變蛋白，其中相對於調節性T細胞，該抗體細胞介素移植蛋白優先擴增T效應細胞，且其中該抗體進一步包含選自由以下組成之群之IgG類重鏈及IgG類輕鏈：包含SEQ ID

NO:39之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:38之IgG類重鏈；包含SEQ ID NO:37之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:29之IgG類重鏈；包含SEQ ID NO:39之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:29之IgG類重鏈；及包含SEQ ID NO:37之IgG類輕鏈及包含SEQ ID NO:38之IgG類重鏈。

【0456】在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_H之HCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR1中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR2中，其中IL-2分子為突變蛋白。在一些實施例中，IL-2分子或其片段移植至V_L之LCDR3中，其中IL-2分子為突變蛋白。

【0457】IL-2分子之插入可在CDR之N端區處或附近，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含併入CDR中之IL-2分子，其中IL2序列不會將CDR序列框移。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含併入CDR中之IL-2分子，其中IL-2序列置換CDR序列之全部或一部分。IL-2分子置換可在CDR之N端區處，在CDR之中間區中，或在CDR之C端區處或附近。IL-2分子置換可少至CDR序列或整個CDR序列之一或兩個胺基酸。

【0458】在一些實施例中，IL-2分子直接移植至無肽連接子之CDR中，其中在CDR序列與IL-2序列之間沒有另外的胺基酸。在一些實施例中，IL-2分子間接移植至具有肽連接子之CDR中，其中CDR序列與IL-2序列之間存在一或多個另外的胺基酸。

【0459】在一些實施例中，本文所描述之IL-2分子為IL-2突變蛋白。在一些情況下，IL-2突變蛋白包含R67A取代。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包含胺基酸序列SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:15。在一些實施例中，IL-2突變蛋白包含美國專利申請公開案第US 2020/0270334 A1號中表1中的胺基酸序列，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文。

【0460】在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含選自由SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22及SEQ ID NO:25組成之群的HCDR1。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含選自由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:16組成之群的HCDR1。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含選自由以下組成之群的HCDR1：選自由SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:26組成之群的HCDR2。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含選自由SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24及SEQ ID NO:27組成之群的HCDR3。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含V_H區，其包含SEQ ID NO:28之胺

基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含重鏈，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含V_L區，其包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含輕鏈，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含V_H區，其包含SEQ ID NO:28之胺基酸序列；及V_L區，其包含SEQ ID NO:36之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:29之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:37之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白質包含重鏈區，其包含SEQ ID NO:38之胺基酸序列；及輕鏈區，其包含SEQ ID NO:39之胺基酸序列。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含美國專利申請公開案第2020/0270334 A1號之IgG.IL2F71A.H1或IgG.IL2R67A.H1或其變異體、衍生物或片段，或其保守性胺基酸取代，或與其具有至少80%、至少90%、至少95%或至少98%序列一致性的蛋白質。在一些實施例中，本文所描述之抗體細胞介素移植蛋白之抗體組分包含帕利珠單抗之免疫球蛋白序列、構架序列或CDR

序列。在一些實施例中，本文中所描述之抗體細胞介素移植蛋白質的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如(但不限於)阿地介白素或類似分子)長。在一些實施例中，本文中所描述之抗體細胞介素移植蛋白質具有如表3中所闡述之序列。

表3：例示性帕利珠單抗抗體-IL-2移植蛋白質之序列

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:13 IL-2	MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153	60 120
SEQ ID NO:14 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133	60 120
SEQ ID NO:15 IL-2 突變蛋白	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133	60 120
SEQ ID NO:16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145	60 120
SEQ ID NO:17 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16	
SEQ ID NO:18 HCDR3	SMITNWYFDV 10	
SEQ ID NO:19 HCDR1_IL-2 kabat	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141	60 120
SEQ ID NO:20 HCDR2 kabat	DIWWDDKKDY NPSLKS 16	
SEQ ID NO:21 HCDR3 kabat	SMITNWYFDV 10	
SEQ ID NO:22 HCDR1_IL-2 clothia	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142	60 120
SEQ ID NO:23 HCDR2 clothia	WWDDK	5
SEQ ID NO:24 HCDR3 clothia	SMITNWYFDV 10	
SEQ ID NO:25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM PKKATELKHL QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143	60 120
SEQ ID NO:26 HCDR2 IMGT	IWWDDKK	7
SEQ ID NO:27 HCDR3 IMGT	ARSMITNWYF DV 12	

SEQ ID NO:28 V_H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSS 253
SEQ ID NO:29 重鏈	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWYF DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 533
SEQ ID NO:30 LCDR1 kabat	KAQLSVGYMH 10
SEQ ID NO:31 LCDR2 kabat	DTSKLAS 7
SEQ ID NO:32 LCDR3 kabat	FQGSGYPFT 9
SEQ ID NO:33 LCDR1 chothia	QLSVGY 6
SEQ ID NO:34 LCDR2 chothia	DTS 3
SEQ ID NO:35 LCDR3 chothia	GSGYPF 6
SEQ ID NO:36 V_L	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106
SEQ ID NO:37 輕鏈	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:38 輕鏈	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF 240 DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH 360 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV 420 HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR 480 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF 540 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 583
SEQ ID NO:39 輕鏈	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR 60 FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213

【0461】術語「IL-4」(在本文中亦稱「IL4」)係指被稱為介白素4之細胞介素，其由Th2 T細胞及嗜酸性球、嗜鹼性球及肥大細胞產生。IL-4調節初始輔助T細胞(Th0細胞)分化成Th2 T細胞。Steinke及Borish，《呼吸研究(*Respir. Res.*)》**2001,** *2*, 66-70。在由IL-4活化後，Th2 T細

胞隨後以正回饋迴路產生另外IL-4。IL-4亦刺激B細胞增殖及II類MHC表現，且誘導來自B細胞之類別轉換至IgE及IgG1表現。適用於本發明之重組人類IL-4可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-211)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(ThermoFisher Scientific，Inc.)(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco CTP0043)。適用於本發明之重組人類IL-4之胺基酸序列提供於表2中(SEQ ID NO:9)。

【0462】術語「IL-7」(在本文中亦稱為「IL7」)係指稱為介白素7的醣基化的組織衍生性細胞介素，其可獲自基質及上皮細胞以及樹突狀細胞。Fry及Mackall，《血液(*Blood*)》**2002**，*99*，*3892-904*。IL-7可以刺激T細胞的發育。IL-7與IL-7受體(一種由IL-7受體α及共同γ鏈受體組成之異二聚體)結合，其屬於對於T細胞在胸腺內之發育及在周邊內之存活而言重要之一系列信號。適用於本發明之重組人類IL-7可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目錄號CYT-254)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號Gibco PHC0071)。適用於本發明之重組人類IL-7之胺基酸序列提供於表2中(SEQ ID NO:10)。

【0463】術語「IL-15」(在本文中亦稱為「IL15」)係指稱為介白素-15之T細胞生長因子，且包括所有形式之IL-2，包括人類及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形

式、生物類似物及其變異體。IL-15描述於例如Fehniger及Caligiuri的《血液》**2001**, 97, 14-32中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-15與IL-2共用β及γ信號傳導受體子單元。重組人類IL-15為分子質量為12.8 kDa的含有114個胺基酸(及N端甲硫胺酸)的單一非醣基化多肽鏈。重組人類IL-15可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.(目錄號CYT-230-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-15重組蛋白，目錄號34-8159-82)。適用於本發明之重組人類IL-15之胺基酸序列提供於表2中(SEQ ID NO:11)。

【0464】術語「IL-21」(在本文中亦稱為「IL21」)係指稱為介白素-21之多效性細胞介素蛋白，且包括所有形式之IL-21，包括人類及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及其變異體。IL-21描述於例如Spolski及Leonard，《自然綜述：藥物發現(*Nat. Rev. Drug. Disc.*)》**2014,** *13,* 379-95，其揭示內容以引用之方式併入本文中。IL-21主要藉由自然殺手T細胞及經活化之人類$CD4^+$ T細胞產生。重組人類IL-21為分子質量為15.4 kDa之含有132個胺基酸的單一非醣基化多肽鏈。重組人類IL-21可購自多個供應商，包括美國新澤西州東不倫瑞克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目錄號CYT-408-b)及美國馬薩諸塞州沃爾瑟姆的賽默飛世爾科技公司(人類IL-21重組蛋白，目錄號14-8219-80)。適用於本發明之重組人類IL-21之胺基酸序列提供於表2中(SEQ ID NO:12)。

【0465】當指示「抗腫瘤有效量」、「腫瘤抑制有效量」或「治療量」時，本發明組合物待投與的精確量可由醫師考慮患者(個體)之年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移程度及病狀的個別差異來確定。通常可說明本文所描述之包含腫瘤浸潤性淋巴球(例如繼代TIL或基因修飾之細胞毒性淋巴球)的醫藥組合物可以10^4至10^{11}個細胞/公斤體重(例如，10^5至10^6、10^5至10^{10}、10^5至10^{11}、10^6至10^{10}、10^6至10^{11}、10^7至10^{11}、10^7至10^{10}、10^8至10^{11}、10^8至10^{10}、10^9至10^{11}或10^9至10^{10}個細胞/公斤體重)的劑量投與，包括在彼等範圍內之所有整數值。TIL(在一些情況下，包括經基因修飾之細胞毒性淋巴球)組合物亦可以此等劑量多次投與。TIL(在一些情況下，包括經基因工程改造之TIL)可藉由使用免疫療法中通常已知之輸注技術來投與(參見例如Rosenberg等人，《新英格蘭醫學雜誌(*New Eng. J. of Med.*)》***1988***, 319, 1676)。特定患者之最佳劑量及治療方案可容易由所屬醫藥領域的技術人員藉由監測患者之疾病病徵且相應地調整治療來確定。

【0466】術語「血液惡性病(hematological malignancy/hematologic malignancy)」或有相關意義之術語係指哺乳動物造血及淋巴組織(包括(但不限於)血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統之組織)的癌症及腫瘤。血液惡性病亦稱為「液體腫瘤」。血液惡性病包括(但不限於)急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴球性淋巴瘤(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性

白血病(CML)、多發性骨髓瘤、急性單核球性白血病(AMoL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤。術語「B細胞惡性血液病」係指影響B細胞之血液惡性病。

【0467】術語「液體腫瘤」係指性質上為流體的異常細胞團塊。液體腫瘤癌症包括(但不限於)白血病、骨髓瘤及淋巴瘤，以及其他血液惡性病。獲自液體腫瘤之TIL在本文中亦可稱為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。獲自液體腫瘤(包括在周邊血液中循環之液體腫瘤)之TIL在本文中亦可稱為PBL。術語MIL、TIL及PBL在本文中可互換使用且僅基於衍生細胞之組織類型而有所不同。

【0468】如本文所用，術語「微環境」可指作為整體之實體或血液腫瘤微環境或可指在微環境內之個別細胞子集。如本文所用，腫瘤微環境係指以下之複雜混合物：「促進贅生性轉化、支援腫瘤生長及侵襲、保護腫瘤不受宿主免疫力影響、鼓勵治療抗性且提供顯性轉移茁壯成長之生態棲位(niche)之細胞、可溶因子、信號傳導分子、細胞外基質及機械信號」，如Swartz等人，《癌症研究(*Cancer Res.*)》, **2012**, *72*, 2473中所描述。儘管腫瘤表現應由T細胞識別之抗原，但由於微環境之免疫抑制，免疫系統清除腫瘤的情況係罕見的。

【0469】在一些實施例中，本發明包括一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非清髓性化療預治療。在一些實施例中，可提供TIL

群體，其中患者在輸注根據本發明之TIL之前經非清髓性化療預治療。在一些實施例中，非清髓性化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，在根據本發明之非清髓性化療及TIL輸注之後(第0天)，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2的靜脈內輸注以達到生理耐受。

【0470】實驗發現表明，在授受性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗減藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(「細胞介素庫」)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗減步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【0471】術語「有效量」或「治療有效量」係指如本文中所描述之化合物或化合物組合之量，其足以實現所預期應用，包括(但不限於)疾病治療。治療有效量可視預期應用(活體外或活體內)或所治療之個體及疾病病狀(例如，個體之體重、年齡及性別)、疾病病狀之嚴重程度或投給、予方式而變化。該術語亦適用於將誘發目標細胞中之特定反應(例如血小板黏附及/或細胞遷移減少)之劑量。特定劑量將視以下而變化：所選特定化合物、所依循之給藥方案、化合物是否與其他化合物組合投與、投與時序、其所投與之組織及其中攜帶化合物之物理遞送系統。

【0472】術語「治療(treatment/treating/treat)」及其

類似術語係指獲得所要的藥理學及/或生理學效應。該效應就完全或部分預防疾病或其症狀而言可具預防性，且/或就部分或完全治癒疾病及/或可歸因於該疾病之不良影響而言可具治療性。如本文中所使用，「治療」涵蓋哺乳動物，尤其人類中之疾病之任何治療，且包括：(a)預防可能易患疾病但尚未診斷為患有該疾病之個體中出現該疾病；(b)抑制疾病，亦即，遏制其發展或進展；及(c)緩解疾病，亦即，引起疾病消退及/或緩解一或多種疾病症狀。「治療」亦意欲涵蓋遞送試劑以便提供藥理學效應，即使在不存在疾病或病狀之情況下亦如此。舉例而言，「治療」涵蓋可在不存在疾病病狀之情況下(例如在疫苗之情況下)引發免疫反應或賦予免疫性的組合物之遞送。

【0473】當參考核酸或蛋白質之部分使用時，術語「異源」指示核酸或蛋白質包含兩個或更多個在自然界中發現彼此之間沒有相同關係的子序列。舉例而言，通常以重組方式產生核酸，其具有兩個或更多個來自無關基因的經佈置以製造新的功能性核酸序列的序列，例如來自一個來源之啟動子及來自另一來源之編碼區或來自不同來源之編碼區。類似地，異源蛋白指示蛋白質包含兩個或更多個在自然界中未發現彼此呈相同關係之子序列(例如融合蛋白質)。

【0474】在兩個或更多個核酸或多肽之上下文中，術語「序列一致性(sequence identity)」、「一致性百分比(percent identity)」及「序列一致性百分比(sequence percent identity)」

(或其同義詞，例如「99%一致」)係指兩個或更多個序列或子序列在進行比較及比對(需要時引入間隔)以達到最大對應性且不將任何保守性胺基酸取代視為序列一致性之部分時，該兩個或更多個序列或子序列係相同的或具有相同的特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可使用序列比較軟體或演算法或藉由目視檢查來量測。所屬領域中已知可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之比對的各種演算法及軟體。用以判定序列一致性百分比之適合的程式包括例如可購自美國政府的國家生物技術資訊中心(U.S. Government's National Center for Biotechnology Information) BLAST網站之BLAST套裝程式。兩個序列之間的比較可使用BLASTN或BLASTP演算法進行。BLASTN用於比較核酸序列，而BLASTP用於比較胺基酸序列。ALIGN、ALIGN-2 (美國加利福尼亞州南舊金山的基因泰克(Genentech))或MegAlign (可購自DNASTAR)係另外的可用於比對序列之可供大眾使用的軟體程式。本領域技術人員可以藉由特定的比對軟體來判定用於最大比對的適當參數。在某些實施例中，使用比對軟體的預設參數。

【0475】如本文所用，術語「變異體」涵蓋(但不限於)包含與參考抗體之胺基酸序列不同之胺基酸序列的抗體或融合蛋白質，不同之處在於在參考抗體之胺基酸序列之內或相鄰的某些位置有一或多個取代、缺失及/或添加。與參考抗體之胺基酸序列相比，變異體可以在其胺基酸序列中包含一或多個保守取代。保守取代可涉及例如類

似帶電或不帶電胺基酸之取代。變異體保留與參考抗體之抗原特異性結合的能力。術語變異體亦包括聚乙二醇化抗體或蛋白質。

【0476】本文中「腫瘤浸潤性淋巴球」或「TIL」意謂最初作為已離開個體血流且遷移至腫瘤中的白血球獲得之細胞群體。TIL包括(但不限於)$CD8^+$細胞毒性T細胞(淋巴球)、Th1及Th17 $CD4^+$ T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞及M1巨噬細胞。TIL包括初代TIL及繼代TIL兩者。「初代TIL」係如本文中所概述之自患者組織樣品獲得之細胞(有時稱為「新鮮收集」),且「繼代TIL」係任何如本文中所論述之經擴增或增殖的TIL細胞群體,包括(但不限於)如本文中所論述之主體TIL及經擴增之TIL(「REP TIL」)以及「reREP TIL」)。reREP TIL可包括例如第二擴增TIL或第二額外擴增TIL(諸如圖8之步驟D中所描述的TIL,包括稱為reREP TIL之TIL)。

【0477】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標記物)或功能性(根據其浸潤腫瘤及實現治療之能力)定義。TIL通常可藉由表現以下生物標記物中之一或多者分類:CD4、CD8、TCR αβ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。另外及替代地,TIL可藉由其重新引入患者中後浸潤實體腫瘤之能力來進行功能性定義。TIL可進一步藉由效力表徵 - 例如若例如干擾素(IFN)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL,則TIL可視為強效的。若例如

干擾素(IFN γ)釋放大於約50 pg/mL、大於約100 pg/mL、大於約150 pg/mL或大於約200 pg/mL、大於約300 pg/mL、大於約400 pg/mL、大於約500 pg/mL、大於約600 pg/mL、大於約700 pg/mL、大於約800 pg/mL、大於約900 pg/mL、大於約1000 pg/mL，則TIL可視為強效的。

【0478】術語「去氧核糖核苷酸」涵蓋天然的及合成的、未經修飾的及經修飾的去氧核糖核苷酸。修飾包括改變糖部分、鹼基部分及/或寡核苷酸中之去氧核糖核苷酸之間的連接。

【0479】術語「RNA」定義包含至少一個核糖核苷酸殘基的分子。「核糖核苷酸」定義在b-D-呋喃核糖部分之2'位置具有羥基的核苷酸。術語RNA包括雙股RNA、單股RNA、經分離之RNA(諸如經部分純化之RNA、基本上純RNA、合成RNA、以重組方式產生之RNA)以及藉由一或多個核苷酸之添加、缺失、取代及/或改變而不同於天然存在之RNA的經改變之RNA。本文中所描述之RNA分子中之核苷酸亦可包含非標準核苷酸，諸如非天然存在之核苷酸或化學合成之核苷酸或去氧核苷酸。此等經改變之RNA可稱為類似物或天然存在之RNA的類似物。

【0480】術語「醫藥學上可接受之載劑」或「醫藥學上可接受之賦形劑」意欲包括任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲劑及吸收延遲劑，以及惰性成分。此類醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑用於活性醫藥成分之用途為此項技術中所熟

知的。除非任何習知醫藥學上可接受之載劑或醫藥學上可接受之賦形劑與活性醫藥成分不相容，否則涵蓋其在本發明之治療性組合物中之使用。諸如其他藥物之另外活性醫藥成分亦可併入所描述之組合物及方法中。

【0481】術語「約」或「大約」意指在值之統計學上有意義的範圍內。此範圍可在既定值或範圍之一數量級內，較佳地50%內，更佳地20%內，再更佳地10%內，且甚至更佳地5%內。由術語「約」或「大約」涵蓋之允許差異取決於研究下之特定系統，且可由所屬領域中具有通常知識者容易地理解。此外，如本文所用，術語「約」及「大約」意指尺寸、大小、調配物、參數、形狀及其他數量(quantity)及特徵並不精確且不需要精確，而是可以視需要為近似值及/或較大或較小的，反映出公差、轉換因子、四捨五入、量測誤差等，以及熟習此項技術者已知的其他因素。一般而言，無論是否如此明確說明，尺寸、大小、調配物、參數、形狀或其他數量或特徵皆為「約」或「大約」的。應注意，大小、形狀及尺寸非常不同之實施例可採用所描述之佈置。

【0482】當以原始及修改形式用於所附申請專利範圍中時，過渡術語「包含(comprising)」、「基本上由...組成(consisting essentially of)」及「由...組成(consisting of)」相對於哪些未敍述之另外的請求項要素或步驟(若存在)被排除在申請專利範圍之範疇之外來定義請求項範疇。術語「包含」意欲為包含性的或開放性的，且不排除

任何另外的、未敍述之要素、方法、步驟或材料。術語「由...組成」不包含除申請專利範圍中指定之要素、步驟或材料以外的任何要素、步驟或材料，且在後一情況中排除與指定材料一般相關之雜質。術語「基本上由...組成」將請求項之範疇限於所指定要素、步驟或材料及實質上不影響所主張發明之基礎及新穎特徵的要素、步驟或材料。在替代實施例中，本文所描述之體現本發明之所有組合物、方法及套組可由任何過渡術語「包含」、「基本上由...組成」及「由...組成」更具體地定義。

【0483】術語「抗體(antibody)」及其複數形式「抗體(antibodies)」係指完整的免疫球蛋白及任何抗原結合片段(「抗原結合部分」)或其單鏈。「抗體」亦係指包括藉由二硫鍵連接之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈之醣蛋白，或其抗原結合部分。各重鏈包括重鏈可變區(在本文中縮寫為V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包括三個域(CH1、CH2及CH3)。各輕鏈包括輕鏈可變區(在本文中縮寫為V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包括一個域C_L。抗體之V_H及V_L區可進一步細分成高變區，其稱為互補決定區(CDR)或高變區(HVR)，且其可穿插有保守性更高之區域，稱為構架區(FR)。各V_H及V_L由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與一或多個抗原決定基相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，該等組織

或因子包含免疫系統之多種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(Clq)。

【0484】術語「抗原」係指誘導免疫反應之物質。在一些實施例中，若藉由主要組織相容複合物(MHC)分子呈現，則抗原為能夠由抗體或TCR結合之分子。如本文所用，術語「抗原」亦涵蓋T細胞抗原決定基。抗原另外能夠被免疫系統識別。在一些實施例中，抗原能夠誘導引起B淋巴球及/或T淋巴球之活化的體液免疫反應或細胞免疫反應。在一些情況下，此可能需要抗原含有或連接至Th細胞抗原決定基。抗原亦可具有一或多個抗原決定基(例如B抗原決定基及T抗原決定基)。在一些實施例中，抗原較佳將通常以高特異性及選擇性方式與其對應抗體或TCR反應，且不與可由其他抗原誘導之多種其他抗體或TCR反應。

【0485】術語「單株抗體」、「mAb」、「單株抗體組合物」或其複數形式係指單一分子組合物的抗體分子之製劑。單株抗體組合物顯示針對特定抗原決定基之單一結合特異性及親和力。對某些受體具有特異性之單株抗體可使用以下技術中之知識及技術製得：向測試個體注射適合抗原，且接著分離表現具有所需序列或功能特徵之抗體的融合瘤。編碼單株抗體之DNA易於使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及定序。融合瘤細胞充當此類DNA之較佳來源。在分離後，可將DNA置放於表現載體

中，接著轉染至原本不產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組宿主細胞中達成單株抗體之合成。抗體之重組產生將在下文更詳細地描述。

【0486】如本文所用，術語抗體(或簡言之，「抗體部分」或「片段」)之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」係指保留特異性結合於抗原之能力的抗體之一或多個片段。已證實抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。涵蓋在術語抗體之「抗原結合部分」內的結合片段的實例包括(i)Fab片段，由V_L、V_H、C_L及CH1域組成的單價片段；(ii)F(ab')2片段，一種二價片段，其包含鉸鏈區處藉由二硫橋鍵連接的兩個Fab片段；(iii)由V_H及CH1域組成的Fd片段；(iv)由抗體之單一臂之V_L及V_H域組成的Fv片段；(v)域抗體(dAb)片段(Ward等人，《自然(*Nature*)》,**1989**, *341*, 544-546),其可由一個V_H或一個V_L域組成；及(vi)經分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域(V_L及V_H)係由獨立基因編碼，但其可使用重組方法藉由合成連接子接合，該合成連接子使得能夠將該兩個域製造成其中V_L與V_H區配對以形成單價分子之單一蛋白鏈(稱為單鏈Fv(scFv))；參見例如Bird等人，《科學(*Science*)》**1988**, *242*, 423-426；及Huston等人，《美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)》**1988**, *85*, 5879-5883)。此類scFv抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」或「抗原結合片段」內。此等抗體片段係使用熟

習此項技術者已知之習知技術獲得，且以與完整抗體相同之方式針對效用來篩選片段。在一些實施例中，scFv蛋白域包含V_H部分及V_L部分。scFv分子在V_L域係scFv分子之N端部分之情況下表示為V_L-L-V_H，或在V_H域係scFv分子之N端部分之情況下表示為V_H-L-V_L.用於製備scFv分子及設計適合之肽連接子之方法描述於美國專利案第4,704,692號；美國專利案第4,946,778號；R. Raag及M. Whitlow，「單鏈Fv(Single Chain Fvs.)」《美國實驗生物學學會聯合會(FASEB)》，第9卷:73-80 (1995)；及R. E. Bird及B. W. Walker，「單鏈抗體可變區(Single Chain Antibody Variable Regions)」，《生物技術趨勢(TIBTECH)》，第9卷: 132-137 (1991)中，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

【0487】如本文中所使用，術語「人類抗體」意欲包括滿足以下條件之抗體：具有其中構架區及CDR區皆衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列。本發明之人類抗體可包括不由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如，藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入之突變)。如本文中所使用，術語「人類抗體」不意欲包括其中衍生自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上之抗體。

【0488】術語「人類單株抗體」係指具有可變區之呈

現單一結合特異性之抗體，該等可變區中之構架及CDR區皆衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列。在一些實施例中，人類單株抗體係由融合瘤產生，該融合瘤包括與永生化細胞融合的自轉基因非人類動物(例如，轉基因小鼠)獲得之B細胞，其具有包含人類重鏈轉基因及輕鏈轉基因之基因體。

【0489】如本文中所使用，術語「重組人類抗體」包括藉由重組手段製備、表現、產生或分離之所有人類抗體，諸如(a)自對於人類免疫球蛋白基因而言為轉基因或轉染色體之動物(諸如小鼠)或由其製備之融合瘤(在下文進一步描述)分離的抗體；(b)自經轉型以表現人類抗體之宿主細胞，例如自轉染瘤分離的抗體；(c)自重組、組合人類抗體庫分離的抗體；及(d)藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列之任何其他手段製備、表現、產生或分離的抗體。此類重組人類抗體具有其中構架區及CDR區衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，此類重組人類抗體可經歷活體外突變誘發(或當使用人類Ig序列之轉基因動物時，活體內體細胞突變誘發)，且因此重組抗體之V_H及V_L區之胺基酸序列為雖然衍生自人類生殖系V_H及V_L序列且與其相關，但在活體內可能並非天然存在於人類抗體生殖系譜系內之序列。

【0490】如本文所用，「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類別(例如IgM或IgG1)。

【0491】片語「識別抗原之抗體」及「對抗原具有特異性之抗體」在本文中可與術語「與抗原特異性結合之抗體」互換使用。

【0492】術語「人類抗體衍生物」係指人類抗體之任何經修飾之形式，包括抗體與另一活性醫藥成分或抗體之結合物。術語「結合物」、「抗體-藥物結合物」、「ADC」或「免疫結合物」係指與另一治療部分結合之抗體或其片段，該治療部分可使用此項技術中可用之方法與本文中所描述之抗體結合。

【0493】術語「人類化抗體(humanized antibody/humanized antibodies)」及「人類化」意指其中衍生自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上的抗體。可在人類構架序列中進行其他構架區修飾。非人類(例如鼠類)抗體之人類化形式為含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體係人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體的高變區之殘基由來自具有所需特異性、親和力及能力之諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)的15個高變區之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基由相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未在受體抗體或供體抗體中發現之殘基。進行此等修飾以進一步優化抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含實質上全部至少一個且通常兩個可變域，其中全部或實質上全部高變環對應於非人類

免疫球蛋白之高變環且全部或實質上全部FR區為人類免疫球蛋白序列之FR區。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常，人類免疫球蛋白之恆定區的至少一部分。關於其他細節，參見Jones等人，《自然》**1986,** *321*, 522-525；Riechmann等人，《自然》**1988,** *332*, 323-329；及Presta, 《結構生物學新見(*Curr. Op. Struct. Biol.*)》**1992,** *2*, 593-596。本文中所描述之抗體亦可經修飾以使用已知提供效應功能及/或FcR結合之改良(例如降低)之任何Fc變異體。Fc變異體可包括例如以下所揭示之胺基酸取代中之任一者：國際專利申請公開案第WO 1988/07089 A1號、第WO 1996/14339 A1、第WO 1998/05787 A1、第WO 1998/23289 A1、第WO 1999/51642 A1、第WO 99/58572 A1、第WO 2000/09560 A2、第WO 2000/32767 A1、第WO 2000/42072 A2、第WO 2002/44215 A2、第WO 2002/060919 A2、第WO 2003/074569 A2、第WO 2004/016750 A2、第WO 2004/029207 A2、第WO 2004/035752 A2、第WO 2004/063351 A2、第WO 2004/074455 A2、第WO 2004/099249 A2、第WO 2005/040217 A2、第WO 2005/070963 A1、第WO 2005/077981 A2、第WO 2005/092925 A2、第WO 2005/123780 A2、第WO 2006/019447 A1、第WO 2006/047350 A2及第WO 2006/085967 A2；及美國專利案第5,648,260號；第5,739,277號；第5,834,250號；第5,869,046號；第6,096,871號；第6,121,022號；第6,194,551號；第6,242,195號；第6,277,375號；第

6,528,624 號 ； 第 6,538,124 號 ； 第 6,737,056 號 ； 第 6,821,505號 ； 第6,998,253號 ； 及第7,083,784號 ； 其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0494】術語「嵌合抗體」意指其中可變區序列衍生自一個物種且恆定區序列衍生自另一物種之抗體，諸如其中可變區序列衍生自小鼠抗體且恆定區序列衍生自人類抗體之抗體。

【0495】「雙功能抗體」為具有兩個抗原結合位點之小型抗體片段。片段包含重鏈可變域(V_H)，其連接至相同多肽鏈(V_H-V_L或V_L-V_H)中之輕鏈可變域(V_L)。藉由使用過短以使得同一鏈上之兩個域之間不能配對的連接子，迫使域與另一條鏈之互補域配對，且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體更詳細地描述於例如歐洲專利案第EP 404,097號，國際專利公開案第WO 93/11161號；及Bolliger等人，《美國國家科學院院刊》 **1993,** *90*, 6444-6448中。

【0496】術語「醣基化」係指抗體之經修飾之衍生物。去醣基化抗體未發生醣基化。醣基化可經改變以例如提高抗體對抗原之親和力。此類碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個醣基化位點來實現。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，其引起消除一或多個可變區構架醣基化位點，藉此消除該位點處之醣基化。去醣基化可增加抗體對抗原之親和力，如美國專利案第5,714,350號及第6,350,861號中所描述。或者或另外，可產生醣基化類型改變之抗體，諸如岩藻糖基殘基量降低之

低岩藻醣基化抗體或等分GlcNac結構增加之抗體。已證明此類經改變之醣基化模式會提高抗體之能力。此類碳水化合物修飾可藉由例如在具有改變之醣基化機制之宿主細胞中表現抗體來實現。醣基化機制改變之細胞已在此項技術中描述且可用作表現本發明之重組抗體以產生醣基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，細胞株Ms704、Ms705及Ms709不具有岩藻糖基轉移酶基因、FUT8(α(1,6)岩藻糖基轉移酶)，使得表現於Ms704、Ms705及Ms709細胞株中之抗體在其碳水化合物上不具有岩藻糖。Ms704、Ms705及Ms709 FUT8-/-細胞株係藉由使用兩種置換載體進行之所靶向之CHO/DG44細胞中之FUT8基因的斷裂而形成(參見美國專利公開案第2004/0110704號或Yamane-Ohnuki等人，《生物技術與生物工程(*Biotechnol. Bioeng.*)》，**2004,** *87*, 614-622)。作為另一實例，歐洲專利案第EP 1,176,195號描述一種具有功能性破壞之FUT8基因之細胞株，該基因編碼岩藻糖基轉移酶，使得此類細胞株中表現之抗體藉由減少或消除α1,6鍵相關酶而呈現低岩藻醣基化，且亦描述如下細胞株：具有用於將岩藻糖添加至結合於抗體之Fc區之N-乙醯基葡糖胺的低酶活性或不具有酶活性，例如大鼠骨髓瘤細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)。國際專利公開案WO 03/035835描述變異型CHO細胞株，即Lec 13細胞，其具有降低的將岩藻糖連接至Asn(297)連接之碳水化合物之能力，亦引起表現於該宿主細胞中之抗體之低岩藻醣基化(亦參見Shields等人，《生物化學雜誌(*J. Biol. Chem.*)》

2002, *277*, 26733-26740。國際專利公開案WO 99/54342描述經工程改造以表現醣蛋白修飾型醣基轉移酶(例如，β(1,4)-N-乙醯基葡糖胺轉移酶III(GnTIII))之細胞株，使得表現於經工程改造之細胞株中之抗體呈現增加之二分GlcNac結構，從而提高抗體之ADCC活性(亦參見Umana等人，《自然·生物技術(*Nat. Biotech.*)》**1999,** *17*, 176-180)。或者，可使用岩藻糖苷酶使抗體之岩藻糖殘基裂解。例如，岩藻糖苷酶α-L-岩藻糖苷酶自抗體移除岩藻糖基殘基，如Tarentino等人，《生物化學(*Biochem.*)》**1975,** *14*, 5516-5523中所描述。

【0497】「聚乙二醇化」係指經修飾之抗體或其片段，其通常與聚乙二醇(PEG)，諸如PEG的反應性酯或醛衍生物在使一或多個PEG基團變得連接至抗體或抗體片段之條件下反應。例如，聚乙二醇化可增加抗體之生物學(例如血清)半衰期。較佳地，聚乙二醇化係經由與反應性PEG分子(或類似的反應性水溶聚合物)之醯化反應或烷基化反應來進行。如本文所用，術語「聚乙二醇」意欲涵蓋已用於衍生其他蛋白質之PEG之任何形式，諸如單(C_1-C_{10})烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。待聚乙二醇化之抗體為去醣基化抗體。聚乙二醇化方法係此項技術中已知的且可應用於本發明之抗體，如例如歐洲專利案第EP 0154316號及歐洲專利案第EP 0401384號及美國專利案第5,824,778號中所描述，其揭示內容各自以引用的方式併入本文中。

【0498】術語「生物類似物」意謂滿足以下條件之生物產品(包括單株抗體或蛋白質):儘管存在臨床非活性組分之少量差異,但其與美國核準之參考生物產品極類似,且生物產品與參考產品之間在產品之安全性、純度及效能方面不存在臨床上有意義的差異。此外,類似生物或「生物類似物」藥物為與已被歐洲藥物管理局(European Medicines Agency)授權使用之另一種生物藥物類似之生物藥物。術語「生物類似物」亦由其他國家及地區監管機構同義地使用。生物產品或生物藥物係由生物來源(諸如細菌或酵母)製得或衍生的藥物。其可由相對較小分子(諸如人類胰島素或紅血球生成素)或複雜分子(諸如單株抗體)組成。舉例而言,若參考IL-2蛋白為阿地介白素(PROLEUKIN),則由藥物監管機構批准之參考阿地介白素的蛋白質係「與阿地介白素生物類似」或為「阿地介白素之生物類似物」。在歐洲,類似生物或「生物類似物」藥物為與已由歐洲藥物管理局(EMA)授權使用之另一種生物藥物類似之生物藥物。歐洲類似生物應用之相關法律依據係法規(EC)第726/2004號之第6條及指令2001/83/EC之第10(4)條,經修訂且因此在歐洲,生物類似物可根據法規(EC)第726/2004號之第6條及指令2001/83/EC之第10(4)條而授權、批准授權或作為授權申請的對象。經授權之原始生物藥物產品在歐洲可被稱為」參考藥品」。CHMP關於類似生物藥物產品之指南中概述了產品被視為生物類似物的一些要求。此外,產品特定指南,包括與單株抗體生物類似

物相關的指南，由EMA以逐項產品之方式提供且發佈在其網站上。如本文中所描述之生物類似物可在品質特徵、生物活性、作用機制、安全性概況及/或功效方面與參考藥品類似。另外，生物類似物可用於或意欲用於治療與參考藥品相同之病狀。因此，可認為如本文中所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或極類似之品質特徵。或者或另外，可認為如本文中所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或極類似之生物活性。或者或另外，可認為如本文中所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或極類似之安全性概況。或者或另外，可認為如本文中所描述之生物類似物具有與參考藥品類似或極類似之功效。如本文中所描述，在歐洲，已將生物類似物與由EMA授權之參考藥品相比較。然而，在一些情況下，在某些研究中，可將生物類似物與在歐洲經濟區(European Economic Area)以外獲得授權之生物藥品(非EEA授權之「比較物」)相比較。此類研究包括例如某些臨床及活體內非臨床研究。如本文所用，術語「生物類似物」亦係關於已與或可與非EEA授權之比較物相比較之生物藥品。某些生物類似物係蛋白質，諸如抗體、抗體片段(例如，抗原結合部分)及融合蛋白質。蛋白質生物類似物可具有胺基酸序列，其在胺基酸結構中具有不顯著影響多肽之功能之少量修飾(包括例如胺基酸之缺失、添加及/或取代)。生物類似物可包含與其參考藥品之胺基酸序列具有97%或更高，例如97%、98%、99%或100%序列一致性之胺基酸序列。生物類似物可包含與參

考藥品之轉譯後修飾不同的一或多個轉譯後修飾，例如(但不限於)醣基化、氧化、去醯胺及/或截短，其限制條件為該等差異不會引起藥品之安全性及/或功效之變化。生物類似物可具有與參考藥品相同或不同的醣基化模式。特定言之，但非排他性地，若該等差異解決或意欲解決與參考藥品相關之安全性問題，則生物類似物可具有不同醣基化模式。另外，生物類似物可在例如其強度、醫藥形式、調配物、賦形劑及/或呈現方式方面與參考藥品不同，限制條件為不損害藥品之安全性及功效。與參考藥品相比，生物類似物可包含例如藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)概況之差異，但仍視為與參考藥品充分類似，從而可被授權或視為適於授權。在某些情況下，生物類似物呈現與參考藥品相比不同之結合特徵，其中監管機構(諸如EMA)未將該等不同結合特徵視為類似生物產品獲得授權的障礙。術語「生物類似物」亦由其他國家及地區監管機構同義地使用。

III. 免疫調節劑相關之腫瘤浸潤性淋巴球

【0499】本文中提供經修飾之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其包括與TIL細胞表面結合之一或多種免疫調節劑。在一些實施例中，本發明之經修飾之TIL在患者受體中呈現增強之活體內存活、增殖及/或抗腫瘤作用。

【0500】可使用任何適合的方法將免疫調節劑連接至本文中所揭示之TIL(例如，本文中所提供之治療性TIL)。

在一些實施例中，該一或多種免疫調節劑為連接至TIL細胞表面之免疫調節融合蛋白質之一部分。在一些實施例中，包括該一或多種免疫調節劑作為與TIL細胞表面結合之奈米粒子之一部分。免疫調節劑可為任何促進患者受體中之TIL存活、增殖及/或抗腫瘤作用之免疫調節劑。在一些實施例中，免疫調節劑為細胞介素(例如，介白素)。在例示性實施例中，TIL包括IL-12、IL-15及/或IL-21。

【0501】任何適合的TIL群體可經修飾以產生本發明之組合物，包括使用本文中所描述之製造方法製備之TIL。在一些實施例中，經修飾之TIL係衍生自在本文中所揭示之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)之任何步驟期間產生之TIL。在例示性實施例中，經修飾之TIL係衍生自在本文中所揭示之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之TIL。在一些實施例中，TIL為衍生自本文中所揭示之方法之PD-1陽性TIL。

【0502】在一些實施例中，TIL藉由如本文中所揭示之基因編輯過程進一步修飾，例如CRISPR方法、TALE方法、ZFN方法、tCas-CLOVER方法、shRNA方法或其組合，以改變TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現。可藉由本發明之基因編輯方法緘默或抑制之免疫檢查點基因的非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、BAFF(BR3)、CD96、CRTAM、

LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【0503】本文中進一步詳細描述本發明之經修飾之TIL之態樣。

A. 免疫調節融合蛋白質

【0504】在一些實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括免疫調節融合蛋白質，其包括免疫調節劑(例如，細胞介素)，該免疫調節劑連接至促進免疫調節劑栓繫至TIL之表面之部分。在一些實施例中，融合蛋白質包括細胞膜錨部分(跨膜域)。在某些實施例中，融合蛋白質包括結合於TIL表面抗原之TIL表面抗原結合部分。此等融合蛋白質之態樣進一步詳細論述於下文中。

【0505】可使用任何合適的基因修飾方法來基因修飾標的TIL以包括此類免疫調節融合蛋白質，包括例如本文中所描述之任何基因編輯方法。在一些實施例中，基因修飾方法為本文中所描述之CRISPR、TALE、鋅指或Cas-CLOVER方法。在一些實施例中，此類經修飾之TIL係使

用本文中提供之任一種反轉錄病毒方法(例如，慢病毒方法)產生。在一些實施例中，此類經修飾之TIL係使用本文中所描述之任何轉位子/轉位酶系統產生，例如piggyBac方法(例如piggyBac轉位子及轉位酶或piggyBac樣轉位子及轉位酶)、睡美人方法(例如睡美人或睡美人樣轉位子及轉位酶)、Helraiser方法(例如Helraiser及Helraiser樣轉位子及轉位酶)及Tol2方法(例如Tol2及Tol2樣轉位子及轉位酶)。

1. 膜錨定之免疫調節融合蛋白質

【0506】在一些實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括膜錨定之免疫調節融合蛋白質。膜錨定之免疫調節融合蛋白質包括連接至細胞膜錨部分之免疫調節劑(例如，細胞介素)中之一或多者。在此類實施例中，膜錨定之免疫調節劑經由細胞膜錨部分栓繫至TIL表面膜，由此允許免疫調節劑以靶向方式發揮其作用。

【0507】免疫調節劑可任何適合的免疫調節劑，包括例如本文中所提供之任何免疫調節劑。在一些實施例中，免疫調節劑為促進抗腫瘤反應之介白素。在一些實施例中，免疫調節劑為細胞介素。在特定實施例中，免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。在某些實施例中，兩種或更多種不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質表現於TIL表面上。在例示性實施例中，TIL包括2、3、4、5、6、7、8、9或10

種不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【0508】免疫調節劑連接至實現將免疫調節劑栓繫至TIL細胞表面之細胞膜錨部分。適合的細胞膜錨部分包括例如內源性TIL細胞表面蛋白質之跨膜域及其片段。可用於本發明之融合蛋白質中之例示性跨膜域包括例如B7-1、B7-2及CD8a跨膜域及其片段。在一些實施例中，細胞膜錨部分進一步包括內源性TIL細胞表面蛋白質之跨膜及細胞內域或其片段。在一些實施例中，細胞膜錨部分為B7-1、B7-2或CD8a跨膜-細胞內域或其片段。在某些實施例中，細胞膜錨部分為具有IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO: 238)之胺基酸序列之CD8a跨膜域。在某些實施例中，細胞膜錨部分為具有LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO: 239)之胺基酸序列之B7-1跨膜-細胞內域。在某些實施例中，細胞膜錨部分為非肽細胞膜錨部分。在例示性實施例中，非肽細胞膜錨部分為糖磷脂醯肌醇(GPI)錨。GPI錨具有包括磷酸乙醇胺連接子、聚糖核心及磷脂尾區之結構。在一些實施例中，聚糖核心經一或多個側鏈修飾。在一些實施例中，聚糖核心經以下側鏈中之一或多者修飾：磷酸乙醇胺基團、甘露糖、半乳糖、唾液酸或其他糖。

【0509】膜錨定之免疫調節融合蛋白質包括實現膜錨定之免疫調節融合蛋白質之組分(例如，免疫調節劑與細胞膜錨部分)之連接之連接子。適合的連接子包括長度為

至少約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸殘基之連接子。在一些實施例中，連接子之長度為5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、45-50、50-60個胺基酸。適合的連接子包括(但不限於)：可裂解連接子、不可裂解連接子、肽連接子、可撓性連接子、剛性連接子、螺旋連接子或非螺旋連接子。在一些實施例中，連接子為肽連接子，其視情況包含Gly及Ser。在某些實施例中，肽連接子利用甘胺酸-絲胺酸聚合物，包括例如(GS)n(SEQ ID NO:240)、(GSGGS)n(SEQ ID NO: 241)、(GGGS)n(SEQ ID NO: 242)、(GGGGS)n(SEQ ID NO: 243)、(GGGGGS)n(SEQ ID NO: 244)及(GGGGGGS)n(SEQ ID NO: 245)，其中n為至少一之整數(且通常為3至10)。可與本發明之組合物及方法一起使用之其他連接子描述於美國專利公開案第US 2006/0074008號、第US 20050238649號及第US 2006/0024317號中，其各自以全文引用之方式併入本文中，尤其與連接子有關之相關部分。在一些實施例中，肽連接子為SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ(SEQ ID NO: 246)。

【0510】在一些實施例中，連接子為可裂解連接子。在例示性實施例中，可裂解連接子實現將免疫調節劑釋放至腫瘤微環境中。可裂解連接子亦適用於其中兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質在相同TIL中共表現之實施例(參見例如圖36以及表58及表59)。在例示性實施例中，連接子

為自裂解2A肽。參見例如Liu等人，《科學報導(Sci. Rep.)》 7(1):2193 (2017)，其與2A肽有關之相關部分以引用之方式本文中。2A肽病毒性寡肽，其介導真核細胞轉譯期間之多肽之裂解。在一些實施例中，2A肽包括具有胺基酸序列GDVEXiNPGP(SEQ ID NO:247)之C端，其中Xi為任何天然存在之胺基酸殘基。在某些實施例中，2A肽為豬捷申病毒-1 2A肽(GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP，SEQ ID NO:248)。在一些實施例中，2A肽為馬鼻炎A病毒2A肽(GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP，SEQ ID NO:249)。在某些實施例中，2A肽為口蹄疫病毒2A肽：(GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP，SEQ ID NO:250)。在一些實施例中，可裂解連接子包括弗林蛋白酶可裂解序列。例示性弗林蛋白酶可裂解序列描述於例如Duckert等人，《蛋白質工程改造、設計及選擇(Protein Engineering, Design & Selection)》 17(1):107-112 (2004)及美國專利案第8,871,906號中，其各自以引用之方式併入本文中，尤其與弗林蛋白酶可裂解序列有關之相關部分。在一些實施例中，連接子包括2A肽及弗林蛋白酶可裂解序列。在例示性實施例中，弗林蛋白酶可裂解2A肽包括胺基酸序列RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:251)。

【0511】在一些實施例中，免疫調節劑藉由可降解連接子(例如，二硫鍵連接子)連接在膜錨定之免疫調節融合蛋白質中，使得連接子在生理條件下降解，藉此釋放免疫調節劑。在一些實施例中，免疫調節劑經由可降解連接子

可逆地連接至官能基，使得連接子在生理條件下降解且釋放免疫調節劑。適合的可降解連接子包括(但不限於)：對生物培養基中存在之一或多種酶敏感之蛋白酶敏感性連接子，該一或多種酶諸如腫瘤微環境中之蛋白酶，諸如腫瘤微環境或發炎組織中存在之基質金屬蛋白酶(例如，基質金屬蛋白酶2(MMP2)或基質金屬蛋白酶9(MMP9))。

【0512】在其他實施例中，膜錨定之免疫調節融合蛋白質之組分由酶敏感性連接子連接。例示性可裂解連接子包括由一種以下酶識別之可裂解連接子：金屬蛋白酶MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、纖維蛋白溶酶、PSA、PSMA、組織蛋白酶D、組織蛋白酶K、組織蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、凋亡蛋白酶-1、凋亡蛋白酶-2、凋亡蛋白酶-3、凋亡蛋白酶-4、凋亡蛋白酶-5、凋亡蛋白酶-6、凋亡蛋白酶-7、凋亡蛋白酶-8、凋亡蛋白酶-9、凋亡蛋白酶-10、凋亡蛋白酶-11、凋亡蛋白酶-12、凋亡蛋白酶-13、凋亡蛋白酶-14及TACE。參見例如美國專利案第8,541,203號及第8,580,244號，其全部內容及與可裂解連接子有關之相關部分各自以引用之方式併入本文中。

【0513】在某些實施例中，膜錨定之免疫調節融合蛋白質包括信號肽，其促進融合蛋白質易位至TIL細胞膜。可使用任何適合的促進融合蛋白質定位至TIL細胞膜之信號肽。在一些實施例中，信號肽不干擾免疫調節劑之生物活性。例示性信號肽序列包括(但不限於)：人類粒細胞-巨

噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、受體信號序列、人類泌乳素信號序列及人類IgE信號序列。在某些實施例中，融合蛋白質包括人類IgE信號序列。在例示性實施例中，人類IgE信號序列具有胺基酸序列MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO: 252)。在一些實施例中，人類IgE信號序列包括胺基酸序列NIKGSPWKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP (SEQ ID NO: 253)。在一些實施例中，信號肽序列為具有胺基酸序列MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 254)之IL-2信號序列。

【0514】在一些實施例中，自N端至C端，膜錨定之免疫調節融合蛋白質係根據下式：

S-IA-L-C，

其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。

【0515】在一些實施例中，信號肽S為SEQ ID NO:252-254中之任一者。在一些實施例中，細胞膜錨部分為SEQ ID NO:277。在例示性實施例中，免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21或CD40促效劑(例如，本文中所描述之CD40L或抗CD40 scFv)。在一些實施例中，C為B7-1跨膜-細胞內域(例如，SEQ ID NO:239)。根據上式之例示性膜錨定之免疫調節融合蛋白質描繪於圖36及圖37中。

【0516】在一些實施例中，TIL包括兩種或更多種不同的自N端至C端根據下式之膜錨定之免疫調節融合蛋白質：S-IA-L-C，其中不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質

中之每一者包括不同的免疫調節劑。在一些實施例中，兩種或更多種不同的免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12及IL-15、IL-15及IL-18、CD40L及IL-15、IL-15及IL-21以及IL-2及IL-12。

【0517】在包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質之一些實施例中，自N端至C端，膜錨定之免疫調節融合蛋白質係根據下式排列：

S1-IA1-L1-C1-L2-S2-IA2-L3-C2，

其中S1及S2各自為信號肽，IA1及IA2各自為免疫調節劑，L1-L3各自為連接子，且C1及C2各自為細胞膜錨部分。在一些實施例中，IA1及IA2為相同的免疫調節劑。在某些實施例中，IA1及IA2為不同的免疫調節劑。適合的免疫調節劑包括本文中所描述之任何免疫調節劑。在一些實施例中，IA1及IA2係獨立地選自IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。在一些實施例中，IA1及IA2係選自由以下組成之群：IL-12及IL-15、IL-15及IL-18、CD40L及IL-15、IL-15及IL-21以及IL-2及IL-12。在一些實施例中，L1-L3中之一或多者為可裂解連接子。在一些實施例中，L1-L3中之兩者或更多者為不同連接子。在例示性實施例中，L2為可裂解連接子。在一些實施例中，L2為弗林蛋白酶可裂解P2A連接子(例如，SEQ ID NO:251)。在一些實施例中，C1及C2獨立地為跨膜域及/或跨膜-細胞內域。在某些實施例中，C1與C2係相同

的。在例示性實施例中，C1及C2各自為B7-1跨膜-細胞內域(例如，SEQ ID NO:239)。在例示性實施例中，C1及C2係不同的。包括兩個根據上式之膜錨定之免疫調節融合蛋白質之例示性構築體描繪於圖36以及表58及表59中。

【0518】可藉由基因修飾TIL群體以包括編碼融合蛋白質之核酸來製備包括與表面結合之細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質之經修飾之TIL。可使用任何適合的基因修飾方法以產生此類經修飾之TIL，包括例如本文中所描述之CRISPR、TALE、鋅指及Cas-CLOVER方法。

【0519】任何適合的TIL群體可經基因修飾以產生本發明之經修飾之TIL組合物。在一些實施例中，在本發明之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)之任何步驟期間產生之TIL群體經基因修飾以產生本發明之經修飾之TIL。在例示性實施例中，在本發明之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之TIL群體經基因修飾以產生本發明之經修飾之TIL。在例示性實施例中，由本文中所提供之過程2A方法中之第二步驟及/或GEN 3方法中之快速擴增步驟產生之TIL經基因修飾以產生本發明之經修飾之TIL。在一些實施例中，已使用本文中所描述之方法預先選擇之PD-1陽性TIL經基因修飾以產生本發明之經修飾之TIL。

【0520】任何適合的TIL群體可經暫時修飾以產生本發明之經暫時修飾之TIL組合物。在一些實施例中，在本發明之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)之任何步驟期間產生之TIL群體經編碼細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質之

核酸轉染，以在本發明之經暫時修飾之TIL中暫時表現細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在例示性實施例中，在本發明之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之TIL群體經編碼細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸轉染，以在本發明之經暫時修飾之TIL中暫時表現細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在例示性實施例中，由本文中所提供之過程2A方法中之第一擴增步驟及/或GEN 3方法中之啟始擴增步驟產生之TIL經編碼細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸轉染，以在本發明之經暫時修飾之TIL中暫時表現細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在例示性實施例中，由本文中所提供之過程2A方法中之第二擴增步驟及/或GEN 3方法中之快速擴增步驟產生之TIL經編碼細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸轉染，以在本發明之經暫時修飾之TIL中暫時表現細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，已使用本文中所描述之方法預先選擇之PD-1陽性TIL經編碼細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸轉染，以在本發明之經暫時修飾之TIL中暫時表現細胞膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【0521】本文中亦提供編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸、包括此類核酸之表現載體及包括核酸或表現載體之宿主細胞。任何適合的啟動子皆可用於膜錨定之免疫調節融合蛋白質之表現。在例示性實施例中，啟動子為誘導性啟動子。用於表現標的膜錨定之免疫調節融合蛋白質之載體包括但不限於腺病毒載體、反轉錄病毒載體、慢

病毒載體及腺相關載體(AAV)。在一些實施例中，piggyBac轉位子用於表現標的膜錨定之免疫調節融合蛋白質。編碼例示性膜錨定之免疫調節融合蛋白質及此類融合蛋白質之組分之例示性核酸描繪於圖36及圖37以及表58及表59中。

【0522】在一些實施例中，編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸為mRNA。在例示性實施例中，mRNA包括一或多種改良mRNA之細胞內穩定性及/或轉譯效率之修飾。在一些實施例中，mRNA包括改良mRNA半衰期之5'帽或帽類似物。例示性帽結構包括(但不限於)ARCA、mCAP、m^7GpppN (帽0)、$m^7GpppNm$ (帽1)及$m^7GpppNmpNm$ (帽2)帽。在一些實施例中，5'帽係根據下式：$^{m7}Gppp[N_{2'ome}]_n[N]_m$，其中$^{m7}G$為N7-甲基化鳥苷或任何鳥苷類似物，N為任何天然、經修飾或非天然核苷，「n」可為0至4之任何整數且「m」可為1至9之整數。例示性5'帽揭示於美國專利案第10,703,789號及WO2017053297中，其以全文引用之方式併入本文中且尤其與5'帽及帽類似物相關之揭示內容。

【0523】在一些實施例中，編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸為mRNA，其進一步包括3'非轉譯區(UTR)或經修飾之UTR。已知3' UTR具有腺苷及尿苷之延伸部分。此等富含AU之標記在具有高轉化率之基因中尤其普遍。基於其序列特徵及功能特性，富含AU之元件(ARE)可分成三類(Chen等人，1995)：I類ARE在富含U之區域內含

有若干個分散的AUUUA模體之複本。C-Myc及MyoD含有I類ARE。II類ARE具有兩個或更多個重疊UUAUUUA(U/A)(U/A)九聚體。含有此類型之ARE之分子包括GM-CSF及TNF-a。III類ARE之定義不太明確。此等富含U之區域不含AUUUA模體。c-Jun及成肌素為此類別之兩個充分研究之實例。已知大部分結合於ARE之蛋白質使信使去穩定化，而已記錄ELAV家族成員(最顯著地，HuR)提高mRNA之穩定性。HuR與所有三種類別之ARE結合。將HuR特異性結合位點工程改造至核酸分子之3' UTR中將引起HuR結合，且因此引起活體內訊息之穩定。

【0524】3' UTR富含AU之元件(ARE)的引入、移除或修飾可用於調節本文中所描述之核酸之穩定性。當工程改造特異性核酸時，可引入ARE之一或多個複本以使本發明之多核苷酸不太穩定且藉此減少轉譯及減少所得蛋白質之產生。類似地，可鑑別ARE且將其移除或使其突變以提高細胞內穩定性，且因此增加所得蛋白質之轉譯及產生。可在相關細胞株中使用核酸進行轉染實驗，且可在轉染後之各種時間點分析蛋白質產生。舉例而言，可用不同的ARE工程改造分子且藉由使用針對相關蛋白質之ELISA套組來轉染細胞且在轉染後6小時、12小時、24小時、48小時及7天分析所產生之蛋白質。

【0525】在一些實施例中，編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸可操作地連接至活化T細胞核因子(NFAT)啟動子或其功能部分或功能變異體。如本文中所使用之

「NFAT啟動子」意謂一或多個連接至由T細胞表現之任何基因之最小啟動子之NFAT反應元件。較佳地，由T細胞表現之基因之最小啟動子為最小人類IL-2啟動子。NFAT反應元件可包含例如NFAT1、NFAT2、NFAT3及/或NFAT4反應元件。NFAT啟動子(或其功能部分或功能變異體)可包含任何數目的結合模體，例如至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個，或至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、至少十一個或至多十二個結合模體。

表4 - NFAT啟動子相關序列。

說明	胺基酸序列
6X NFAT IL-2 最小啟動子	TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGGCCACC(SEQ ID NO:255)
NFAT 反應元件	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT (SEQ ID NO:256)
人類 IL-2 啟動子	CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG(SEQ ID NO:257)

【0526】在較佳實施例中，NFAT啟動子包含六個NFAT結合模體。參見例如美國專利案第8,556,882號，其以全文引用的方式併入本文中且尤其與NFAT啟動子有關之相關部分。在一些實施例中，NFAT啟動子系統控制包括本文中所描述之任何免疫調節劑之免疫調節融合蛋白質之表現。在某些實施例中，免疫調節劑係選自：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或

促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。編碼可操作地連接至NFAT啟動子之本發明之例示性膜錨定之免疫調節融合蛋白質之例示性核酸描繪於表59中。在一些實施例中，NFAT啟動子系統控制包括IL-15之免疫調節融合蛋白質之表現。在一些實施例中，NFAT啟動子系統控制包括IL-21之免疫調節融合蛋白質之表現。在一些實施例中，NFAT啟動子系統控制包括IL-15及IL-21之免疫調節融合蛋白質之表現。

【0527】在一些實施例中，本發明提供一種TIL，其經基因修飾以包含編碼可操作地連接至NFAT啟動子之免疫調節融合蛋白質之DNA。在一些實施例中，NFAT啟動子控制編碼包括本文中所描述之任何免疫調節劑之免疫調節融合蛋白質之DNA之表現。在某些實施例中，免疫調節劑係選自：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。在一些實施例中，NFAT啟動子控制編碼包括IL-15之免疫調節融合蛋白質之DNA之表現。在一些實施例中，NFAT啟動子控制編碼包括IL-21之免疫調節融合蛋白質之DNA之表現。在一些實施例中，NFAT啟動子控制編碼包括IL-15及IL-21之免疫調節融合蛋白質之DNA之表現。

【0528】在一些實施例中，本發明提供一種TIL，其經基因修飾以包含編碼可操作地連接至NFAT啟動子之免疫調節融合蛋白質之DNA，其中免疫調節融合蛋白質自N

端至C端係根據下式排列：

S1-IA1-L1-C1-L2-S2-IA2-L3-C2，

其中S1及S2各自為信號肽，IA1及IA2各自為免疫調節劑，L1-L3各自為連接子，且C1及C2各自為細胞膜錨部分。在一些實施例中，IA1及IA2為相同的免疫調節劑。在某些實施例中，IA1及IA2為不同的免疫調節劑。適合的免疫調節劑包括本文中所描述之任何免疫調節劑。在一些實施例中，IA1及IA2係獨立地選自IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。在一些實施例中，IA1及IA2係選自由以下組成之群：IL-12及IL-15、IL-15及IL-18、CD40L及IL-15、IL-15及IL-21以及IL-2及IL-12。在一些實施例中，IA1及IA2係獨立地選自IL-15及IL-21。在一些實施例中，IA1為IL-15且IA2為IL-21。在一些實施例中，IA1為IL-21且IA2為IL-15。在一些實施例中，L1-L3中之一或多者為可裂解連接子。在一些實施例中，L1-L3中之兩者或更多者為不同連接子。在例示性實施例中，L2為可裂解連接子。在一些實施例中，L2為弗林蛋白酶可裂解P2A連接子(例如，SEQ ID NO:251)。在一些實施例中，C1及C2獨立地為跨膜域及/或跨膜-細胞內域。在某些實施例中，C1與C2係相同的。在例示性實施例中，C1及C2各自為B7-1跨膜-細胞內域(例如，SEQ ID NO:239)。在例示性實施例中，C1及C2係不同的。包括兩個根據上式之膜錨定之免疫調節融合蛋白質之例示性構築

體描繪於圖36中。

【0529】可使用任何適合之方法將編碼本發明之膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸引入TIL群體中，以產生表現膜錨定之免疫調節融合蛋白質之經暫時修飾或經基因修飾之TIL。在一些實施例中，使用微流體平台將編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸引入TIL群體中。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。參見例如國際專利申請公開案第WO 2013/059343A1號、第WO 2017/008063A1號或第WO 2017/123663A1號或美國專利申請公開案第US 2014/0287509A1號、第US 2018/0201889A1號或第US 2018/0245089A1號，其皆以全文引用之方式併入本文中且尤其關於用於核酸遞送之微流體平台之揭示內容。在SQZ平台中，藉由微流體收縮來暫時破壞用於修飾之細胞(例如，TIL)之細胞膜，藉此實現將編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸遞送至細胞中。

【0530】在一些實施例中，編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸為mRNA且使用微流體平台(例如，SQZ無載體微流體平台)將mRNA遞送至TIL中以產生經暫時修飾之TIL。在一些實施例中，編碼膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸為DNA且使用微流體平台(例如，SQZ無載體微流體平台)將DNA遞送至TIL中以產生穩定的經基因修飾之TIL。可使用微流體平台(例如，SQZ無載體微流體平台)將核酸遞送至在本發明之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)或本發明之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之

任何TIL群體中，以產生經修飾之TIL。在一些實施例中，膜錨定之免疫調節融合蛋白質包括IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其任何組合。

【0531】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-15。在一些實施例中，第二免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-18、IL-21、CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0532】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為CD40L。在一些實施例中，第二免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。

【0533】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-12。在一些實施例中，第二免疫調節劑IL-2、IL-15、IL-18、IL-21、CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0534】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾

之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-18。在一些實施例中，第二免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0535】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-21。在一些實施例中，第二免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0536】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-2。在一些實施例中，第二免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0537】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-2且第二免疫調節劑為IL-12。

【0538】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其

中第一免疫調節劑為IL-2且第二免疫調節劑為IL-15。

【0539】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-2且第二免疫調節劑為IL-18。

【0540】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-2且第二免疫調節劑為IL-21。

【0541】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-2且第二免疫調節劑為CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0542】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-12且第二免疫調節劑為IL-15。

【0543】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-12且第二免疫調節劑為IL-18。

【0544】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包

括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-12且第二免疫調節劑為IL-21。

【0545】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-12且第二免疫調節劑為CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0546】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-15且第二免疫調節劑為IL-18。

【0547】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-15且第二免疫調節劑為IL-21。

【0548】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-15且第二免疫調節劑為CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0549】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-18且第二免疫調節劑為IL-21。

【0550】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-18且第二免疫調節劑為CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0551】在例示性實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括兩個膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包括不同的免疫調節劑(亦即，第一及第二免疫調節劑)，其中第一免疫調節劑為IL-21且第二免疫調節劑為CD40L或抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv)。

【0552】可包括於本文中所提供之經修飾之TIL中的其他膜錨定之免疫調節融合蛋白質描述於WO 2019/157130 A1中，其以全文引用的方式併入本文中，尤其與膜錨定之免疫調節融合蛋白質有關之相關部分。

【0553】包括於本文中所提供之經修飾之TIL中的例示性膜錨定之免疫調節融合蛋白質描繪於圖36及圖37以及表58及表59中。

【0554】在一些實施例中，編碼上文所描述之任何膜錨定之免疫調節融合蛋白質之核酸可操作地連接至NFAT啟動子或其功能部分或功能變異體。

2. 免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質

【0555】在一些實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括免疫調節融合蛋白質，其中此類融合蛋白質包括

一或多種連接至TIL抗原結合域(ABD)之免疫調節劑。在一些實施例中，在TIL ABD結合於TIL表面抗原後，一或多種免疫調節劑栓繫至TIL表面膜。

【0556】TIL抗原結合域包括抗體可變重鏈域(VH)及可變輕鏈域(VL)。在一些實施例中，TIL抗原結合域為全長抗體，其包括根據式VH-CH1-鉸鏈-CH2-CH3之重鏈及根據式VL-CL之輕鏈，其中VH為可變重鏈域；CH1、CH2、CH3為重鏈恆定域，VL為可變輕鏈域且CL為輕鏈恆定域。在一些實施例中，TIL抗原結合域為抗體片段。在某些實施例中，TIL抗原結合域為Fab、Fab'、F(ab')2、F(ab)2、可變片段(Fv)、域抗體(dAb)或單鏈可變片段(scFv)。

【0557】TIL抗原結合域可結合於任何適合的可實現免疫調節劑-TIL ABD融合蛋白質與TIL之表面的連接之TIL抗原。在例示性實施例中，TIL抗原結合域能夠結合於TIL表面抗原。TIL表面抗原包括(但不限於)D16、CD45、CD4、CD8、CD3、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、LFA-1、CD25、CD127、CD56、CD19、CD20、CD22、HLA-DR、CD197、CD38、CD27、CD137、OX40、GITR、CD56、CD196、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CD84、CD229、CCR1、CCR5、CCR4、CCR6、CCR8及/或CCR10。在一些實施例中，ABD結合於CD45。在特定實施例中，ABD結合於選自CD45RA、CD45RB、CD45RC或CD45Rβ之CD45同功異型物。在特定實施例中，ABD結合

於主要表現於T細胞上之CD45。

【0558】在某些實施例中，ABD結合於檢查點抑制劑。例示性檢查點抑制劑包括(但不限於)PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3及CTLA-4(參見例如Qin等人，《分子癌症(Molecular Cancer)》 18:155 (2019))。在一些實施例中，ABD結合於表現於免疫效應細胞(例如，T細胞或NK細胞)上之檢查點抑制劑。例示性抗PD-1抗體揭示於例如美國專利案第US 7,695,715號、第US 7,332,582號、第US 9,205,148號、第US 8,686,119號、第US 8,735,553號、第US 7,488,802號、第US 8,927,697號、第US 8,993,731號及第US 9,102,727號中，其以全文引用之方式併入本文中，尤其與抗PD-1抗體有關之相關部分。例示性抗PD-L1抗體揭示於美國專利案第US 8,217,149號、第US 8,779,108號、第US 8,168,179號、第US 8,552,154號、第US 8,460,927號及第US 9,175,082號中，其以全文引用之方式併入本文中，尤其與抗PD-L1抗體有關之相關部分。例示性抗LAG-3抗體揭示於美國專利案第US 9,244,059號、第US 9,244,059號、第US 9,505,839號中，其以全文引用之方式併入本文中，尤其與抗LAG-3抗體有關之相關部分。例示性TIM-3抗體揭示於WO 2016/161270、US 8,841,418及US 9,163,087中，其以全文引用之方式併入本文中，尤其與抗TIM-3抗體有關之相關部分。例示性CTLA-4抗體揭示於US 6,984,720及US 7,411,057中，其以全文引用之方式併入本文中，尤其與抗CTLA-4抗體有關之相關部分。

【0559】在一些實施例中，ABD為抗CD45抗體或其片段。在某些實施例中，抗CD45抗體為人類抗CD45抗體、人類化抗CD45抗體或嵌合抗CD45抗體。在例示性實施例中，ABD包括抗CD45抗體BC8之vhCDR1-3及vlCDR1-3(參見US20170326259，其以引用之方式併入本文中，尤其與抗CD45抗體序列有關之相關部分)。在一些實施例中，ABD包括抗CD45抗體BC8之可變重鏈域及可變域。在一些實施例中，ABD包括以下抗CD45抗體中之一者之vhCDR1-3及vlCDR1-3或VH及VL：10G10、UCHL1、9.4、4B2或GAP8.3(參見Spertini等人，《免疫學(Immunology)》113(4): 441-452 (2004)，Buzzi等人，《癌症研究(Cancer Research)》52: 4027-4035 (1992))。

【0560】免疫調節融合蛋白質可為任何適合的免疫調節劑，包括例如本文中所提供之任何免疫調節劑。在一些實施例中，免疫調節劑為促進抗腫瘤反應之介白素。在一些實施例中，免疫調節劑為細胞介素。在特定實施例中，免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-21或其生物活性變異體。在某些實施例中，融合蛋白質包括超過一種免疫調節劑。在例示性實施例中，融合蛋白質包括2、3、4、5、6、7、8、9或10種不同的免疫調節劑。

【0561】使用任何適合的連接子將TIL抗原結合域連接至免疫調節劑。適合的連接子包括(但不限於)：可裂解連接子、不可裂解連接子、肽連接子、可撓性連接子、剛性連接子、螺旋連接子或非螺旋連接子。在一些實施例

中，連接子為肽連接子，其視情況包含Gly及Ser。適合的連接子包括長度為至少約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30個胺基酸殘基之連接子。在一些實施例中，連接子之長度為5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、45-50或50-60個胺基酸。在某些實施例中，肽連接子為$(GGGS)_n$或$(GGGGS)_n$連接子，其中n指示模體之重複數且為選自1-10之整數。在一些實施例中，連接子為抗體鉸鏈域或其片段。在某些實施例中，連接子為人類免疫球蛋白(Ig)鉸鏈域(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgE、IgM或IgA鉸鏈)或其片段。在一些實施例中，免疫調節劑直接與TIL偶合而不存在連接子。

【0562】免疫調節劑可在不妨礙融合蛋白質與TIL之結合的適當位置連接至TIL抗原結合域。在其中抗原結合域為全長抗體之一些實施例中，免疫調節劑連接至重鏈或輕鏈之C端或N端。在其中抗原結合域為scFv之一些實施例中，免疫調節劑連接至可變重鏈域或可變輕鏈域之C端或N端。在其中抗原結合域為Fab之一些實施例中，免疫調節劑連接至可變重鏈域或可變輕鏈域之C端或N端。在其中抗原結合域為Fab'之一些實施例中，免疫調節劑連接至可變重鏈域或可變輕鏈域之C端或N端。在其中抗原結合域為Fab'_2之一些實施例中，免疫調節劑連接至可變重鏈域或可變輕鏈域之C端或N端。

【0563】在其中融合蛋白質包括兩種或更多種免疫調節劑之一些實施例中，使用本文中所描述之任何使免疫調節劑彼此連接。在一些實施例中，兩種或更多種免疫調節劑連接至抗原結合域之不同位置。舉例而言，在其中TIL抗原結合域為全長抗體之一些實施例中，兩種或更多種免疫調節劑在以下位置連接：(i)重鏈上之不同位置，(ii)輕鏈上之不同位置，或(iii)重鏈及/或輕鏈上之不同位置。

【0564】可使用任何適合之方法製備本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質。在一個態樣中，本文中提供編碼本發明之融合蛋白質之核酸、包括此類核酸之表現載體及包括表現載體之宿主細胞。在用於融合蛋白質之表現之條件下培養包括編碼本發明之融合蛋白質之表現載體之宿主細胞，且接著分離及純化融合蛋白質。在一些實施例中，接著將經純化之融合蛋白質與TIL群體一起在實現融合蛋白質與TIL之結合之條件下培育。

【0565】在一些實施例中，本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質連接至在本發明之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)之任何步驟期間產生之TIL。在例示性實施例中，融合蛋白質連接至在本發明之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之TIL。在例示性實施例中，融合蛋白質連接至由本文中所提供之過程2A方法中之第一擴增步驟及/或GEN 3方法中之啟始擴增步驟產生之TIL。在例示性實施例中，融合蛋白質連接至由本文中所提供之過程2A方法中之第二擴增步驟及/或GEN 3方法中之快速擴

增步驟產生之TIL。在一些實施例中，TIL為已使用本文中所描述之方法預先選擇之PD-1陽性TIL。

【0566】可使用任何適合之方法將編碼本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質之核酸引入TIL群體中，以產生表現本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質之經暫時修飾或經基因修飾之TIL。在一些實施例中，使用微流體平台將編碼本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質之核酸引入TIL群體中。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。參見例如國際專利申請公開案第WO 2013/059343A1號、第WO 2017/008063A1號或第WO 2017/123663A1號或美國專利申請公開案第US 2014/0287509A1號、第US 2018/0201889A1號或第US 2018/0245089A1號，其皆以全文引用之方式併入本文中且尤其關於用於核酸遞送之微流體平台之揭示內容。在SQZ平台中，藉由微流體收縮來暫時破壞用於修飾之細胞(例如，TIL)之細胞膜，藉此實現將編碼免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質之核酸遞送至細胞中。

【0567】在一些實施例中，編碼本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質之核酸為mRNA且使用微流體平台(例如，SQZ無載體微流體平台)將mRNA遞送至TIL中以產生經暫時修飾之TIL。在一些實施例中，編碼本發明之免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質之核酸為DNA且使用微流體平台(例如，SQZ無載體微流體平台)將核酸遞送至TIL中以產生穩定的經基因修飾之TIL。可使用微流體

平台(例如，SQZ無載體微流體平台)將核酸遞送至在本發明之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)或本發明之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之任何TIL群體中，以產生經修飾之TIL。在一些實施例中，膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-2、IL-12、IL-15、IL-21或其組合(例如，IL-15及IL-21)。

【0568】適用於本文中所提供之組合物及方法之例示性免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質亦描述於例如美國專利申請公開案第20200330514號中，其全部內容及與免疫調節劑-TIL抗原結合域融合蛋白質有關之相關部分以引用的方式併入本文中。

B. 奈米粒子組合物

【0569】在一些實施例中，本文中所提供之本發明之經修飾之TIL包括一或多種奈米粒子，且此等奈米粒子包括一或多種免疫調節劑。在一些實施例中，本文中所提供之奈米粒子包括彼此及/或與粒子之第二組分偶合(例如，經由可降解連接子可逆地連接)之兩種或更多種蛋白質中之複數種。在一些實施例中，奈米粒子之蛋白質存在於聚合物或二氧化矽中。在某些實施例中，奈米粒子包括奈米殼。本文中所提供之奈米粒子包括一或多種免疫調節劑。在一些實施例中，免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性抗CD40結合域(例如，抗CD40 scFv))或其生物活性變異體。使用本

文中所描述之任何適合的技術將奈米粒子連接至TIL之表面。

【0570】用於本文中所提供之本發明之經修飾之TIL中之例示性奈米粒子包括(但不限於)脂質體、蛋白質奈米凝膠、核苷酸奈米凝膠、聚合物奈米粒子或固體奈米粒子。在一些實施例中，奈米粒子包括脂質體。在例示性實施例中，奈米粒子包括免疫調節劑奈米凝膠。在特定實施例中，奈米粒子為具有複數種彼此共價連接之免疫調節劑(例如，細胞介素)之免疫調節劑奈米凝膠。在一些實施例中，奈米粒子包括奈米粒子表面上之至少一種聚合物、陽離子性聚合物或陽離子性嵌段共聚物。可用於本文中所提供之組合物中之例示性奈米粒子揭示於例如美國專利案第9,283,184號及第9,603,944號中，其全部內容及與奈米粒子有關之相關部分各自以引用的方式併入本文中。

【0571】免疫調節劑可任何適合的免疫調節劑，包括例如本文中所提供之任何免疫調節劑。在一些實施例中，免疫調節劑為促進抗腫瘤反應之介白素。在一些實施例中，免疫調節劑為細胞介素。在特定實施例中，免疫調節劑為IL-2、IL-12、IL-15、IL-21或其生物活性變異體。在某些實施例中，融合蛋白質包括超過一種免疫調節劑。在例示性實施例中，融合蛋白質包括2、3、4、5、6、7、8、9或10種不同的免疫調節劑。

【0572】在一些實施例中，奈米粒子包括彼此及/或與第二組分(例如，可降解連接子)共價交聯之蛋白質。在

一些實施例中，奈米粒子包括經由可降解連接子連接至官能基或聚合物或「經可逆修飾」之免疫調節劑。在一些實施例中，奈米粒子為奈米凝膠，其包括複數種經由可降解連接子彼此交聯之免疫調節劑(參見美國專利案第9,603,944號)。在例示性實施例中，奈米凝膠之蛋白質與聚合物(例如，聚乙二醇(PEG))交聯。在一些實施例中，聚合物與奈米凝膠表面交聯。

【0573】在一些實施例中，奈米粒子之免疫調節劑經由可降解連接子(例如，二硫鍵連接子)彼此可逆地連接，使得連接子在生理條件下降解，藉此釋放免疫調節劑。在一些實施例中，奈米粒子之免疫調節劑經由可降解連接子可逆地連接至官能基，使得連接子在生理條件下降解且釋放免疫調節劑。適合的可降解連接子包括(但不限於)：藉由可撓性的含有二硫鍵之連接子接合在一起之兩個N-羥基丁二醯亞胺(NHS)酯基團，該連接子對還原性生理環境敏感；對酸性生理環境(pH<7，舉例而言，4-5、5-6或6至小於7，例如，6.9之pH值)敏感之可水解連接子，或對生物培養基中存在之一或多種酶(諸如腫瘤微環境中之蛋白酶，諸如腫瘤微環境或發炎組織中存在之基質金屬蛋白酶(例如，基質金屬蛋白酶2(MMP2)或基質金屬蛋白酶9(MMP9)))敏感之蛋白酶敏感性連接子。對還原性生理環境敏感之交聯劑為例如具有含有二硫鍵之連接子之交聯劑，其將藉由存在NHS基團而與蛋白質上之胺基反應，從而使蛋白質交聯成高密度蛋白質奈米凝膠。在一些實施例

中，可降解交聯劑包括雙[2-(N-丁二醯亞胺基-氧基羰基氧基)乙基]二硫化物。

【0574】在一些實施例中，可降解連接子包括至少一種N-羥基琥珀醯亞胺酯。在一些實施例中，可降解連接子為氧化還原反應性連接子。在一些實施例中，氧化還原反應性連接子包括二硫鍵。在一些實施例中，本文中所提供之可降解連接子包括至少一種N-羥基琥珀醯亞胺酯，其能夠與蛋白質在中性pH值(例如，約6至約8，或約7)下反應而不會使蛋白質實質上變性。在一些實施例中，可降解連接子為「氧化還原反應性」連接子，意謂其在存在還原劑(例如，麩胱甘肽、GSH)之情況下，在生理條件(例如，20-40℃及/或pH 4-8)下降解，藉此使與其可逆地連接之完整蛋白質自化合物釋放。在一些實施例中，奈米粒子之蛋白質經由末端或內部-NH_2官能基(例如，離胺酸之側鏈)連接至可降解連接子。

【0575】在其他實施例中，奈米粒子之蛋白質藉由酶敏感性連接子連接。例示性可裂解連接子包括由一種以下酶識別之可裂解連接子：金屬蛋白酶MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、纖維蛋白溶酶、PSA、PSMA、組織蛋白酶D、組織蛋白酶K、組織蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、凋亡蛋白酶-1、凋亡蛋白酶-2、凋亡蛋白酶-3、凋亡蛋白酶-4、凋亡蛋白酶-5、凋亡蛋白酶-6、凋亡蛋白酶-7、凋亡蛋白酶-8、凋亡蛋白酶-9、凋亡蛋白酶-10、凋亡蛋白酶-11、凋亡蛋白酶-

12、凋亡蛋白酶-13、凋亡蛋白酶-14及TACE。參見例如美國專利案第8,541,203號及第8,580,244號，其全部內容及與可裂解連接子有關之相關部分各自以引用之方式併入本文中。

【0576】在一些實施例中，奈米粒子為奈米凝膠，其包括單分散的複數種免疫調節劑(例如，細胞介素)。在一些實施例中，奈米凝膠之免疫調節劑與聚合物交聯。在某些實施例中，聚合物與奈米凝膠之表面交聯。在特定實施例中，奈米凝膠包括：a)一或多種經由可降解連接子而彼此可逆及共價交聯之免疫調節劑；及b)與奈米凝膠之表面暴露之蛋白質交聯之聚合物。此類奈米凝膠可藉由使一或多種免疫調節劑與可降解連接子在以下條件下接觸來製備：允許免疫調節劑經由可降解連接子而彼此可逆地共價交聯以形成複數種免疫調節劑奈米凝膠。接著，使免疫調節劑奈米凝膠與聚合物(例如，聚乙二醇)在允許聚合物與免疫調節劑奈米凝膠之免疫調節劑交聯之條件下接觸，藉此產生複數種免疫調節劑-聚合物奈米凝膠。

【0577】在一些實施例中，奈米粒子包括一或多種聚合物。例示性聚合物包括(但不限於)：脂族聚酯、聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、乳酸與乙醇酸之共聚物(PLGA)、聚己內酯(PCL)、聚酸酐、聚(鄰)酯、聚胺基甲酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)及聚(丙交酯-共-己內酯)，及天然聚合物，諸如褐藻酸鹽及其他多醣，包括聚葡萄糖及纖維素、膠原蛋白、其化學衍生物，包括化學基團(諸如烷

基、伸烷基)之取代、添加；羥基化；氧化；及藉由熟習此項技術者常規進行之其他修飾)、白蛋白及其他親水性蛋白質、玉米蛋白及其他醇溶蛋白及疏水性蛋白，其共聚物及混合物。在一些實施例中，奈米粒子之免疫調節劑連接至親水性聚合物。例示性親水性聚合物包括(但不限於)：聚乙二醇(PEG)、聚乙二醇-b-聚離胺酸(PEG-PLL)及/或聚乙二醇-b-聚精胺酸(PEG-PArg)。

【0578】在一些實施例中，奈米粒子(例如，奈米凝膠)在其表面上包括一或多種聚陽離子。用於本發明之奈米粒子之例示性聚陽離子包括(但不限於)聚離胺酸(聚-L-離胺酸及/或聚-D-離胺酸)、聚(精胺酸甘油基丁二酸酯)(PAGS，一種基於精胺酸之聚合物)、聚乙二亞胺、聚組胺酸、聚精胺酸、魚精蛋白硫酸酯、聚乙二醇-b-聚離胺酸(PEG-PLL)及聚乙二醇-g-聚離胺酸。

【0579】在一些實施例中，奈米粒子藉由對TIL之靜電引力而與TIL表面結合。在某些實施例中，奈米粒子包括對TIL之表面分子(例如，表面蛋白質、碳水化合物及/或脂質)具有親和力之配位體。

【0580】在特定實施例中，奈米粒子包括結合如本文中所描述之TIL表面抗原之抗原結合域。在一些實施例中，抗原結合域為抗體或其片段。在例示性實施例中，TIL表面抗原為CD45、LFA-1、CD 11a(整合素α-L)、CD 18(整合素β-2)、CD11b、CD11c、CD25、CD8或CD4。在例示性實施例中，抗原結合域(ABD)為抗CD45抗體或其片

段。在某些實施例中，抗CD45抗體為人類抗CD45抗體、人類化抗CD45抗體或嵌合抗CD45抗體。在例示性實施例中，ABD包括抗CD45抗體BC8之vhCDR1-3及vlCDR1-3(參見US20170326259，其以引用之方式併入本文中，尤其與抗CD45抗體序列有關之相關部分)。在一些實施例中，ABD包括抗CD45抗體BC8之可變重鏈域及可變域。在一些實施例中，ABD包括以下抗CD45抗體中之一者之vhCDR1-3及vlCDR1-3或VH及VL：10G10、UCHL1、9.4、4B2或GAP8.3(參見Spertini等人，《免疫學(Immunology)》113(4):441-452 (2004)，Buzzi等人，《癌症研究(Cancer Research)》52:4027-4035 (1992))。在此類實施例中，藉由在存在奈米粒子之情況下，在其中奈米粒子結合於TIL之表面之條件下培育TIL來使奈米粒子連接至TIL群體之表面。

【0581】在一些實施例中，奈米粒子藉由靜電引力與TIL細胞表面結合。在一些實施例中，奈米粒子與TIL共價結合。在其他實施例中，奈米粒子不與TIL共價結合。

【0582】在一些實施例中，本發明之奈米粒子連接至在本發明之過程2A方法(參見例如圖2-圖6)之任何步驟期間產生之TIL。在例示性實施例中，本發明之奈米粒子連接至在本發明之GEN 3方法(參見例如圖7)之任何步驟期間產生之TIL。在例示性實施例中，本發明之奈米粒子連接至由本文中所提供之過程2A方法中之第一擴增步驟及/或GEN 3方法中之啟始擴增步驟產生之TIL。在例示性實施

例中，本發明之奈米粒子連接至由本文中所提供之過程2A方法中之第二擴增步驟及/或GEN 3方法中之快速擴增步驟產生之TIL。在一些實施例中，TIL為已使用本文中所描述之方法預先選擇之PD-1陽性TIL。

【0583】其他適用於本文中所提供之經修飾之TIL中之奈米粒子揭示於美國專利申請公開案第US20200131239號及第WO2020205808號中，其全部內容及與奈米粒子有關之相關部分各自以引用的方式併入本文中。

C. 免疫調節劑

【0584】本文中所提供之經修飾之TIL可包括一或多種連接至其表面之免疫調節劑。可將免疫調節劑併入本文中所描述之任何免疫調節融合蛋白質中，包括例如本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質。本發明之經修飾之TIL中可包括任何適合的免疫調節劑。在一些實施例中，在轉移至患者中後，免疫調節劑增強TIL存活及/或抗腫瘤活性。例示性免疫調節劑包括例如細胞介素。在一些實施例中，經修飾之TIL包括以下細胞介素中之一或多者：IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IL-4、IL-1α、IL-1β、IL-5、IFNγ、TNFα(TNFa)、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其生物活性變異體。在一些實施例中，免疫調節劑為共刺激分子。在特定實施例中，共刺激分子為以下中之一者：OX40、CD28、GITR、VISTA、CD40、CD3或CD137之促效劑。在一些實施例

中，免疫調節劑為CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。例示性免疫調節劑進一步詳細論述於下文中。

1. IL-15

【0585】在一些實施例中，本文中所提供之經修飾之TIL包括IL-15。在例示性實施例中，包括IL-15作為如本文中所描述之免疫調節融合蛋白質(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之一部分。

【0586】如本文中所使用，「介白素15」、「IL-15」及「IL15」皆係指結合於複合物且經由該複合物進行信號傳導之介白素，該複合物係由IL-15特異性受體α鏈(IL-15Rα)、IL-2/IL-15受體β鏈(CD122)及共用γ鏈(γ-C，CD132)構成(例如Genbank寄存編號：NM_00000585、NP_000576及NP_751915(人類)；及NM_001254747及NP_001241676(小鼠))。已證實IL-15刺激腫瘤內之T細胞增殖。IL-15亦能夠提高效應記憶體CD8+ T細胞之存活能力且對於NK細胞之發育係重要的。因此，不受任何特定操作理論約束，咸信與本文中所描述之IL-15結合之經修飾之TIL呈現增強之存活及/或抗腫瘤作用。

【0587】IL-15在活體內具有小於40分鐘之短半衰期。對IL-15單體之修飾可改良其在治療癌症時之活體內藥物動力學。此等修飾通常集中於藉由IL-15受體之α子單元，即IL-15Rα來改良IL-15之反式呈現。此類修飾包括：

1)IL-15與其可溶性受體a-子單元-Fc融合物之預先結合，以形成IL-15:IL-15Rα-Fc複合物(參見例如Rubinstein等人，《美國國家科學院院刊》 103:9166-71 (2006))；2)超促效劑IL-15-sIL-15Rα-壽司蛋白質(sushi protein)之表現(參見例如Bessard等人，《分子癌症治療劑(Molecular cancer therapeutics)》 8: 2736-45 (2009))；及3)人類IL-15突變體IL-15N72D與IL-15Rα-Fc壽司-Fc融合物複合物之預先結合(參見例如Zhu等人，《免疫學雜誌(Journal of Immunology)》 183: 3598-6007 (2009))。

【0588】在一些實施例中，與經修飾之TIL結合之IL-15為全長IL-15、IL-15之片段或變異體。在一些實施例中，IL-15為人類IL-15或變異型人類IL-15。在例示性實施例中，IL-15為生物學活性人類IL-15變異體。在一些實施例中，IL-15與野生型IL-15相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變。在某些實施例中，IL-15與野生型人類IL-15相比包括N72D突變。在一些實施例中，變異型IL-15呈現IL-15Rα結合活性。

【0589】在一些實施例中，免疫調節劑包括IL-15及IL-15Rα之細胞外域。在某些實施例中，免疫調節劑包括IL-15及與Fc域融合之IL-15Rα(IL-15Rα-Fc)。

表 5 - IL-15 相關序列。

說明	胺基酸序列
人類 IL-15(N72D 突變體)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM KCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANDSLSSNGNVTE SGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:258)
人類 IL-15R-α-Su/Fc 域	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIREPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQ ID NO:259)
人類 IL-15R-α-Su(65aa 截短型細胞外域)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIR(SEQ ID NO:260)
人類 IL-15 同功異型物 2	MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSM HIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQ SFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:261)
人類 IL-15 同功異型物 1	MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAG LPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPS CKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLS SNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SE Q ID NO:262)
人類 IL-15(不具有信號肽)	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM KCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTE SGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS(SEQ ID NO:263)
人類 IL-15R-α(85 aa 截短型細胞外域)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVT TAGV(SEQ ID NO:264)
人類 IL-15R-α(182aa 截短型細胞外域)	ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSS LTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVT TAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQL MPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQP PGVYPQGHSDTTVAISTST(SEQ ID NO:265)
人類 IL-15R-α	MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVE HADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKA TNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPE SLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTG TTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTA SASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVSLLACY LKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHH L(SEQ ID NO:266)

【0590】在一些實施例中，免疫刺激性蛋白質為超促效劑 IL-15(IL-15SA)，其包括人類 IL-15與可溶性人類 IL-

15Rα之複合物。人類IL-15與可溶性人類IL-15Rα之組合形成IL-15 SA複合物，其具有比單獨的人類IL-15更高的生物活性。此項技術中已描述可溶性人類IL-15Rα以及細胞外域之截短型式(Wei等人，2001《免疫學雜誌(J of Immunol.)》167: 277-282)。人類IL-15Rα之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO:266中。在一些實施例中，IL-15SA包括人類IL-15與可溶性人類之複合物。IL-15Rα包含全部或一部分細胞外域且不具有跨膜或細胞質域。在一些實施例中，IL-15SA包括人類IL-15與可溶性人類IL-15Rα之複合物，該可溶性人類IL-15Rα包括完全細胞外域或細胞外域之保留IL-15結合活性之截短形式。

【0591】在一些實施例中，IL-15SA包括人類IL-15與可溶性人類IL-15Rα之複合物，該可溶性人類IL-15Rα包括細胞外域之保留IL-15結合活性之截短形式。在一些實施例中，可溶性人類IL-15Rα包括人類IL-15Rα之胺基酸1-60、1-61、1-62、1-63、1-64或1-65。在一些實施例中，可溶性人類IL-15Rα包括人類IL-15Rα之胺基酸1-80、1-81、1-82、1-83、1-84或1-85。在一些實施例中，可溶性人類IL-15Rα包括人類IL-15Rα之胺基酸1-180、1-181或1-182。

【0592】在一些實施例中，免疫調節劑為包含人類IL-15與可溶性人類IL-15Rα之複合物之IL-15SA，該可溶性人類IL-15Rα包含細胞外域之保留IL-15結合活性且包含壽司域之截短形式。在此項技術中，IL-15Rα之壽司域描

述為長度係約60個胺基酸且包含4個半胱胺酸。(Wei等人,2001)。可溶性人類IL-15Rα之保留IL-15活性且包含壽司域之截短形式適用於本發明之IL-15SA中。

【0593】在一些實施例中，免疫調節劑包括複合物，其包含以融合蛋白質，諸如本文中所描述之Fc融合物(例如，人類IgG1 Fc)形式表現之可溶性人類IL-15Rα及IL-15。在一些實施例中，IL-15SA包含二聚人類IL-15RαFc融合蛋白質(例如，人類IgG1 Fc)與兩個人類IL-15分子之複合物。

【0594】在一些實施例中，免疫調節劑為IL-15SA細胞介素複合物，其包括包含SEQ ID NO:258、SEQ ID NO:261、SEQ ID NO:262或SEQ ID NO:263中所闡述之胺基酸序列之IL-15分子。在一些實施例中，IL-15SA細胞介素複合物包含可溶性IL-15Rα分子，其包含SEQ ID NO:260、SEQ ID NO:264或SEQ ID NO:265之序列。

【0595】在一些實施例中，免疫調節劑為IL-15SA細胞介素複合物，其包括二聚IL-15RαFc融合蛋白質與兩個IL-15分子之複合物。在一些實施例中，IL-15-SA包含二聚IL-15RαSu(壽司域)/Fc(SEQ ID NO:259)及兩個IL-15N72D(SEQ ID NO:258)分子(亦稱為ALT-803)，如US20140134128中所描述，其以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，IL-15SA包含二聚IL-15RαSu/Fc分子(SEQ ID NO:259)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:261)。在一些實施例中，IL-15SA包含二聚IL-15RαSu/Fc分子(SEQ ID

NO:259)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:262)。在一些實施例中，IL-15SA包含二聚IL-15RαSu/Fc分子(SEQ ID NO:259)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:263)。

【0596】在一些實施例中，IL-15SA包括二聚IL-15RαSu/Fc分子(SEQ ID NO:259)及兩個具有選自SEQ ID NO:258、258、262及263之胺基酸序列之IL-15分子。

【0597】在一些實施例中，IL-15SA包括可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:260)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:258)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:260)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:261)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:260)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:262)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:260)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:263)。

【0598】在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:264)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:258)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:264)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:261)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:264)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:262)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:264)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:261)。

【0599】在一些實施例中，IL-15SA包括可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:265)及兩個IL-15分子(SEQ ID

NO:258)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:265)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:261)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:265)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:262)。在一些實施例中，IL-15SA包含可溶性IL-15Rα分子(SEQ ID NO:265)及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:263)。

【0600】在一些實施例中，IL-15SA包含二聚IL-15RαSu/Fc(SEQ ID NO:269)分子及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:262)。在一些實施例中，IL-15SA包括二聚IL-15RαSu/Fc(SEQ ID NO:259)分子及兩個IL-15分子(SEQ ID NO:263)。

【0601】在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:259及SEQ ID NO:260。在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:261或SEQ ID NO:262。在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:261及SEQ ID NO:259。在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:262及SEQ ID NO:259。在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:263及SEQ ID NO:259。在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:261及SEQ ID NO:260。在一些實施例中，IL-15SA包括SEQ ID NO:262及SEQ ID NO:260。

【0602】在一些實施例中，TIL組合物包括有包括IL-15或其生物活性變異體之免疫調節融合蛋白質或奈米粒子組合物。包括IL-15之例示性融合蛋白質描繪於圖36及圖37以及表58及表59中。

【0603】在例示性實施例中，本文中所提供之TIL組合物包括編碼包括IL-15之免疫調節融合蛋白質之核酸，其中核酸可操作地連接至NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子，如本文中所描述。用於包括IL-15之免疫調節融合蛋白質之表現的例示性NFAT啟動子驅動構築體描繪於表59中。

2. IL-12

【0604】在一些實施例中，經修飾之TIL與IL-12或其變異體結合。在例示性實施例中，包括IL-12作為如本文中所描述之免疫調節融合蛋白質(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之一部分。

【0605】如本文中所使用，「介白素12」、「IL-12」及「IL12」皆係指一種介白素，其為由IL-12A及IL-12B基因編碼之雜二聚細胞介素(Genbank寄存編號：NM_000882(IL-12A)及NM_002187(IL-12B))。IL-12由一束四個α螺旋構成且涉及原生T細胞分化成TH1細胞。其由兩種獨立基因IL-12A(p35)及IL-12B(p40)編碼。在蛋白質合成後形成活性雜二聚體(稱為『p70』)及p40之均二聚體。IL-12結合於IL-12受體，其為由IL-12R-β1及IL-12R-β2形成之雜二聚受體。IL-12稱為T細胞刺激因子，其可刺激T細胞之生長及功能。特定言之，IL-12可刺激干擾素γ(IFN-γ)及腫瘤壞死因子-α(TNF-α)自T細胞及自然殺手(NK)細胞之產生且降低IL-4介導之IFN-γ抑制。IL-12亦可介導NK細

胞及CD8+細胞毒性T淋巴球之細胞毒性活性之增強。此外，藉由增加干擾素γ之產生，IL-12亦可具有抗血管生成活性，其又增加趨化介素誘導蛋白-10(IP-10或CXCL10)之產生。接著，IP-10介導此抗血管生成作用。因此，不受任何特定操作理論約束，咸信IL-12可增加本文中所提供之TIL組合物之存活能力及/或抗腫瘤作用。

【0606】在一些實施例中，與經修飾之TIL結合之IL-12為全長IL-12、IL-12之片段或變異體。在一些實施例中，IL-12為人類IL-12或變異型人類IL-12。在例示性實施例中，IL-12為生物學活性人類IL-12變異體。在一些實施例中，IL-12與野生型IL-12相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變。

【0607】在一些實施例中，經修飾之TIL組合物中所包括之IL-12包括IL-12 p35子單元或其變異體。在一些實施例中，IL-12 p35子單元為人類IL-12 p35子單元。在一些實施例中，IL-12 p35子單元具有胺基酸序列。在某些實施例中，經修飾之TIL組合物中所包括之IL-12包括IL-12 p40子單元或其變異體。在某些實施例中，IL-12為單鏈IL-12多肽，其包含連接至IL-12 p40子單元之IL-12 p35子單元。此類IL-12單鏈多肽有利地保留野生型IL-12之一或多種生物活性。在一些實施例中，自N端至C端，本文中所描述之單鏈IL-12多肽係根據式(p40)-(L)-(p35)，其中「p40」為IL-12 p40子單元，「p35」為IL-12 p35子單元且L為連接子。在其他實施例中，自N端至C端，單鏈IL-12係根據

式(p35)-(L)-(p40)。單鏈IL-12多肽可使用任何適合的連接子，包括本文中所描述之連接子。適合的連接子可包括例如具有胺基酸序列$(GGGGS)_x$之連接子，其中x為1-10之整數。其他適合的連接子包括例如胺基酸序列GGGGGGS。可與本發明之單鏈IL-12多肽一起使用之例示性單鏈IL-12連接子亦描述於Lieschke等人，《自然生物技術(*Nature Biotechnology*)》 15: 35-40 (1997)中，其以全文引用之方式併入本文中且尤其關於IL-12多肽連接子之教示內容。在例示性實施例中，單鏈IL-12多肽為單鏈人類IL-12多肽(亦即，其包括人類p35及p40 IL-12子單元)。

表6 - IL-12相關序列。

說明	胺基酸序列
人類IL-12 p35子單元	RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYP CTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITN GSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS(SEQ ID NO:267)
人類IL-12 p40子單元	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWL TTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEY EYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFI RDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSL TFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQD RYYSSSWSEWASVPCS(SEQ ID NO:268)

【0608】在一些實施例中，TIL組合物包括免疫調節融合蛋白質或奈米粒子組合物，其包括IL-12或其生物活性變異體。

【0609】在例示性實施例中，本文中所提供之TIL組合物包括編碼包括IL-12之免疫調節融合蛋白質之核酸，其中核酸可操作地連接至NFAT啟動子、EF-1a啟動子、

MND啟動子或SSFV啟動子，如本文中所描述。參見例如美國專利案第8,556,882號，其以全文引用的方式併入本文中且尤其與用於IL-12表現之NFAT啟動子有關之相關部分。包括IL-12之例示性融合蛋白質描繪於圖36及圖37以及表58中。

3. IL-18

【0610】在一些實施例中，經修飾之TIL與IL-18或其變異體結合。在例示性實施例中，包括IL-18作為如本文中所描述之免疫調節融合蛋白質(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之一部分。

【0611】如本文中所使用，「介白素18」、「IL-18」、「IL18」、「IGIF」、「IL-1g」、「干擾素-γ誘導因子」及「IL1F4」皆係指一種介白素，其為由IL-18基因編碼之雜二聚細胞介素(例如，Genbank寄存編號：NM_001243211、NM_001562及NM_001386420)。IL-18，在結構上與IL-1β類似，為細胞介素之IL-1超家族之成員。此細胞介素，其由許多人類淋巴及非淋巴細胞表現，在發炎過程中具有重要作用。IL-18與IL-12之組合可活化細胞毒性T細胞(CTL)以及自然殺手(NK)細胞以產生IFN-γ且因此，有助於腫瘤免疫性。因此，不受任何特定操作理論約束，咸信IL-18可增強本文中所提供之TIL組合物之抗腫瘤作用。

【0612】在一些實施例中，與經修飾之TIL結合之IL-

18為全長IL-18、IL-18之片段或變異體。在一些實施例中，IL-18為人類IL-18或變異型人類IL-18。在例示性實施例中，IL-18為生物學活性人類IL-18變異體。在一些實施例中，IL-18與野生型IL-18相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個突變(SEQ ID NO:269)。在一些實施例中，生物活性變異體為抗誘餌IL-18變異體(“DR-IL18”或“DR-IL-18”)，即使存在抑制性分子諸如IL-18結合蛋白(IL-18BP)，其亦提供IL-18信號傳導活性。可包括於本文中所描述之標的經修飾之TIL中的例示性IL-18變異體示於下表7中。WO 2022/094473中描述了可包括於標的經修飾之TIL中之其他IL-18變異體，該文獻以全文引用的方式併入並且特定關於與變異體DR-IL-18有關之揭示內容。

【0613】在一些實施例中，變異體IL-18包括選自C38S/C68S、C38S/C68G、C38S/C68A、C38S/C68D及C38S/C68N之穩定性突變對[相對於人類野生型IL-18 - SEQ ID NO: 269]。在一些實施例中，除了選自C38S/C68S、C38S/C68G、C38S/C68A、C38S/C68D及C38S/C68N之穩定化突變對[相對於人類野生型IL-18 - SEQ ID NO: 269]之外，變異體IL-18包括在胺基酸位置M51(例如，M51E、M51R、M51K、M51T、M51D或M51N)、K53(例如，K53G、K53S、K53T或K53R)、Q56(例如，Q56G、Q56R、Q56L、Q56E、Q56A、Q56V或Q56K)、D110(例如，D110S、DI 10N、D110G、D110K、D110H、D110Q或

D110E)及N111(例如，N111G、N111R、Ni l IS、Ni l ID、N111H或N111Y)之突變。在一些此類情況下，穩定化IL-18變異體多肽另外包括在胺基酸位置S105(例如，S105D、SI 05 A、S105N、S105R、S105D或S105K)處之突變；並且在一些情況下，進一步包括在胺基酸位置P57(例如，P57A、P57L、P57G或P57K)及M60(例如，M60L、M60R、M60K或M60Q)處之突變。

表7 - IL-18相關序列。

說明	胺基酸序列
人類IL-18	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED (SEQ ID NO:269)
人類IL-18變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKK EDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO:270)
人類IL-18變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKSEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 331)
人類IL-18變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKGEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 332)
人類IL-18變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKAEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 333)
人類IL-18變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKVEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 334)
人類IL-18變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKDEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 335)

人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKEEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 336)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKNEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDEL(SEQ ID NO: 337)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 338)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDKQPRAKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQNED(SEQ ID NO: 339)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 340)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 341)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESQLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDKQPRTKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRRVPGHHNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQKED(SEQ ID NO: 342)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYKDKQPRAQAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQNED(SEQ ID NO: 343)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISDYKDKQPRAXAAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNI KDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLIL KKEDELGDRSIMFTIQNED(SEQ ID NO: 344) X=任何天然存在之胺基酸
人類 IL-18 變異體	YFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHNNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTTQNED(SEQ ID NO: 345)
人類 IL-18 變異體	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTI FIISKYKDKQPRAQAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRKVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQKED(SEQ ID NO: 346
人類 IL-18 變異體	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTI FIISTYKDRQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHHHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQNED(SEQ ID NO: 347)
人類 IL-18 變異體	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTI FIISTYKDKQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK

	DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTTQHED(SEQ ID NO: 348)
人類 IL-18 變異體	YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTI FIISTYKDKQPRAKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRRVPGHHHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQKED(SEQ ID NO: 349)
人類 IL-18 變異體	YFGKIESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTI FIISTYKDKQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHDYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQKED(SEQ ID NO: 350)
人類 IL-18 變異體	YFGKYESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHEHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQKED(SEQ ID NO: 351)
人類 IL-18 變異體	HFGKYESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHHNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQKED(SEQ ID NO: 352)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRAKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTAQKED(SEQ ID NO: 353)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISDYRDSQPRGRAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFKRNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQHED(SEQ ID NO: 354)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISNYRDSQPRGQAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFKRRVPGHNHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQKED(SEQ ID NO: 355)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 356)
人類 IL-18 變異體	RFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 357)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRAKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQXED(SEQ ID NO: 358) X=任何天然存在之胺基酸
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRTKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRNVPGHHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQHED(SEQ ID NO: 359)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDSQPRAKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTIQKED(SEQ ID NO: 360)

人類 IL-18 變異體	RFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRGKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 361)
人類 IL-18 變異體	RFGKYESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYKDSQPRTKAVTISVKCEKISTLSCDNKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 362)
人類 IL-18 變異體	RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISTYRDSQPRTKAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRKVPGHNHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQKED(SEQ ID NO: 363)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISEYKDSELRGRAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFPRAVPGHNRKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 364)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYKDSAGRGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHSNKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 365)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYGDSAARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRSVPGHKRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 366)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYGDSRGRGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHNSKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 367)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYGDSVPRGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARAVPGHSRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 368)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSGARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARAVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 369)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSKARGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARDVPGHSSKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 370)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 371)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRNVPGHGRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 372
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK

	KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 373)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARDVPGHSGKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 374)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYTDSRPRGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHSSKKQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 375)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYTDSRARGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHNDKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 376)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISRYKDSGKRGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFRRSVPGHSRKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 377)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYGDSGARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFERDVPGHSGKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 378)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYGDSRPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRAVPGHNRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 379
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSLARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 380)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNE(SEQ ID NO: 381)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFQRNVPGHGRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 382)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYGDSVPRGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARAVPGHSRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 383)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 384)
人類 IL-18 變異體	YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRT IFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIK DTKSDIIFFARDVPGHSGKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILK KEDELGDRSIMFTVQNED(SEQ ID NO: 385)

【0614】在一些實施例中，TIL組合物包括免疫調節融合蛋白質或奈米粒子組合物，其包括IL-18或其生物活性變異體(例如，表7中包括之IL-18變異體中之任一者)。包括IL-18之例示性融合蛋白質描繪於圖36中。

【0615】在例示性實施例中，本文中所提供之TIL組合物包括編碼包括IL-18之免疫調節融合蛋白質之核酸，其中核酸可操作地連接至NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子，如本文中所描述。用於包括IL-21之免疫調節融合蛋白質之表現的例示性NFAT啟動子驅動構築體描繪於表59中。

4. IL-21

【0616】在一些實施例中，經修飾之TIL與IL-21或其變異體結合。在例示性實施例中，包括IL-21作為如本文中所描述之免疫調節融合蛋白質(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之一部分。

【0617】在某些實施例中，細胞介素-ABD包括IL-21分子或其片段。如本文中所使用，「介白素21」、「IL-21」及「IL21」(例如，Genbank寄存編號：NM_001207006及NP_001193935(人類)；及NM_0001291041及NP_001277970(小鼠))皆係指細胞介素之成員，其結合於IL-21受體且對免疫系統之細胞(包括自然殺手(NK)細胞及細胞毒性細胞)具有強效調節作用，且結合於可破壞病毒感染或癌性細胞之IL-21受體。因此，不受任何特定操作理論約束，咸信

IL-21可增加本文中所提供之TIL組合物之存活能力及/或抗腫瘤作用。

【0618】在一些實施例中，IL-21為人類IL-21。在一些實施例中，與經修飾之TIL結合之IL-21為全長IL-21、IL-21之片段或變異體。在一些實施例中，IL-21為人類IL-21或變異型人類IL-21。在例示性實施例中，IL-21為生物學活性人類IL-21變異體。在一些實施例中，IL-21與野生型IL-21相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變。

表8 - IL-21相關序列。

說明	胺基酸序列
人類IL-21	QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEW SAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHR LTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS(SEQ ID NO:271)

【0619】在一些實施例中，TIL組合物包括免疫調節融合蛋白質或奈米粒子組合物，其包括IL-21或其生物活性變異體。包括IL-21之例示性融合蛋白質描繪於圖36及圖37以及表58及表59中。

【0620】在例示性實施例中，本文中所提供之TIL組合物包括編碼包括IL-21之免疫調節融合蛋白質之核酸，其中核酸可操作地連接至NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子，如本文中所描述。

5. IL-2

【0621】在一些實施例中，經修飾之TIL與IL-2或其

變異體結合。在例示性實施例中，包括IL-2作為如本文中所描述之免疫調節融合蛋白質(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之一部分。

【0622】在某些實施例中，細胞介素-ABD包括IL-2分子或其片段。如本文中所使用，「介白素2」、「IL-2」、「IL2」及「TCGF」(例如Genbank寄存編號：NM_000586及NP_000577(人類))皆係指結合於IL-2受體之細胞介素之成員。IL-2增強活化誘導之細胞死亡(AICD)。當初始T細胞亦受抗原刺激時，IL-2亦促進T細胞分化成效應T細胞及記憶T細胞，由此幫助身體抵抗感染。IL-2與其他細胞介素一起刺激原生CD4+ T細胞分化成Th1及Th2淋巴球且阻止分化成Th17及濾泡Th淋巴球。IL-2亦增加自然殺手細胞及細胞毒性T細胞之細胞殺傷活性。因此，不受任何特定操作理論約束，咸信IL-2可增加本文中所提供之TIL組合物之存活能力及/或抗腫瘤作用。

【0623】在一些實施例中，IL-2為人類IL-2。在一些實施例中，與經修飾之TIL結合之IL-2為全長IL-2、IL-2之片段或變異體。在一些實施例中，IL-2為人類IL-2或變異型人類IL-2。在例示性實施例中，IL-2為生物學活性人類IL-2變異體。在一些實施例中，IL-2與野生型IL-2相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個突變。

表 9 - IL-2 相關序列。

說明	胺基酸序列
人類 IL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSII STLT(SEQ ID NO:272)

【0624】在一些實施例中，TIL組合物包括免疫調節融合蛋白質或奈米粒子組合物，其包括IL-2或其生物活性變異體。包括IL-2之例示性融合蛋白質描繪於圖36及圖37中。

【0625】在例示性實施例中，本文中所提供之TIL組合物包括編碼包括IL-2之免疫調節融合蛋白質之核酸，其中核酸可操作地連接至NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子，如本文中所描述。

6. CD40促效劑

【0626】在一些實施例中，經修飾之TIL與CD40促效劑結合。在例示性實施例中，包括CD40促效劑作為如本文中所描述之免疫調節融合蛋白質(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之一部分。

【0627】分化叢集40，即CD40，為在抗原呈現細胞(APC)上發現之共刺激蛋白質且係APC活化所需的。T輔助細胞上之CD40L(CD154)與CD40之結合可活化抗原呈現細胞(例如，樹突狀細胞)及誘導各種下游作用。不受任何特定操作理論約束，咸信添加一或多種活化抗原呈現細胞上之CD40之免疫調節劑(亦即，CD40促效劑)可增強本文中

所提供之TIL組合物之抗腫瘤作用。CD40促效劑包括例如促效性結合CD40之CD40L及其抗體或抗體片段(例如scFV)。在一些實施例中，TIL組合物包括免疫調節融合蛋白質或奈米粒子組合物，其包括CD40L或其生物活性變異體。在一些實施例中，TIL組合物包括免疫調節融合蛋白質，其包括促效性抗CD40結合域(例如，scFv)。例示性CD40促效劑序列描繪於下表中。

【0628】可使用此項技術中已知的任何適合之方法量測CD40促效劑活性。舉例而言，DC上之CD40之接合可誘導增加之共刺激性及MHC分子之表面表現、促炎性細胞介素之產生及增強之T細胞觸發。休眠B細胞上之CD40接合可增加抗原呈現功能及增殖。在例示性實施例中，CD40促效劑能夠活化人類樹突狀細胞。

【0629】在一些實施例中，TIL組合物包括促效性抗CD40結合域，其具有表10中所描繪之抗CD40 scFv之VH及VL序列或其生物活性變異體。在一些實施例中，抗CD40結合域包括與表10中所描繪之VH序列至少約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致之VH序列。在一些實施例中，促效性抗CD40結合域包括與表10中所描繪之VH序列相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個胺基酸取代之VH序列。在一些實施例中，抗CD40結合域包括與表10中所描繪之VL序列至少約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%一致之VL序列。在一些實施例中，抗CD40結合域包括與表10中所描繪之VL序列相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個胺基酸取代之VL序列。在例示性實施例中，抗CD40結合域為選自表10中之SEQ ID NO:276、279、282及285之抗CD40 scFv。

【0630】在一些實施例中，抗CD40結合域為表10中之抗CD40 scFv之變異體，其能夠結合於人類CD40。在例示性實施例中，變異型抗CD40 scFv與選自表10中之SEQ ID NO:276、279、282及285之抗CD40 scFv至少約75%、80%、85%、90%、95%或99%一致。

【0631】可使用此項技術中已知的任何適合的分析法量測CD40結合域結合之評估，包括(但不限於)：Biacore、表面電漿子共振(SPR)及/或BLI(生物層干涉術，例如Octet分析法)分析法。

【0632】其他適用作免疫調節劑之CD40結合域(VH及VL)包括美國專利案第US 6,838,261號、第US 6,843,989號、第US 7,338,660號、第US 8,7778,345號中所描述之結合域，其以引用之方式併入本文中，尤其關於抗CD40抗體以及VH、VL及CDR序列之教示內容。

【0633】在一些實施例中，CD40促效劑為CD40配位體(CD40L)。在例示性實施例中，CD40L為人類CD40L(SEQ ID NO:270)。在一些實施例中，CD40L為人類CD40L之變異體，其與SEQ ID NO:253至少約75%、80%、

85%、90%、95%或99%一致。在一些實施例中，CD40L為人類CD40L之變異體，其與SEQ ID NO:273相比包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個胺基酸取代。

【0634】包括CD40促效劑之例示性融合蛋白質描繪於圖36及圖37中。

【0635】在例示性實施例中，本文中所提供之TIL組合物包括編碼包括CD40促效劑之免疫調節融合蛋白質之核酸，其中核酸可操作地連接至NFAT啟動子，如本文中所描述。

表10 - CD40促效劑相關序列。

說明	胺基酸序列
人類CD40L	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALF AVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLL NCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQI AAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQL TVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFE RILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVT DPSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO:273)
抗人類CD40 VH (索替加單抗)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQ APGKGLEWIACIYTGDGTNYSASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVS S(SEQ ID NO:274)
抗人類CD40 VL(索替加單抗)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKP GKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIK(SEQ ID NO:275)
抗人類CD40 scFv(索替加單抗)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQ APGKGLEWIACIYTGDGTNYSASWAKGRFTISKDSSKNTV YLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIG GGTKVEIK(SEQ ID NO:276)
抗人類CD40 VH(達西珠單抗)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAP GKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:277)

抗人類 CD40 VL(達西珠單抗)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHW YQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:278)
抗人類 CD40 scFv(達西珠單抗)	QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAP GKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR SSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQ GTKVEIK(SEQ ID NO:279)
抗 CD40 VH(魯卡珠單抗)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITL YLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVT VSS(SEQ ID NO:280)
抗 CD40 VL(魯卡珠單抗)	DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWY LQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR(SEQ ID NO:281)
抗 CD40 scFv(魯卡珠單抗)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITL YLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLTVTPG EPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGS NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQA RQTPFTFGPGTKVDIR(SEQ ID NO:282)
抗 CD40 VH(塞立路單抗)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFD YWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:283)
抗 CD40 VL(塞立路單抗)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKP GKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:284)
抗 CD40 scFv(塞立路單抗)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR QAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFD YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNL LIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQANIFPLTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:285)

IV. 基因編輯過程

A. 概述：TIL擴增+基因編輯+暫時基因編輯

【0636】在本發明之關於用於擴增TIL群體之方法之一些實施例中，該等方法包含一或多個基因編輯至少一部

分TIL以增強其治療作用之步驟。如本文中所使用，「基因編輯(gene-editing/gene editing)」及「基因體編輯」係指一種基因修飾，其中在細胞之基因體中永久性修飾DNA，例如在細胞之基因體內插入、缺失、修飾或置換DNA。在一些實施例中，基因編輯引起DNA序列之表現之緘默(有時稱為基因剔除)或抑制/降低(有時稱為基因減弱)。在其他實施例中，基因編輯引起DNA序列之表現之增強(例如，藉由引起過表現)。根據本發明之實施例，使用基因編輯技術以增強治療性TIL群之有效性。

【0637】可根據本文中所描述之方法(例如，稱為方法2A之例示性TIL擴增方法描述於下文中)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法進一步包含基因編輯至少一部分TIL。根據其他實施例，根據美國專利案第10,517,894號、美國專利申請公開案第2020/0121719 A1號或美國專利案第10,894,063號中所描述之方法之任何實施例進行用於將TIL擴增成治療性TIL群體之方法，該等文獻以全文引用之方式併入本文中，其中該方法進一步包含基因編輯至少一部分TIL。因此，本發明之一些實施例提供已根據本文中所描述之任何實施例擴增之治療性TIL群體，其中至少一部分治療性群體已經基因編輯，例如至少一部分轉移至輸注袋之治療性TIL群體經永久性基因編輯。

【0638】在本發明之關於用於擴增TIL群體之方法之一些實施例中，方法包含一或多個將用於免疫調節蛋白質

(例如，包含與膜錨融合之免疫調節蛋白質之免疫調節融合蛋白質)之暫時表現之核酸(例如，mRNA)引入至少一部分TIL中之步驟，以產生滿足以下條件之經修飾之TIL：(i)當在培養物中擴增時，對細胞介素之依賴性降低，及/或(ii)增強之治療作用。如本文中所使用，「暫時基因編輯(transient gene-editing/transient gene editing)」、「暫時表現型變化」、「暫時表現型修飾」、「暫時性表現型變化」、「暫時性表現型修飾」、「暫時細胞變化」、「暫時細胞修飾」、「暫時性細胞變化」、「暫時性細胞修飾」、「暫時表現」、「表現之暫時變化」、「蛋白質表現之暫時變化」、「暫時修飾」、「短暫表現型變化」、「非永久性表現型變化」、「暫時修飾」、「暫時性修飾」、「非永久性修飾」、「暫時改變」、「暫時改變」、前述中之任一者之語法變化形式及具有類似含義之任何表述係指一種細胞修飾或表現型變化，其中將核酸(例如，mRNA)引入細胞中，諸如藉由電致孔、磷酸鈣轉染、病毒轉導等將核酸轉移至細胞中，且在細胞中表現(例如，免疫調節蛋白質，諸如包含與膜錨融合之免疫調節蛋白質之免疫調節融合蛋白質之表現)，以在細胞中實現暫時或非永久性表現型變化，諸如細胞表面上之膜錨定之免疫調節融合蛋白質之暫時呈現。根據本發明之實施例，使用暫時表現型變化技術以降低在TIL擴增時對培養物中之細胞介素之依賴性及/或增強治療性TIL群體之有效性。

【0639】在一些實施例中，使用微流體平台進行本文中所提供之編碼融合蛋白質之核酸之細胞內遞送。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。SQZ平台能夠將核酸及蛋白質遞送至各種初代人類細胞，包括T細胞(Sharei等人，《美國國家科學院院刊(PNAS)》2013，以及Sharei等人，《科學公共圖書館綜合卷(PLOS ONE)》 2015及Greisbeck等人，《免疫學雜誌》，第195卷，2015)。在SQZ平台中，藉由微流體收縮來暫時破壞用於修飾之細胞(例如，TIL)之細胞膜，藉此實現將編碼免疫調節融合蛋白質之核酸遞送至細胞中。如國際專利申請公開案第WO 2013/059343A1號、第WO 2017/008063A1號或第WO 2017/123663A1號或美國專利申請公開案第US 2014/0287509A1號、第US 2018/0201889A1號或第US 2018/0245089A1號中所描述之此類方法可用於本發明中以將編碼本發明之免疫調節融合蛋白質之核酸遞送至TIL群體。在一些實施例中，所遞送之核酸實現經修飾之TIL中之免疫調節融合蛋白質之暫時蛋白質表現。在一些實施例中，使用SQZ平台將所遞送之編碼免疫調節融合蛋白質之核酸穩定地併入TIL細胞基因體中。

【0640】在本發明之一些實施例中，轉位子/轉位酶系統係用於遞送基因編輯系統及暫時改變蛋白質表現。在一些實施例中，轉位子/轉位酶系統包含piggyBac轉位子及轉位酶或piggyBac樣轉位子及轉位酶；睡美人(SB)轉位子及轉位酶；或Helraiser轉位子及轉位酶。在一些實施例

中，轉位子/轉位酶系統(例如，piggyBac轉位子及轉位酶或piggyBac樣轉位子及轉位酶；睡美人(SB)轉位子及轉位酶；或Helraiser轉位子及轉位酶)用於表現本文中所提供之免疫調節融合蛋白質中之任一者(例如，膜錨定之免疫調節融合蛋白質)，以及改變免疫檢查點基因之表現。在一些實施例中，免疫檢查點為以下中之一者：PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

B. 在TIL擴增期間之基因編輯/暫時表現型變化之時序

【0641】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片

段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3(例如，OKT-3可在擴增過程之開始日開始存在於培養基中)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約3-14天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-14天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(c)至步驟(d) 之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至輸注袋之前的方法期間之任何時間，基因編輯至少一部分TIL細胞以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之

免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、

GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0642】如上文所描述的實施例之步驟(g)中所述，可在步驟(f)中之轉移至輸注袋之前的TIL擴增方法期間之任何時間進行基因編輯過程，其意謂可在擴增方法中之任何步驟之前、期間或之後對TIL進行基因編輯；舉例而言，在以上方法中所概述之步驟(a)-(f)中之任一者期間或在以上方法中所概述之步驟(a)-(e)中之任一者之前或之後。根據某些實施例，在擴增方法期間收集TIL(例如，對至少一部分TIL「暫停」擴增方法)且對所收集之TIL進行基因編輯過程，且在一些情況下，接著再引入回擴增方法中(例如，引入回培養基中)以繼續擴增過程，使得至少一部分最終轉移至輸注袋之治療性TIL群體經永久性基因編輯。在一些實施例中，可藉由活化TIL、對經活化之TIL進行基因編輯步驟及根據本文中所描述之方法擴增經基因編輯之TIL來在擴增之前進行基因編輯過程。在一些實施例中，使用微流體平台將用於基因編輯之核酸遞送至TIL。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0643】在一些實施例中，在第一TIL擴增步驟之後進行基因編輯過程。在一些實施例中，在第一TIL擴增步驟之後及在第二擴增步驟之前進行基因編輯過程。在一些實施例中，在TIL活化之後進行基因編輯過程。在一些實

施例中，在第一擴增步驟之後及在TIL活化之後，但在第二擴增步驟之前進行基因編輯過程。在一些實施例中，在第一擴增步驟之後及在TIL活化之後進行基因編輯過程，且在基因編輯之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置。在一些實施例中，在基因編輯之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置約1至2天。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑及抗CD28促效劑來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑為抗CD3促效劑抗體且抗CD28促效劑為抗CD28促效劑抗體。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體為OKT-3。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒為Miltenyi之TransAct™產品。在一些實施例中，藉由病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由反轉錄病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由慢病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，免疫調節組合物為膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-15。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-21。在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜結合之融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節組合物包含有包含IL-15之第一免疫調節蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現免疫調節組合物。在一些實施例中，

TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-21之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之第一免疫調節融合蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。

【0644】在一些實施例中，藉由病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由反轉錄病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由慢病毒轉導來進行基因編輯過程。

【0645】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3(例如，OKT-3可在擴增過程之開始日開始存在於培養基中)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約3-14天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 基因編輯第二TIL群體中之至少一部分TIL細胞以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所

描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。

(e) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-14天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(f) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例

如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置約1至2天。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑及抗CD28促效劑來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑為抗CD3促效劑抗體且抗CD28促效劑為抗CD28促效劑抗體。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體為OKT-3。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒來活化

TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒為Miltenyi之TransAct™產品。在一些實施例中，藉由病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由TIL之反轉錄病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，藉由TIL之慢病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，免疫調節組合物為膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-15。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-21。在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜結合之融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節組合物包含有包含IL-15之第一免疫調節蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現免疫調節組合物。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-21之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之第一免疫調節融合蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。

【0646】應注意，擴增過程之替代性實施例可與以上展示之方法不同；例如，替代性實施例可能不具有相同步驟(a)-(g)，可能具有不同數目之步驟。與特定實施例無關，可在TIL擴增方法期間的任何時間進行基因編輯過

程。舉例而言，替代性實施例可包括超過兩次擴增，且有可能在第三或第四擴增等期間對TIL進行基因編輯。

【0647】根據其他實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3(例如，OKT-3可在擴增過程之開始日開始存在於培養基中)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約3-14天以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7-14天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其

中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至輸注袋之前的方法期間之任何時間將暫時表現型變化引入至少一部分TIL細胞中以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、

CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台將用於暫時表現型變化之核酸遞送至TIL。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0648】如上文所描述的實施例之步驟(g)中所述，可在步驟(f)中之轉移輸注袋之前的TIL擴增方法期間之任何時間進行暫時表現型變化過程，其意謂可在擴增方法中之任何步驟之前、期間或之後對TIL進行暫時表現型變化；舉例而言，在以上方法中所概述之步驟(a)-(f)中之任一者期間或在以上方法中所概述之步驟(a)-(e)中之任一者之前或之後。根據某些實施例，在擴增方法期間收集TIL(例如，對至少一部分TIL「暫停」擴增方法)且對所收集之TIL進行暫時修飾過程，且在一些情況下，接著再引入回擴增方法中(例如，引入回培養基中)以繼續擴增過程，使得至少一部分最終轉移至輸注袋中之治療性TIL群體經暫時改變以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑

(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，可藉由活化TIL、對經活化之TIL進行暫時表現型變化步驟及根據本文中所描述之方法擴增經修飾之TIL來在擴增之前進行暫時細胞修飾過程。

【0649】應注意，擴增過程之替代性實施例可與以上展示之方法不同；例如，替代性實施例可能不具有相同步驟(a)-(g)，可能具有不同數目之步驟。與特定實施例無關，可在TIL擴增方法期間的任何時間進行暫時細胞修飾過程。舉例而言，替代性實施例可包括超過兩次擴增，且有可能在第三或第四擴增等期間對TIL進行暫時細胞修飾過程。

【0650】根據一些實施例，對來自第一群體、第二群體及第三群體中之一或多者之TIL進行基因編輯過程。舉例而言，可對第一TIL群體或來自第一群體之所收集之TIL之一部分進行基因編輯，且在基因編輯過程之後，可接著將此等TIL置放回擴增過程中(例如，置放回培養基中)。或者，可對來自第二或第三群體之TIL或分別來自第二或第三群體之所收集之TIL之一部分進行基因編輯，且在基因編輯過程之後，可接著將此等TIL置放回擴增過程中(例如，置放回培養基中)。根據其他實施例，在TIL仍位於培養基中時及在擴增正在進行時進行基因編輯，亦即，無需自擴增「移出」TIL即可進行基因編輯。

【0651】根據一些實施例，對來自第一群體、第二群體及第三群體中之一或多者之TIL進行暫時細胞修飾過程。舉例而言，可對第一TIL群體或來自第一群體之所收集之TIL之一部分進行暫時細胞修飾，且在基因編輯過程之後，可接著將此等經暫時修飾之TIL置放回擴增過程中(例如，置放回培養基中)。或者，可對來自第二或第三群體之TIL或分別來自第二或第三群體之所收集之TIL之一部分進行暫時細胞修飾，且在暫時細胞修飾過程之後，可接著將此等經修飾之TIL置放回擴增過程中(例如，置放回培養基中)。根據其他實施例，在TIL仍位於培養基中時及在擴增正在進行時進行暫時細胞修飾，亦即，無需自擴增「移出」TIL即可實現暫時細胞修飾。

【0652】根據其他實施例，對來自第一擴增之TIL或來自第二擴增之TIL或其兩者進行基因編輯過程。舉例而言，在第一擴增或第二擴增期間，可對自培養基收集之TIL進行基因編輯且在基因編輯過程之後，可接著將此等TIL置放回擴增方法中，例如藉由將其再引入回培養基中。

【0653】根據其他實施例，對來自第一擴增之TIL或來自第二擴增之TIL或其兩者進行暫時細胞修飾過程。舉例而言，在第一擴增或第二擴增期間，可對自培養基收集之TIL進行暫時細胞修飾且在暫時細胞修飾過程之後，可接著將此等經修飾之TIL置放回擴增方法中，例如藉由將其再引入回培養基中。

【0654】根據其他實施例，在第一擴增之後且在第二擴增之前對至少一部分TIL進行基因編輯過程。舉例而言，在第一擴增之後，可對自培養基收集之TIL進行基因編輯，且在基因編輯過程後，可接著將此等TIL置放回擴增方法中(例如藉由將其再引入回培養基中)以進行第二擴增。

【0655】根據其他實施例，在第一擴增之後且在第二擴增之前對至少一部分TIL進行暫時細胞修飾過程。舉例而言，在第一擴增之後，可對自培養基收集之TIL進行暫時細胞修飾，且在暫時細胞修飾過程後，可接著將此等經修飾之TIL置放回擴增方法中(例如藉由將其再引入回培養基中)以進行第二擴增。

【0656】根據替代性實施例，在步驟(c)之前(例如，在步驟(a)-(b)中之任一者之前、期間或之後)、在步驟(d)之前(例如，在步驟(a)-(c)中之任一者之前、期間或之後)、在步驟(e)之前(例如，在步驟(a)-(d)之前、期間或之後)或在步驟(f)之前(例如，在步驟(a)-(e)中之任一者之前、期間或之後)進行基因編輯過程。

【0657】根據替代性實施例，在步驟(c)之前(例如，在步驟(a)-(b)中之任一者之前、期間或之後)、在步驟(d)之前(例如，在步驟(a)-(c)中之任一者之前、期間或之後)、在步驟(e)之前(例如，在步驟(a)-(d)之前、期間或之後)或在步驟(f)之前(例如，在步驟(a)-(e)中之任一者之前、期間或之後)進行暫時細胞修飾過程。

【0658】應注意，關於OKT-3，根據某些實施例，細胞培養基可在第一擴增之開始日(第0天)或第1天開始包含OKT-3，使得在第0天及/或第1天，在TIL已暴露於細胞培養基中之OKT-3之後對其進行基因編輯或暫時細胞修飾。根據其他實施例，細胞培養基在第一擴增期間及/或在第二擴增期間包含OKT-3，且在將OKT-3引入細胞培養基中之前進行基因編輯或暫時細胞修飾。或者，細胞培養基可在第一擴增期間及/或在第二擴增期間包含OKT-3，且在將OKT-3引入細胞培養基中之後進行基因編輯或暫時細胞修飾。

【0659】亦應注意，關於4-1BB促效劑，根據某些實施例，細胞培養基可在第一擴增之開始日(第0天)或第1天開始包含4-1BB促效劑，使得在第0天及/或第1天，在TIL已暴露於細胞培養基中之4-1BB促效劑之後對其進行基因編輯或暫時細胞修飾。根據其他實施例，細胞培養基在第一擴增期間及/或在第二擴增期間包含4-1BB促效劑，且在將4-1BB促效劑引入細胞培養基中之前進行基因編輯或暫時細胞修飾。或者，細胞培養基可在第一擴增期間及/或在第二擴增期間包含4-1BB，且在將4-1BB引入細胞培養基中之後進行基因編輯或暫時細胞修飾。

【0660】亦應注意，關於IL-2，根據某些實施例，細胞培養基可在第一擴增之開始日(第0天)或第1天開始包含IL-2，使得在第0天及/或第1天，在TIL已暴露於細胞培養基中之IL-2之後對其進行基因編輯或暫時細胞修飾。根據

其他實施例，細胞培養基在第一擴增期間及/或在第二擴增期間包含IL-2，且在將IL-2引入細胞培養基中之前進行基因編輯或暫時細胞修飾。或者，細胞培養基可在第一擴增期間及/或在第二擴增期間包含IL-2，且在將IL-2引入細胞培養基中之後進行基因編輯或暫時細胞修飾。

【0661】如上文所論述，細胞培養基可在第一擴增之第0天或第1天開始包括OKT-3、4-1BB促效劑及IL-2中之一或多者。根據一些實施例，細胞培養基在第一擴增之第0天或第1天開始包括OKT-3，及/或細胞培養基在第一擴增之第0天或第1天開始包括4-1BB促效劑，及/或細胞培養基在第一擴增之第0天或第1天開始包括IL-2。根據其他實例，細胞培養基在第一擴增之第0天或第1天開始包含OKT-3及4-1BB促效劑。根據其他實例，細胞培養基在第一擴增之第0天或第1天開始包含OKT-3、4-1BB促效劑及IL-2。當然，可在擴增過程期間之一或多個其他時間點將OKT-3、4-1BB促效劑及IL-2中之一或多者添加至細胞培養基中，如本文中所描述的各種實施例中所闡述。

【0662】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中

在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至2天來活化第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 基因編輯第二TIL群體中之至少一部分TIL細胞以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現；

(f) 視情況將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-

7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、

PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置約1至2天。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑及抗CD28促效劑約2天來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑為抗CD3促效劑抗體且抗CD28促效劑為抗CD28促效劑抗體。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體為OKT-3。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒為Miltenyi之TransAct™產品。在一些實施例中，藉由病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由TIL之反轉錄病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，藉由TIL之慢病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，免疫調節組合物為膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-15。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-21。在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜結合之融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節組合物包含有包含IL-15之第一免疫調節蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現免疫調節組合物。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15

之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-21之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之第一免疫調節融合蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。

【0663】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其

中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例

中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0664】根據其他實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行，

其中將至少一種核酸分子無菌電致孔至第二TIL群體

之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0665】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少

一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、

IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、

PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0666】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收

集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行，

其中遞送至第二TIL群體之一部分細胞中之該至少一種基因編輯器調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與

TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0667】根據其他實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來

進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行，

其中遞送至第二TIL群體之一部分細胞中之該至少一種核酸分子調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組

合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0668】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少

一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；及

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行，

其中遞送至第二TIL群體之一部分細胞中之該至少一種基因編輯器調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、

IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、

PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0669】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調

節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、

ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0670】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 基因編輯第二TIL群體中之至少一部分TIL細胞以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0671】在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之

前將TIL靜置約1至2天。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑及抗CD28促效劑約2天來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑為抗CD3促效劑抗體且抗CD28促效劑為抗CD28促效劑抗體。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體為OKT-3。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒為Miltenyi之TransAct™產品。在一些實施例中，藉由病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由TIL之反轉錄病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，藉由TIL之慢病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，免疫調節組合物為膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-15。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-21。在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜結合之融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節組合物包含有包含IL-15之第一免疫調節蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現免疫調節組合物。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-21之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟

動子之控制下表現包含IL-15之第一免疫調節融合蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。

【0672】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中遞送至第三TIL群體之一部分細胞中之該至少一種核酸分子調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係

選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0673】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(e) 基因編輯第二TIL群體中之至少一部分TIL細胞以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0674】在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合

域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，在

基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置。在一些實施例中，在基因編輯步驟之後及在第二擴增步驟之前將TIL靜置約1至2天。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑及抗CD28促效劑約2天來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑為抗CD3促效劑抗體且抗CD28促效劑為抗CD28促效劑抗體。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體為OKT-3。在一些實施例中，藉由暴露於抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒來活化TIL。在一些實施例中，抗CD3促效劑抗體及抗CD28促效劑抗體結合之珠粒為Miltenyi之TransAct™產品。在一些實施例中，藉由病毒轉導來進行基因編輯過程。在一些實施例中，藉由TIL之反轉錄病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，藉由TIL之慢病毒轉導來進行基因編輯過程，視情況進行約2天。在一些實施例中，免疫調節組合物為膜錨定之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-15。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含IL-21。在一些實施例中，免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜結合之融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節組合物包含有包含IL-15之第一免疫調節蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現免疫調節組合物。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編

輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-21之免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，TIL經基因編輯以在NFAT啟動子之控制下表現包含IL-15之第一免疫調節融合蛋白質及包含IL-21之第二免疫調節融合蛋白質。

【0675】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(e) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性

基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、

ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中

【0676】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(e) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中遞送至第三TIL群體之一部分細胞中之該至少一種核酸分子調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述

之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、

ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0677】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融

合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、

ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0678】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免

疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0679】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(e) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii)RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、

CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0680】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(e) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以暫時表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、

TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0681】在一些實施例中，修改任何前述方法，使得由以下步驟置換培養第四TIL群體之步驟：

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約1-7天，以產生第五TIL群體之培養物；及

(g) 使第五TIL群體之培養物分裂成複數個繼代培養物，在包含IL-2之第三細胞培養基中培養該複數個繼代培養物中之每一者約3-7天，及合併該複數個繼代培養物以得到將擴增之數目之TIL。

【0682】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約1天、2天、3天、4天、5天、6天

或7天。

【0683】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約2-7天。

【0684】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約3-7天。

【0685】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約4-7天。

【0686】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約5-7天。

【0687】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約6-7天。

【0688】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約1-6天。

【0689】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約1-5天。

【0690】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第

二TIL群體之步驟進行約1-4天。

【0691】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約1-3天。

【0692】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約1-2天。

【0693】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約2-6天。

【0694】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約3-6天。

【0695】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約4-6天。

【0696】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約5-6天。

【0697】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約3-5天。

【0698】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第

二TIL群體之步驟進行約3-4天。

【0699】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約2-5天。

【0700】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約2-4天。

【0701】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約2-3天。

【0702】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約4-5天。

【0703】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約1天。

【0704】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約2天。

【0705】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約3天。

【0706】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第

二TIL群體之步驟進行約4天。

【0707】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約5天。

【0708】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約6天。

【0709】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化第二TIL群體之步驟進行約7天。

【0710】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(d) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表

現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、

IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0711】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(d) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-

10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、

PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0712】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，細胞介素係

選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，內源性基因編碼免疫檢查點。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0713】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴

增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子無菌電致孔至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以暫時表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中免疫檢查點之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效

劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0714】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤

組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(d) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、

TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0715】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(d) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內

源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0716】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少

一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、

TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0717】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中，以產生第三TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第三TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子轉移至第二TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以暫時表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii)RNA分子(例如，shRNA)以抑制細胞中免疫檢查點之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、

TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0718】在一些實施例中，培養第三TIL群體之步驟係藉由以下來進行：將第三TIL群體在第二細胞培養基中培養約1-7天之第一時段，在第一時段結束時，將培養物拆分成複數個繼代培養物，將該複數個繼代培養物中之每一者在包含IL-2之第三培養基中培養約3-7天之第二時段，且在第二時段結束時，合併該複數個繼代培養物以得到經擴增之數目之TIL。

【0719】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3天、4天、5

天、6天、7天、8天、9天、10天或11天。

【0720】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-11天。

【0721】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-11天。

【0722】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-11天。

【0723】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7-11天。

【0724】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約8-11天。

【0725】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約9-11天。

【0726】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約10-11天。

【0727】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第

一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-10天。

【0728】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-10天。

【0729】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-10天。

【0730】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7-10天。

【0731】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約8-10天。

【0732】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約9-10天。

【0733】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4-9天。

【0734】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約5-9天。

【0735】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一

細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約6-9天。

【0736】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約7-9天。

【0737】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約8-9天。

【0738】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3-8天。

【0739】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3-7天。

【0740】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3-6天。

【0741】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3-5天。

【0742】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3-4天。

【0743】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一

細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4-8天。

【0744】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4-7天。

【0745】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4-6天。

【0746】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4-6天。

【0747】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約5-8天。

【0748】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約5-7天。

【0749】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約5-6天。

【0750】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約6-8天。

【0751】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一

細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約6-7天。

【0752】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約7-8天。

【0753】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4-5天。

【0754】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約3天。

【0755】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約4天。

【0756】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約5天。

【0757】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約6天。

【0758】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約7天。

【0759】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一

細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約8天。

【0760】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約9天。

【0761】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約10天。

【0762】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第一細胞培養基中培養第一TIL群體之步驟進行約11天。

【0763】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(d) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、

PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0764】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(d) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴

增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以暫時表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中免疫檢查點之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、

CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0765】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(d) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(e) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴

增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、

CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0766】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(d) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(e) 對第三TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴

增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子無菌電致孔至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以暫時表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中免疫檢查點之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、

CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0767】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(d) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、

CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0768】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(c) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(d) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(e) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴

增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以在細胞表面上暫時表現免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、

SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0769】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(d) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(e) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種基因編輯器轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以表現：i)細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制細胞中內源性基因之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、

CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0770】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3天，以產生第二TIL群體；

(d) 在包含IL-2及OKT-3之第二細胞培養基中培養第二TIL群體2-4天，以產生第三TIL群體；

(e) 暫時破壞第三TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中，以產生第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第

三細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL，

其中將至少一種核酸分子轉移至第三TIL群體之一部分細胞中可調節該部分中之複數個細胞，以暫時表現：i) TIL細胞表面上包含免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)之免疫調節組合物，及/或ii) RNA分子(例如，shRNA)以抑制TIL細胞中免疫檢查點之表現。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫檢查點係選自PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，內源性基因係選自PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、

HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第二TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0771】在一些實施例中，培養第四TIL群體之步驟係藉由以下來進行：將第四TIL群體在第三細胞培養基中培養約1-7天之第一時段，在第一時段結束時，將培養物拆分成複數個繼代培養物，將該複數個繼代培養物中之每一者在包含IL-2之第四培養基中培養約3-7天之第二時段，且在第二時段結束時，合併該複數個繼代培養物以得到經擴增之數目之TIL。

【0772】在一些實施例中，在第一培養基中培養第一TIL群體之步驟中，第一培養基進一步包含抗CD3及抗

CD28珠粒或抗體。

【0773】在一些實施例中，抗CD3及抗CD28珠粒或抗體包含第一培養基中之OKT-3。

【0774】在一些實施例中，在第二培養基中培養第二TIL群體之步驟中，第二培養基進一步包含抗CD3及抗CD28珠粒或抗體。

【0775】在一些實施例中，抗CD3及抗CD28珠粒或抗體包含第二培養基中之OKT-3。

【0776】根據一些實施例，前述方法進一步包含使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體。在一些實施例中，冷凍保存介質為基於二甲亞碸之冷凍保存介質。在其他實施例中，冷凍保存介質為CS10。

【0777】在一些實施例中，本發明提供在適當時經修改之以上任何前述段落中所描述之方法，使得在第二培養基中培養第二TIL群體之步驟進行約2-3天。

【0778】在一些實施例中，本發明提供在適當時經修改之以上任何前述段落中所描述之方法，使得在第二培養基中培養第二TIL群體之步驟進行約3-4天。

【0779】在一些實施例中，本發明提供在適當時經修改之以上任何前述段落中所描述之方法，使得在第二培養基中培養第二TIL群體之步驟進行約2天。

【0780】在一些實施例中，本發明提供在適當時經修改之以上任何前述段落中所描述之方法，使得在第二培養基中培養第二TIL群體之步驟進行約3天。

【0781】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二培養基中培養第二TIL群體之步驟進行約4天。

【0782】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在適當時，在可適用的第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或15天。

【0783】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-15天。

【0784】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-15天。

【0785】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-15天。

【0786】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9-15天。

【0787】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約10-15天。

【0788】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約11-15天。

【0789】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約12-15天。

【0790】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約13-15天。

【0791】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約14-15天。

【0792】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-14天。

【0793】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-14天。

【0794】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-14天。

【0795】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-14天。

【0796】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9-14天。

【0797】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約10-14天。

【0798】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約11-14天。

【0799】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約12-14天。

【0800】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約13-14天。

【0801】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-13天。

【0802】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-12天。

【0803】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-11天。

【0804】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-10天。

【0805】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-9天。

【0806】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-8天。

【0807】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-7天。

【0808】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5-6天。

【0809】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-13天。

【0810】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-12天。

【0811】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-11天。

【0812】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-10天。

【0813】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-9天。

【0814】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-8天。

【0815】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6-7天。

【0816】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-13天。

【0817】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-12天。

【0818】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-11天。

【0819】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-10天。

【0820】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-9天。

【0821】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7-8天。

【0822】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-13天。

【0823】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-12天。

【0824】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-11天。

【0825】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-10天。

【0826】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8-9天。

【0827】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9-13天。

【0828】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9-12天。

【0829】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9-11天。

【0830】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9-10天。

【0831】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約10-13天。

【0832】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約10-12天。

【0833】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約10-11天。

【0834】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約11-13天。

【0835】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約11-12天。

【0836】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約12-13天。

【0837】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約5天。

【0838】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約6天。

【0839】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約7天。

【0840】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約8天。

【0841】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約9天。

【0842】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約10天。

【0843】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約11天。

【0844】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約12天。

【0845】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約13天。

【0846】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約14天。

【0847】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得在第二或第三細胞培養基中培養第三或第四TIL群體之步驟進行約15天。

【0848】根據一些實施例，可使用任何前述方法提供自體收集之TIL群體以用於治療患有癌症之人類個體。

C. 暫時細胞修飾

【0849】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL在擴增步驟之前、期間或之後，包括在密閉無菌製造過程期間(各者如本文所提供)經進一步操作，以用暫時性方式改變蛋白質表現。在一些實施例中，本發明包括經由核苷酸插入，諸如經由核糖核酸(RNA)插入，包括插入信使RNA(mRNA)至TIL群體中來進行暫時細胞修飾，以促進一或多種蛋白質之表現或抑制一或多種蛋白質之表現以及同時促進一組蛋白質與抑制另一組蛋白質之組合。

【0850】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL經歷暫時改變蛋白質表現。在一些實施例中，在第一次擴增之前，在主體TIL群體中發生蛋白質表現之暫時變化。在一些實施例中，在第一擴增之後發生蛋白質表現之暫時變化。在一些實施例中，在第二擴增之前，在主體TIL群體中發生蛋白質表現之暫時變化。在一些實施例中，在第二擴增之後發生蛋白質表現之暫時變化。

【0851】在一些實施例中，蛋白質表現之暫時變化引

起免疫調節組合物之暫時表現。在一些實施例中，免疫調節組合物為免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含與免疫調節劑融合之膜錨。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。在一些實施例中，免疫調節劑為選自由以下組成之群之介白素：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑為選自由以下組成之群的介白素：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【0852】如本文中所論述，本發明之實施例提供腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，其已經由蛋白質表現之暫時變化而經暫時修飾以增強其治療作用。本發明之實施例涵蓋經由將核苷酸(例如RNA)插入TIL群體中以用於免疫調節組合物之表現來進行暫時修飾。本發明之實施例亦提供用於將TIL擴增成治療性群體之方法，其中該等方法包含暫時修飾TIL。存在若干種可用於暫時修飾TIL群體之基因編輯技術，該等基因編輯技術適合於根據本發明使用。

【0853】在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括使TIL與編碼免疫調節組合物之核酸(例如mRNA)接觸，且接著對細胞進行電致孔步驟。電致

孔方法為此項技術中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物物理雜誌》1991, 60, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。可使用此項技術中已知之其他電致孔方法，諸如以下中描述之彼等電致孔方法：美國專利案第5,019,034號、第5,128,257號、第5,137,817號、第5,173,158號、第5,232,856號、第5,273,525號、第5,304,120號、第5,318,514號、第6,010,613號及第6,078,490號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，電致孔方法為無菌電致孔方法。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操

作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以誘導TIL中孔形成之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同，使得所誘導的孔持續相對長的時段，及使

得維持TIL之存活率。

【0854】在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣核酸沈澱、細胞表面塗佈及內飲作用)為此項技術中已知的且描述於Graham及van der Eb, 《病毒學(*Virology*)》 1973, *52*, 456-467；Wigler等人, 《美國國家科學院院刊》 1979, *76*, 1373-1376；以及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學(*Mol. Cell. Biol.*)》 1987, *7*, 2745-2752；及美國專利案第5,593,875號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-n,*n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:1(w/w)脂質體調配物之方法為此項技術中已知的且描述於Rose等人, 《生物技術》 **1991**, *10*, 520-525及Felgner等人, 《美國國家科學院院刊》, **1987**, *84*, 7413-7417以及美國專利案第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括使用以下中描述之方法之轉染步驟：美國專利案第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994 號及第7,189,705號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。TIL可為如本文中所描

述之第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【0855】在一些實施例中，使用SQZ無載體微流體平台進行暫時改變蛋白質表現。參見例如國際專利申請公開案第WO 2013/059343A1號、第WO 2017/008063A1號或第WO 2017/123663A1號或美國專利申請公開案第US 2014/0287509A1號、第US 2018/0201889A1號或第US 2018/0245089A1號，其皆以全文引用之方式併入本文中且尤其關於用於核酸遞送之微流體平台之揭示內容。在SQZ平台中，藉由微流體收縮來暫時破壞用於修飾之TIL之細胞膜，藉此實現遞送編碼經暫時表現之蛋白質之核酸。TIL可為如本文中所描述之第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【0856】在本發明之一些實施例中，轉位子/轉位酶系統用於暫時改變蛋白質表現。在一些實施例中，轉位子/轉位酶系統包含piggyBac轉位子及轉位酶或piggyBac樣轉位子及轉位酶；睡美人(SB)轉位子及轉位酶；或Helraiser轉位子及轉位酶。

D. 免疫檢查點

【0857】根據本發明之特定實施例，TIL群體經基因編輯以在TIL群體中之TIL細胞之細胞表面表現一或多種免疫調節組合物及基因修飾TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因。換言之，除用於在細胞表面表現一或多種免疫調節組合物之TIL群體之修飾以外，TIL內之編碼TIL之一或

多個免疫檢查點之DNA序列在TIL之基因體中經永久性修飾，例如插入、缺失或置換，或經暫時性修飾。免疫檢查點為由淋巴球表現之分子，其經由抑制性或刺激性路徑來調節免疫反應。在癌症之情況下，免疫檢查點路徑通常經活化以抑制抗腫瘤反應，亦即，由惡性細胞進行之某些免疫檢查點之表現抑制抗腫瘤免疫性且有利於癌細胞生長。參見例如Marin-Acevedo等人，《血液學及腫瘤學雜誌(*Journal of Hematology & Oncology*)》(2018) 11:39。因此，某些抑制性檢查點分子充當本發明之免疫療法之目標。根據特定實施例，TIL經基因編輯以阻斷或刺激某些免疫檢查點路徑且藉此增強身體對抗腫瘤之免疫活性。

【0858】如本文中所使用，免疫檢查點基因包含編碼免疫檢查點分子之DNA序列。根據本發明之特定實施例，在TIL擴增方法期間基因編輯TIL可引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現緘默或減少。舉例而言，基因編輯可引起抑制性受體(諸如PD-1或CTLA-4)之表現緘默或減少，從而增強免疫反應。

【0859】最廣泛研究之檢查點包括計劃性細胞死亡受體-1(PD-1)及細胞毒性T淋巴球相關分子-4(CTLA-4)，其為免疫細胞上之抑制性受體，其在與抑制性配位體相互作用時抑制重要效應功能(例如，活化、增殖、細胞介素釋放、細胞毒性等)。除PD-1及CTLA-4以外，許多檢查點分子已成為免疫療法之潛在目標，如下文中更詳細地論述。

【0860】可藉由永久性基因編輯本發明之TIL而緘默

或抑制之免疫檢查點基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、BAFF(BR3)、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。舉例而言，可在本發明之TIL中緘默或抑制之免疫檢查點基因可選自包含以下之群：PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、Cish、CBL-B、TIGIT、TET2、TGFβ及PKA。BAFF(BR3)描述於正在出版中之Bloom等人，《免疫療法雜誌(*J. Immunother.*)》，**2018**中。根據另一實例，可在本發明之TIL中緘默或抑制之免疫檢查點基因可選自包含以下之群：PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。

【0861】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之第三TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之

TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)系統、轉錄活化因子樣效應子(TALE)系統、鋅指系統、Cas-CLOVER系統或shRNA系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現及抑制選自由以下組成之群的分子之表現：PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

1. PD-1

【0862】針對誘導檢查點阻斷而研究最多的目標之一為計劃性死亡受體(PD1或PD-1，亦稱為PDCD1)，其為T細胞調節劑之CD28超家族之成員。其配位體PD-L1及PD-L2表現於各種腫瘤細胞(包括黑色素瘤)上。PD-1與PD-L1之相互作用可抑制T細胞效應功能，引起慢性刺激環境下之T

細胞耗竭且誘導腫瘤微環境中之T細胞凋亡。PD1亦可在腫瘤特異性逃避免疫監視中起作用。

【0863】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之PD1之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含藉由緘默化或抑制PD1之表現來基因編輯至少一部分TIL。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可涉及使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如PD1)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法使TIL中之PD1之表現緘默或減少。

2. CTLA-4

【0864】CTLA-4表現係在經活化之T細胞上之T細胞活化時被誘導且與抗原呈現細胞活化抗原CD80及CD86競爭結合。CTLA-4與CD80或CD86之相互作用可引起T細胞抑制且用於維持免疫反應之平衡。然而，抑制CTLA-4與CD80或CD86之相互作用可延長T細胞活化且因此提高針對癌症抗原之免疫反應之水準。

【0865】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之CTLA-4之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34

及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物以及緘默化或抑制TIL中之CTLA-4之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如CTLA-4)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之CTLA-4之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

3. LAG-3

【0866】在II類主要組織相容複合物(MHC)接合之後，由T細胞及自然殺手(NK)細胞表現淋巴球活化基因-3(LAG-3，CD223)。儘管機制尚不明確，但對其進行調節可引起對T細胞功能之負調節作用，防止組織損傷及自體免疫。LAG-3及PD-1通常在TIL上共表現及上調，引起免疫耗竭及腫瘤生長。因此，LAG-3阻斷可改良抗腫瘤反應。參見例如Marin-Acevedo等人，《血液學及腫瘤學雜誌》 (2018) 11:39。

【0867】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之LAG-3之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之LAG-3之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如LAG-3)處之雙股或單股斷裂之產生。根據特定實施例，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之LAG-3之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

4. TGIT

【0868】TGIT(具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體)為存在於一些T細胞及自然殺手(NK)細胞上之免疫受體。TGIT及PD-1已證實在來自黑色素瘤個體之腫瘤抗原特異性CD8+ T細胞及CD8+ TIL上過表現。TGIT及PD-1之阻斷導致細胞增殖增加、細胞介素產生以及TA特異性CD8+ T

細胞及TIL CD8+ T細胞脫粒。

【0869】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之TGIT之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之TGIT之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如TGIT)處之雙股或單股斷裂之產生。根據特定實施例，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之TGIT之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

5. TIM-3

【0870】T細胞免疫球蛋白-3(TIM-3)為T細胞之直接負調節劑且表現於NK細胞及巨噬細胞上。TIM-3藉由誘導骨髓衍生之抑制細胞(MDSC)之擴增來間接地促進免疫抑制。發現其在功能障礙及耗竭之T細胞上之含量特定地升

高，表明在惡性疾病中之重要作用。

【0871】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之TIM-3之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之TIM-3之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如TIM-3)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之TIM-3之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

6. Cish

【0872】Cish，細胞介素信號傳導抑制因子(SOCS)家族之成員，係由CD8+ T細胞中之TCR刺激誘導且抑制其針對腫瘤之功能親合力。CD8+ T細胞中之Cish之基因缺失可增強其擴增、功能親合力及細胞介素多功能性，引起現有

腫瘤之明顯及持久消退。參見例如Palmer等人，《實驗醫學雜誌(*Journal of Experimental Medicine*)》，212 (12): 2095 (2015)。

【0873】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之Cish之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之Cish之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如Cish)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之Cish之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

7. TGFβ

【0874】TGFβ信號傳導路徑在調節細胞生長、分化、細胞凋亡、活動性及侵襲、細胞外基質產生、血管生

成及免疫反應方面具有多種功能。TGFβ信號傳導失調在腫瘤中係常見的，且在腫瘤起始、發展及轉移中具有重要作用。在微環境水準下，TGFβ路徑在所有癌發生中有助於產生有利於腫瘤生長及轉移之微環境。參見例如Neuzillet等人，《藥理學及治療劑(*Pharmacology & Therapeutics*)》，第147卷，第22-31頁(2015)。

【0875】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之TGFβ之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之TGFβ之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如TGFβ)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之TGFβ之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【0876】在一些實施例中，可使用此項技術中已知之

方法，藉由使用CRISPR/Cas9系統緘默化TGFβR2或藉由使用TGFβR2顯性陰性細胞外捕捉器來抑制TGFβR2(TGFβ受體2)。

8. PKA

【0877】蛋白質激酶A(PKA)為熟知的絲胺酸-蘇胺酸蛋白質激酶超家族之成員。PKA，亦稱為cAMP依賴性蛋白質激酶，為多單元蛋白質激酶，其經由其在cAMP結合時之活化來介導G蛋白質偶合受體之信號轉導。其涉及來代謝至離子通道活化、細胞生長及分化、基因表現及細胞凋亡之多種細胞過程之控制。重要的是，PKA與許多腫瘤之起始及發展有關。參見例如Sapio等人，《實驗及臨床科學雜誌(EXCLI *Journal*)》; 2014; 13: 843-855。

【0878】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之PKA之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之PKA之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如PKA)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或

鋅指方法緘默化或抑制TIL中之PKA之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

9. CBLB

【0879】CBLB(或CBL-B)為E3泛素-蛋白質連接酶且為T細胞活化之負調節劑。Bachmaier等人，《自然(*Nature*)》，2000, 403, 211-216；Wallner等人，《臨床及發展免疫學(*Clin. Dev. Immunol.*)》**2012,** 692639。

【0880】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之CBLB之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之CBLB之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如CBLB)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之PKA之表現。在一些實

施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，使用TALEN基因剔除使CBLB緘默。在一些實施例中，使用TALE-KRAB轉錄抑制劑基因嵌入使CBLB緘默。關於此等方法之更多細節可見於Boettcher及McManus,《分子細胞綜述(*Mol. Cell Review*)》, **2015,** *58,* 575-585中。

1. TIGIT

【0881】具有Ig及ITIM(基於免疫受體酪胺酸之抑制模體)域或TIGIT之T細胞免疫受體為跨膜糖蛋白受體，其在其細胞質域中具有Ig樣V型域及ITIM。Khalil等人,《癌症研究進展(*Advances in Cancer Research*)》, **2015**, 128, 1-68；Yu等人,《自然免疫學(*Nature Immunology*)》, **2009**, 第10卷, 第1號, 48-57。TIGIT由一些T細胞及自然殺手細胞表現。此外，已證實TIGIT在抗原特異性CD8+ T細胞及CD8+ TIL(尤其來自患有黑色素瘤之個體)上過表現。研究已證實TIGIT路徑有助於腫瘤免疫逃避且已證實TIGIT抑制可增加回應於多株及抗原特異性刺激之T細胞活化及增殖。Khalil等人,《癌症研究進展》, **2015**, 128, 1-68。此外，在小鼠模型中，用PD-1或TIM3共阻斷TIGIT展示針對實體腫瘤之協同作用。同上；亦參見Kurtulus等人,

《臨床研究雜誌(*The Journal of Clinical Investigation*)》, **2015**, 第125卷, 第11號, 4053-4062。

【0882】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之TIGIT之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TIL中之TIGIT之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如TIGIT)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法緘默化或抑制TIL中之TIGIT之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

10. TOX

【0883】胸腺細胞選擇相關之高遷移率群(HMG)匣(TOX)為含有HMG匣DNA結合域之轉錄因子。TOX為HMG匣超家族之成員，認為其以非序列依賴性，但以結構依賴

性方式結合DNA。

【0884】已鑑別TOX為腫瘤特異性$CD8^+$ T細胞功能障礙或T細胞耗減之重要調節劑且發現其以轉錄及表觀遺傳方式程式化$CD8^+$ T細胞耗減，如例如Scott等人，《自然》，**2019**, 571, 270-274及Khan等人，《自然》，**2019**, 571, 211-218中所描述，其皆以全文引用之方式併入本文中。亦發現TOX為慢性感染期間T細胞功能障礙之發展及維持耗減T細胞之重要因子，如Alfei等人，《自然》，**2019**, 571, 265-269中所描述，其以全文引用之方式併入本文中。TOX在來自腫瘤及慢性病毒感染之功能障礙或耗減T細胞中大量表現。TOX在活體外效應T細胞中之異位表現誘導與T細胞耗減相關之轉錄程式，而T細胞中之TOX之缺失消除T耗減程式。

【0885】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之TOX之表現緘默或減少。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物及緘默化或抑制TOX之表現。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導免疫檢查點基因(諸如TOX)處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法、RNA干擾方法(例如，shRNA)、Cas-CLOVER方法或鋅指方法

緘默化或抑制TIL中之TOX之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

E. 共刺激受體或黏著分子之表現/過表現

【0886】根據其他實施例，在TIL擴增方法期間基因編輯TIL可引起細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種共刺激受體、黏著分子及/或細胞介素之表現增強。舉例而言，基因編輯可引起共刺激受體、黏著分子或細胞介素之表現增強，亦即，與未經基因修飾之共刺激受體、黏著分子或細胞介素之表現相比過表現。可由本發明之永久性基因編輯TIL呈現增強之表現之共刺激受體、黏著分子或細胞介素基因之非限制性實例包括某些趨化介素受體及介白素，諸如CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配位體mDLL1。

1. CCR

【0887】為了使授受性T細胞免疫療法有效，需要藉

由趨化介素使T細胞適當地遷移至腫瘤中。由腫瘤細胞分泌之趨化介素、周邊中存在之趨化介素及由T細胞表現之趨化介素受體之間的匹配對於T細胞成功遷移至腫瘤床中而言係重要的。

【0888】根據特定實施例，本發明之基因編輯方法可用於增加TIL中之某些趨化介素受體(諸如CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3及CX3CR1中之一或多者)之表現。CCR之過表現可有助於促進TIL在授受性轉移之後的效應功能及增殖。

【0889】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法使TIL中之CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3及CX3CR1中之一或多者之表現增強。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含基因編輯至少一部分TIL以在細胞表面上表現至少一種免疫調節組合物以及增強TIL中之CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3及CX3CR1中之一或多者之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【0890】如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含

使用可程式化核酸酶，其介導趨化介素受體基因處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法或鋅指方法增強TIL中之某些趨化介素受體之表現。

【0891】在一些實施例中，使用如本文中所描述的γ-反轉錄病毒或慢病毒方法將CCR4及/或CCR5黏著分子插入TIL群體中。在一些實施例中，使用如以下中所描述之γ-反轉錄病毒或慢病毒方法將CXCR2黏著分子插入TIL群體中：Forget等人，《前沿免疫學(*Frontiers Immunology*)》**2017**, *8*, 908或Peng等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》 **2010**, *16*, 5458，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0892】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之第三TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)系統、轉錄活化因子樣效應子(TALE)系統或鋅指系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及視情況存在之LAG-3之表現，且此外其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中

之複數個細胞之細胞表面處之CXCR2黏著分子之表現或藉由γ反轉錄病毒或慢病毒方法將CXCR2黏著分子插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集之TIL群體中。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【0893】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、

視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之第三TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)系統、轉錄活化因子樣效應子(TALE)系統或鋅指系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及視情況存在之LAG-3之表現，且此外其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面處之CCR4及/或CCR5黏著分子之表現或藉由γ反轉錄病毒或慢病毒方法將CXCR2黏著分子插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集之TIL群體中。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融

合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【0894】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至

步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之第三TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)系統、轉錄活化因子樣效應子(TALE)系統或鋅指系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及視情況存在之LAG-3之表現，且此外其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面處之選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合組成之群的黏著分子之表現或藉由γ反轉錄病毒或慢病毒方法將黏著分子插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集之TIL群體中。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及

CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

2.介白素

【0895】根據其他實施例，本發明之基因編輯方法可用於增加某些介白素(諸如IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18及IL-21中之一或多者)之表現。已證明某些介白素可增強T細胞之效應功能及介導腫瘤控制。

【0896】根據特定實施例，根據本發明之組合物及方法增強TIL中之IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18及IL-21中之一或多者之表現。舉例而言，可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A、過程Gen 3或圖34及圖35中所展示之方法)之任何實施例進行用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其中該方法包含藉由增強IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18及IL-21中之一或多者之表現來基因編輯至少一部分TIL。如下文更詳細地描述，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，其介導介白素基因處之雙股或單股斷裂之產生。舉例而言，可使用CRISPR方法、TALE方法或鋅指方法增強TIL中之某些介白素之表現。

【0897】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現至少一種基因編輯器之轉移；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天，成為第二TIL群體中之複數個細胞；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g) 至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之

TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)系統、轉錄活化因子樣效應子(TALE)系統或鋅指系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及視情況存在之LAG-3之表現，且此外其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面處之選自由IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21及其組合組成之群的介白素之表現或藉由γ反轉錄病毒或慢病毒方法將介白素插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集之TIL群體中。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之細胞介素。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。

F. 基因編輯方法

【0898】如上文所論述，本發明之實施例提供經由基因編輯而經基因修飾以增強其治療作用之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)，包括經由暫時基因編輯而經修飾以暫時改變經修飾之TIL中之蛋白質表現之TIL。本發明之實施例涵蓋經由核苷酸插入(RNA或DNA)TIL群體中進行之基因編輯，以促進一或多種蛋白質之表現及抑制一或多種蛋白質之表現以及其組合。本發明之實施例亦提供用於將TIL擴增成

治療性群體之方法，其中該等方法包含基因編輯TIL，或其中該等方法包含暫時基因編輯TIL以暫時改變經修飾之TIL中之蛋白質表現。存在若干種可用於基因修飾TIL群體之基因編輯技術，包括用於暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之暫時基因編輯技術，其適於根據本發明使用。

【0899】在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括穩定地併入用於產生一或多種蛋白質或核酸(例如，免疫調節性融合蛋白質及/或用於修飾如本文中所描述之基因表現之RNA(例如，shRNA))之基因之步驟。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括反轉錄病毒轉導之步驟。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為此項技術中已知的且描述於例如以下中：Levine等人，《美國國家科學院院刊》 **2006**, *103*, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學(*Nat. Biotechnol.*)》 **1997**, *15*, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌(*J. Virology*)》 **1998**, *72*, 8463-71及美國專利案第6,627,442號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。

【0900】可使用此項技術中已知之任何合適技術製備用於基因修飾標的TIL之慢病毒載體。在一些實施例中，慢病毒載體係使用穩定慢病毒生產細胞株製備。在一些實施例中，使用轉位子/轉位酶(例如，本文中所描述之piggyBac及睡美人系統)以將用於慢病毒載體生產之各種基因(例如，VSV-g/BaEV-TR、gag及pol基因、所關注之基因等)整

合至生產細胞株基因體中來製備穩定慢病毒生產細胞株。在一些實施例中，用於慢病毒載體生產之基因係在允許慢病毒載體之可誘導生產之可誘導表現系統(例如，Tet-on及Tet-off系統)之控制下。用於慢病毒生產之例示性可誘導穩定生產細胞株包括例如EuLV® (Eureka Bio)系統，參見例如Xue等人，《細胞與基因療法見解(Cell & Gene Therapy Insights)》8(2): 199-209 (2022)，WO2021218000A1、WO2021232632A1及WO2021232633A1，其以全文引用之方式併入，特別是與生產用於慢病毒生產之可誘導穩定生產細胞株有關之相關部分。

【0901】在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括γ-反轉錄病毒轉導之步驟。γ-反轉錄病毒轉導系統為此項技術中已知的且描述於例如Cepko及Pear,《分子生物學中之當前方案(Cur.Prot.Mol. Biol.)》1996, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為此項技術中已知的，且包括其中轉位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包含帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包括類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等人,《分子療法(Mol. Therapy)》

2010, 18, 674-83及美國專利案第6,489,458號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。

【0902】在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包含穩定地併入用於產生或抑制(例如，緘默化)一或多種蛋白質之基因之步驟。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法(諸如藉由暫時改變蛋白質表現來進行暫時基因修飾之方法)包括電致孔步驟。電致孔方法為此項技術中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物物理雜誌》 **1991,** *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。可使用此項技術中已知之其他電致孔方法，諸如以下中描述之彼等電致孔方法：美國專利案第5,019,034號、第5,128,257號、第5,137,817號、第5,173,158號、第5,232,856號、第5,273,525號、第5,304,120號、第5,318,514號、第6,010,613號及第6,078,490號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，電致孔方法為無菌電致孔方法。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅

上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以誘導TIL中孔形成之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個DC電脈衝之步驟，

場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同，使得所誘導的孔持續相對長的時段，及使得維持TIL之存活率。

【0903】在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法(諸如藉由暫時改變蛋白質表現來進行暫時基因修飾之方法)包括磷酸鈣轉染步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面塗佈及內飲作用)為此項技術中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb, 《病毒學》 **1973**, *52*, 456-467；Wigler等人, 《美國國家科學院院刊》 **1979**, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學》 **1987**, *7*, 2745-2752；及美國專利案第5,593,875號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法(諸如藉由暫時改變蛋白質表現來進行暫時基因修飾之方法)包括脂質體轉染步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*,*n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:1(w/w)脂質體調配物之方法為此項技術中已知的且描述於Rose等人, 《生物技術》 **1991**, *10*, 520-525及Felgner等人, 《美國國家科學院院刊》, **1987**, *84*, 7413-7417以及美國專利案第5,279,833號、第

5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法(諸如藉由暫時改變蛋白質表現來進行暫時基因修飾之方法)包括使用美國專利案第5,766,902號；第6,025,337號；第6,410,517號；第6,475,994號；及第7,189,705號中所描述之方法之轉染步驟，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。

【0904】根據一些實施例，基因編輯過程可包含使用可程式化核酸酶，該可程式化核酸酶介導一或多個免疫檢查點基因處之雙股或單股斷裂之產生。此類可程式化核酸酶藉由在特定基因體基因座處引入斷裂而能夠進行精確基因體編輯，亦即其依賴於識別基因體內之特定DNA序列以將核酸酶域靶向此位置且介導在目標序列處產生雙股斷裂。DNA中之雙股斷裂隨後將內源性修復機制募集至斷裂位點，以藉由非同源末端連接(NHEJ)或同源定向修復(HDR)來介導基因體編輯。因此，斷裂之修復可導致引入擾亂(例如緘默、抑制或增強)目標基因產物之插入/缺失突變。

【0905】經開發而使得能夠進行位點特異性基因體編輯之核酸酶之主要類別包括鋅指核酸酶(zinc finger nuclease；ZFN)、轉錄活化因子樣核酸酶(transcription activator-like nucleases；TALEN)及CRISPR相關核酸酶(例如CRISPR/Cas9)。此等核酸酶系統可基於其DNA識別模式

而大致分類為兩類：ZFN及TALEN經由蛋白質-DNA相互作用達成特定DNA結合，而CRISPR系統，諸如Cas9，藉由與目標DNA直接鹼基配對之短RNA引導分子及藉由蛋白質-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。參見例如Cox等人，《自然醫學(*Nature Medicine*)》，2015，第21卷，第2期。

【0906】可根據本發明之TIL擴增方法使用之基因編輯方法之非限制性實例包括CRISPR方法、TALE方法、ZFN方法、Cas-CLOVER方法、shRNA方法或其組合，其實施例在下文中更詳細地描述。根據一些實施例，用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如過程2A)之任何實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由CRISPR方法、TALE方法、ZFN方法、Cas-CLOVER方法或shRNA方法中之一或多者基因編輯至少一部分TIL，以產生可提供增強之治療作用的TIL。根據一些實施例，可藉由比較經基因編輯之TIL與未經修飾之TIL，例如藉由評估相較於未經修飾的TIL之活體外效應功能、細胞介素概況等，來評估經基因編輯之TIL之改良的治療作用。

【0907】在本發明之一些實施例中，使用電致孔來遞送基因編輯系統，諸如CRISPR、TALEN、ZFN、Cas-CLOVER及shRNA系統。在本發明之一些實施例中，電致孔系統為流式電致孔系統。適用於本發明之一些實施例之

合適的流式電致孔系統之實例為市售MaxCyte STX系統。有若干種可能適用於本發明之替代性市售電致孔儀器，諸如可獲自BTX-Harvard Apparatus之AgilePulse系統或ECM 830、Cellaxess Elektra (Cellectricon)、Nucleofector (龍沙(Lonza)/Amaxa)、GenePulser MXcell (伯樂(BIORAD)、iPorator-96 (Primax)或siPORTer96 (Ambion)。在本發明之一些實施例中，電致孔系統與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。在本發明之一些實施例中，電致孔系統為如本文中所描述之脈衝電致孔系統，且與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。

【0908】在一些實施例中，使用微流體平台來遞送基因編輯系統。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

轉位子/轉位酶遞送方法

【0909】在本發明之一些實施例中，轉位子/轉位酶系統用於遞送基因編輯系統，諸如CRISPR、TALEN、ZFN、Cas-CLOVER及shRNA系統。

【0910】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如過程2A)之任何實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由轉位子/轉位酶系統(例如，piggyBac轉位子及轉位酶或piggyBac樣轉位子及轉位酶；睡美人(SB)轉位子及轉位酶；

Helraiser轉位子及轉位酶等)基因編輯至少一部分TIL。

【0911】根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用piggyBac、睡美人或Helraiser方法可引起至少一部分治療性TIL群體之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現。或者，在TIL擴增過程期間使用piggyBac、睡美人或Helraiser方法可引起至少一部分治療性TIL群體之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現且視情況引起一或多種免疫檢查點基因之增強。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0912】在一些實施例中，在TIL擴增過程期間使用piggyBac、睡美人或Helraiser方法可引起至少一部分治療性TIL群體中目標基因之表現減少。在一些實施例中，目標基因為免疫檢查點。

【0913】piggyBac轉位子為在供體載體與宿主染色體之間有效地進行轉位之可移動遺傳元件。該系統幾乎沒有貨物限制，且為完全可逆的，切除後不會在基因體中留下

足跡。piggyBac轉位子/轉位酶系統由識別位於轉位子卡匣兩側之piggyBac特異性反向末端重複序列(ITR)之轉位酶組成。轉位酶切除可轉位元件以將其整合至優先位於哺乳動物基因體常染色質區域之TT/AA染色體位點中(Ding等人, 2005；Cadinaños及Bradley 2007；Wilson等人, 2007；Wang等人, 2008；Li等人, 2011)。

【0914】例示性piggyBac系統包括於WO2019/046815中描述之彼等，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，piggyBac系統包含轉位子/轉位酶系統。

【0915】在一些實施例中，piggyBac方法包含向TIL遞送(a)包含編碼轉位酶之序列之核酸或胺基酸序列及(b)包含編碼轉位子之DNA序列之重組及非天然存在之DNA序列。

【0916】在一些實施例中，編碼轉位酶之序列為mRNA序列。在一些實施例中，編碼轉位酶之序列為DNA序列。在一些實施例中，DNA序列為cDNA序列。在一些實施例中，編碼轉位酶之序列為胺基酸序列。蛋白質Super piggybac轉位酶(SPB)可在與轉位子DNA預培育後遞送。

轉位子/轉位酶

【0917】例示性轉位子/轉位酶系統包括但不限於piggyBac轉位子及轉位酶、睡美人轉位子及轉位酶、

Helraiser轉位子及轉位酶以及Tol2轉位子及轉位酶。

【0918】piggyBac轉位酶識別轉位子末端之轉位子特異性反向末端重複序列(ITR)，且將ITR之間的內容物移動至TTAA染色體位點。piggyBac轉位子系統對可包括於ITR之間的所關注基因無有效負載限制。在一些實施例中，轉位子為piggyBac轉位子或piggyBac樣轉位子。

【0919】piggyBac及piggyBac樣轉位酶及轉位子之實例包括例如WO2019/046815中揭示之彼等，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，piggyBac或piggyBac樣轉位酶具超活性。超活性piggyBac或piggyBac樣轉位酶為比其所衍生之天然存在之變異體更具活性之轉位酶。在一些實施例中，超活性piggyBac或piggyBac樣轉位酶係分離自或源自家蠶(Bombyx mori)。超活性胺基酸取代之清單可見於美國專利案第10,041,077號，其內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，piggyBac或piggyBac樣轉位酶為整合缺陷型。在一些實施例中，整合缺陷型piggyBac或piggyBac樣轉位酶為可切除其相應轉位子但以低於相應野生型轉位酶之頻率整合切除之轉位子之轉位酶。整合缺陷型胺基酸取代之清單可見於美國專利案第10,041,077號，其內容以全文引用之方式併入。

【0920】在一些實施例中，piggyBac或piggyBac樣轉位子能夠藉由piggyBac或piggyBac樣轉位酶插入靶核酸內之序列5'-TTAT-3處。在一些實施例中，且特定言之其中

轉位子為piggyBac轉位子之實施例中，轉位酶為piggyBac轉位酶。在一些實施例中，且特定言之其中轉位子為piggyBac樣轉位子之實施例中，轉位酶為piggyBac樣轉位酶。在一些實施例中，且特定言之其中轉位子為piggyBac轉位子之實施例中，轉位酶為piggyBac™或Super piggyBac™(SPB)轉位酶。在一些實施例中，且特定言之其中轉位酶為Super piggyBac™(SPB)轉位酶之實施例中，編碼轉位酶之序列為mRNA序列。

【0921】睡美人(SB)轉位子係藉由識別ITR之睡美人轉位酶轉位至目標基因體中，且將ITR之間的內容物移動至TA染色體位點。在一些實施例中，轉位子為睡美人轉位子。在一些實施例中，轉位酶為睡美人轉位酶(參見例如美國專利案第9,228,180號，其內容以全文併入本文中)。在一些實施例中，睡美人轉位酶為超活性睡美人(SB100X)轉位酶。

【0922】Helraiser轉位子由Helitron轉位酶轉位。與其他轉位酶不同，Helitron轉位酶不含RNase-H樣催化域，而包含由複製起始域(Rep)及DNA解旋酶域組成之RepHel模體。Rep域為HUH核酸酶超家族之核酸酶域。在一些實施例中，轉位子為Helraiser轉位子。在Helraiser轉位子序列之一些實施例中，轉位酶之側翼為稱為LTS及RTS之左右末端序列。在一些實施例中，此等序列以保守之5'-TC/CTAG-3'模體終止。在一些實施例中，具有形成髮夾終止結構之潛力之19 bp回文序列位於RTS上游11個核苷酸且

包含序列GTGCACGAATTTCGTGCACCGGGCCACTAG。在一些實施例中，且特定言之其中轉位子為Helraiser轉位子之特定實施例中，轉位酶為Helitron轉位酶。

【0923】Tol2轉位子可分離或衍生自青鱂魚之基因體，且可能類似於hAT家族之轉位子。本揭示案之例示性Tol2轉位子由包含約4.7千鹼基之序列編碼，且含有編碼Tol2轉位酶之基因，該基因含有四個外顯子。在一些實施例中，轉位子為Tol2轉位子。在本揭示案之方法之某些實施例中，且特定言之其中轉位子為Tol2轉位子之彼等實施例中，轉位酶為Tol2轉位酶。

【0924】在一些實施例中，載體包含編碼轉位子之重組及非天然存在之DNA序列。在一些實施例中，載體包含任何形式之DNA，且其中載體包含至少100個核苷酸(nt)、500 nt、1000 nt、1500 nt、2000 nt、2500 nt、3000 nt、3500 nt、4000 nt、4500 nt、5000 nt、6500 nt、7000 nt、7500 nt、8000 nt、8500 nt、9000 nt、9500 nt、10,000 nts或介於兩者之間的任何數量之核苷酸。在一些實施例中，載體包含單股或雙股DNA。在一些實施例中，載體包含環狀DNA。在一些實施例中，載體為質體載體、奈米質體載體、小環。在一些實施例中，載體包含線性或線性化之DNA。在一些實施例中，載體為雙股doggybone™ DNA序列。

【0925】在一些實施例中，編碼轉位子之重組及非天然存在之DNA序列進一步包含編碼一或多個免疫檢查點基

因之序列。

【0926】在一些實施例中，編碼轉位酶之核酸序列為DNA序列，且編碼轉位酶之DNA序列之量及編碼轉位子之DNA序列之量等於或小於10.0 μg/100 μL、小於7.5 μg/100 μL、小於6.0 μg/100 μL、小於5.0 μg/100 μL、小於2.5 μg/100 μL、或小於1.67 μg/100 μL、小於0.55 μg/100 μL、小於0.19 μg/100 μL、小於0.10 μg/100 μL電致孔或核轉染反應。在某些實施例中，在電致孔或核轉染反應中編碼轉位酶之DNA序列之量及編碼轉位子之DNA序列之量的濃度等於或小於100 μg/mL，等於或小於75 μg/mL，等於或小於60 μg/mL，等於或小於50 μg/mL，等於或小於25 μg/mL，等於或小於16.7 μg/mL，等於或小於5.5 μg/mL，等於或小於1.9 μg/mL，等於或小於1.0 μg/mL。

【0927】在一些實施例中，編碼轉位酶之核酸序列為RNA序列，且編碼轉位酶之RNA序列之量及編碼轉位子之RNA序列之量等於或小於10.0 μg/100 μL、小於7.5 μg/100 μL、小於6.0 μg/100 μL、小於5.0 μg/100 μL、小於2.5 μg/100 μL、或小於1.67 μg/100 μL、小於0.55 μg/100 μL、小於0.19 μg/100 μL、小於0.10 μg/100 μL電致孔或核轉染反應。在某些實施例中，在電致孔或核轉染反應中編碼轉位酶之RNA序列之量及編碼轉位子之RNA序列之量的濃度等於或小於100 μg/mL，等於或小於75 μg/mL，等於或小於60 μg/mL，等於或小於50 μg/mL，等於或小於25 μg/mL，等於或小於16.7 μg/mL，等於或小於5.5 μg/mL，

等於或小於1.9 μg/mL，等於或小於1.0 μg/mL。

【0928】在一些實施例中，TIL係藉由第二基因編輯工具進一步修飾，該第二基因編輯工具包括但不限於本文中所描述之彼等。在一些實施例中，第二基因編輯工具可包括僅切除之piggyBac轉位酶以重新切除插入之序列或其任何部分。例如，僅切除之piggyBac轉位酶可用於「重新切除」轉位子。

【0929】根據一些實施例，piggyBac系統包含轉位子/轉位酶系統，其中轉位酶識別位於包含編碼一或多種免疫檢查點基因之貨物之轉位子卡匣兩側之ITR，且切除可轉位元件以將其整合至TT/AA染色體位點中，導致轉位子卡匣之基因體插入及一或多種免疫檢查點基因之表現。根據一些實施例，貨物編碼兩個或更多個免疫檢查點分子。

【0930】可藉由經由piggyBac方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配位體mDLL1。可藉由經由piggyBac方法基因編輯TIL而增強之額外基因包括免疫檢查點基因，諸如PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、

TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0931】藉由piggyBac方法改變目標基因序列表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於WO2019/046815、WO2015006700、WO2010085699、WO2010099301、WO2010099296、WO2006122442、WO2001081565及WO1998040510中，其內容以全文引用之方式併入本文中。

【0932】用於執行piggyBac方法之資源，諸如用於表現轉位子/轉位酶之質體，可購自諸如Demeetra及Hera Biolabs之公司。

【0933】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB

促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種包含piggyBac系統之基因編輯器系統，該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現及調節至少一種檢查點蛋白質之表現。

【0934】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，

且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種包含piggyBac系統之基因編輯器系統，該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0935】在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法

包括使用非病毒技術，諸如piggyBac方法(例如，piggyBac轉位子及轉位酶或piggyBac樣轉位子及轉位酶)。在一些實施例中，該方法包括向TIL遞送：(a)包含編碼轉位酶之序列之核酸或胺基酸序列；及(b)包含編碼轉位子之DNA序列之重組及非天然存在之DNA序列。在本揭示案之方法之某些實施例中，編碼轉位酶之序列為mRNA序列。編碼轉位酶之mRNA序列可在活體外產生。在本揭示案之方法之某些實施例中，編碼轉位酶之序列為DNA序列。編碼轉位酶之DNA序列可在活體外產生。DNA序列可為cDNA序列。在本揭示案之方法之某些實施例中，編碼轉位酶之序列為胺基酸序列。編碼轉位酶之胺基酸序列可在活體外產生。蛋白質Super piggybac轉位酶(SPB)可在與轉位子DNA預培育後遞送。在某些實施例中，轉位子為piggyBac轉位子或piggyBac樣轉位子。在某些實施例中，且特定言之其中轉位子為piggyBac轉位子之彼等實施例中，轉位酶為piggyBac轉位酶。在某些實施例中，且特定言之其中轉位子為piggyBac樣轉位子之彼等實施例中，轉位酶為piggyBac樣轉位酶。在某些實施例中，piggyBac轉位酶包含含有SEQ ID NO:387(WO2019046815之SEQ ID NO:14487)之胺基酸序列。在某些實施例中，且特定言之其中轉位子為piggyBac轉位子之彼等實施例中，轉位酶為piggyBac™或Super piggyBac™(SPB)轉位酶。在某些實施例中，且特定言之其中轉位酶為Super piggyBac™(SPB)轉位酶之彼等實施例中，編碼轉位酶之序列為mRNA序列。

在本揭示案之方法之某些實施例中，轉位酶為piggyBac™(PB)轉位酶。piggyBac(PB)轉位酶可包含與以下序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或其間任何百分比之一致性的胺基酸序列或由其組成：

MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDTEEAFIDE
VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTS
KSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDEIISEIVKWTN
AEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFD
RSLSMVYVSVMSRDRFDFLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFTPVRKIWDL
FIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIKILMMCDS
GTKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCRNITCDNWF
TSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSRPVGTSMFCFDGP
LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQTKGGVDT
LDQMCSVMTCSRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSKGEKVQ
SRKKFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPGTSDDS
TEEPVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQSCF
(SEQ ID NO:387；WO2019046815之SEQ ID NO: 14487)。

【0936】在本揭示案之方法之某些實施例中，轉位子為睡美人轉位子。在本揭示案之方法之某些實施例中，轉位酶為睡美人轉位酶(參見例如美國專利案第9,228,180號，其內容以全文併入本文中)。在某些實施例中，睡美人轉位酶為超活性睡美人(SB100X)轉位酶。在某些實施例中，睡美人轉位酶包含與以下序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或其間任何百分比之一致性的胺基

酸序列：

MGKSKEISQDLRKKIVDLHKSGSSLGAISKRLKVPRSSVQTIVRKYKHHG
TTQPSYRSGRRRVLSPRDERTLVRKVQINPRTTAKDLVKMLEETGTKVSI
STVKRVLYRHNLKGRSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHGDKDRTFWR
NVLWSDETKIELFGHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPTVKHGGGSIMLW
GCFAAGGTGALHKIDGIMRKENYVDILKQHLKTSVRKLKLGRKWVFQ
MDNDPKHTSKVVAKWLKDNKVKVLEWPSQSPDLNPIENLWAELKKRV
RARRPTNLTQLHQLCQEEWAKIHPTYCGKLVEGYPKRLTQVKQFKGNA
TKY (SEQ ID NO: 388；WO2019046815之SEQ ID NO: 14485)。

【0937】在某些實施例中，包括其中睡美人轉位酶為超活性睡美人(SB100X)轉位酶之實施例，睡美人轉位酶包含與以下序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或其間任何百分比之一致性的胺基酸序列：

MGKSKEISQDLRKRIVDLHKSGSSLGAISKRLAVPRSSVQTIVRKYKHHG
TTQPSYRSGRRRVLSPRDERTLVRKVQINPRTTAKDLVKMLEETGTKVSI
STVKRVLYRHNLKGHSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHGDKDRTFWR
NVLWSDETKIELFGHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPTVKHGGGSIMLW
GCFAAGGTGALHKIDGIMDAVQYVDILKQHLKTSVRKLKLGRKWVFQ
HDNDPKHTSKVVAKWLKDNKVKVLEWPSQSPDLNPIENLWAELKKRV
RARRPTNLTQLHQLCQEEWAKIHPNYCGKLVEGYPKRLTQVKQFKGNA
TKY (SEQ ID NO: 389；WO2019046815之SEQ ID NO: 14486)。

1. CRISPR方法

【0938】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據

本文中所描述之方法(例如過程2A)之任何實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由CRISPR方法(例如，CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法可引起至少一部分治療性TIL群體之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現且視情況引起一或多種免疫檢查點基因之緘默或減少。或者，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法可引起至少一部分治療性TIL群體之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現且視情況引起一或多種免疫檢查點基因之增強。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0939】CRISPR代表「成簇規律間隔短回文重複序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)」。使用CRISPR系統進行基因編輯之方法在本文中亦稱為CRISPR方法。CRISPR系統可分成兩種主要類

別，即第1類及第2類，其進一步分為不同類型及亞型。CRISPR系統之分類係基於能夠裂解特異性核酸之效應Cas蛋白質。在第1類CRISPR系統中，效應模組由多蛋白質複合物組成，而第2類系統僅使用一種效應蛋白質。第1類CRISPR包括第I、III及IV型，且第2類CRISPR包括第II、V及VI型。儘管可根據本發明使用此等類型之CRISPR系統中之任一者，但存在三種類型之合併有較佳根據本發明使用之RNA及Cas蛋白質之CRISPR系統：第I(由Cas3例示)、II(由Cas9例示)及III(由Cas10例示)型。第II型CRISPR為最充分表徵之系統之一。

【0940】CRISPR技術係改編自細菌及古菌(單細胞微生物之域)之天然防禦機制。此等生物體使用CRISPR衍生之RNA及各種Cas蛋白(包括Cas9)，藉由切碎及破壞外來入侵者之DNA來阻止病毒及其他外來體的攻擊。CRISPR為具有兩個獨特特徵之DNA特化區：存在核苷酸重複序列及間隔子。核苷酸之重複序列分佈在整個CRISPR區中，其中短外來DNA區段(間隔子)穿插在重複序列中。在II型CRISPR/Cas系統中，間隔子整合於CRISPR基因體基因座內且轉錄並加工成短CRISPR RNA(crRNA)。此等crRNA退火成反式活化crRNA(tracrRNA)，且引導Cas蛋白進行序列特異性裂解及緘默病原性DNA。Cas9蛋白進行之目標識別需要crRNA內之「種子」序列及crRNA結合區上游之含有二核苷酸的保守原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。藉此CRISPR/Cas系統可藉由重新設計crRNA而重新靶向以裂解

幾乎任何DNA序列。因此，根據某些實施例，Cas9充當RNA引導之DNA核酸內切酶，其在crRNA-tracrRNA識別時使DNA裂解。原生系統中之crRNA及tracrRNA可簡化為大約100個核苷酸之單引導RNA(sgRNA)以用於基因工程改造。sgRNA為合成RNA，其包括Cas結合所必需之骨架序列及使用者定義之約17-至20-核苷酸間隔子，該間隔子定義待修飾之基因體目標。因此，使用者可藉由改變sgRNA中存在之目標序列來改變Cas蛋白質之基因體目標。藉由共同遞送表現Cas9核酸內切酶及RNA組分(例如，sgRNA)之質體使人類細胞可直接攜帶CRISPR/Cas系統。可使用不同的Cas蛋白變異體來減少靶向限制(例如Cas9之異種同源物，諸如Cpf1)。

【0941】根據一些實施例，經工程改造、可程式化、非天然存在之II型CRISPR-Cas系統包含Cas9蛋白質及至少一種嚮導RNA，該至少一種嚮導RNA靶向TIL中之DNA分子之目標序列且與其雜交，其中DNA分子編碼且TIL表現至少一種免疫檢查點分子，且Cas9蛋白質使DNA分子裂解，藉此改變該至少一種免疫檢查點分子之表現；且其中該Cas9蛋白質及該嚮導RNA並非天然地共同存在。根據一些實施例，改變兩種或更多種免疫檢查點分子之表現。根據一些實施例，嚮導RNA包含與tracr序列融合之嚮導序列。舉例而言，嚮導RNA可包含crRNA-tracrRNA或sgRNA。根據本發明之態樣，術語「嚮導RNA」、「單一嚮導RNA」及「合成嚮導RNA」可互換使用且係指包含嚮

導序列之多核苷酸序列，其為指定目標位點之嚮導RNA內之約17-20 bp序列。

【0942】根據本發明之實施例，亦可使用與Cas9相比具有改良之中靶特異性之Cas9之變異體。此類變異體可稱為高保真Cas-9。根據一些實施例，可利用雙切口酶方法，其中靶向相對DNA股之兩個切口酶產生目標DNA內之DSB(通常稱為雙切口或雙切口酶CRISPR系統)。舉例而言，此方法可涉及兩個Cas9核酸酶域中之一者之突變，使Cas9自核酸酶轉變為切口酶。高保真Cas9之非限制性實例包括eSpCas9、SpCas9-HF1及HypaCas9。此類變異體可減少或消除非目標DNA位點處之不合需要的變化。參見例如Slaymaker IM等人，《科學(*Science*)》. **2015**年12月1日，Kleinstiver BP等人，《自然》. **2016**年1月6日，及Ran等人，《自然實驗手冊(*Nat Protoc.*)》 2013年11月;8(11):2281-2308，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0943】此外，根據特定實施例，可使用改良向細胞中基因遞送Cas9及改良中靶特異性之Cas9骨架，諸如美國專利申請公開案第2016/0102324號中所揭示之骨架，其以引用之方式併入本文中。舉例而言，Cas9骨架可包括如由(D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A)定義之RuvC模體及/或由(Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S)定義之HNH模體，其中X表示20種天然存在之胺基酸中之任一者且[I/L]表示異白胺酸或白胺酸。HNH域負責切割目標dsDNA之一個股且RuvC域涉及dsDNA之另一個股之裂解。因此，此等域中之

每一者切割緊鄰PAM之前間隔子內之目標DNA之一個股，引起DNA之鈍性裂解。此等模體可彼此組合以產生更緊密及/或特異性更高之Cas9骨架。此外，模體可用於產生分成兩個單獨的RuvC及HNH域之分裂型Cas9蛋白質(亦即，Cas9蛋白質或Cas9變異體之減少或截短形式，其包含RuvC域或HNH域)，該等域可共同或單獨地處理目標DNA。

【0944】根據特定實施例，CRISPR方法包含藉由引入Cas9核酸酶及嚮導RNA(例如crRNA-tracrRNA或sgRNA)來緘默化或降低TIL中之一或多種免疫檢查點基因之表現，該嚮導RNA含有對免疫檢查點基因之目標DNA序列具有特異性的約17-20個核苷酸之序列。可以RNA形式或藉由根據啟動子來轉型具有嚮導RNA編碼序列之質體來遞送嚮導RNA。基於sgRNA定義之目標序列，CRISPR/Cas酶在特定位置引入雙股斷裂(DSB)。可藉由非同源末端接合(NHEJ，一種通常引起DNA中之插入或缺失(插入/缺失)之機制)來修復細胞中之DSB。插入/缺失通常引起讀框轉移，產生功能喪失型對偶基因；舉例而言，藉由在目標基因之開放閱讀框架(ORF)內引起早熟終止密碼子。根據某些實施例，結果為目標免疫檢查點基因內之功能損失型突變。

【0945】或者，代替NHEJ，可藉由同源定向修復(HDR)來修復由CRISPR/Cas酶誘導之DSB。儘管NHEJ介導之DSB修復通常破壞基因之開放閱讀框架，但可使用同源

定向修復(HDR)來產生在單一核苷酸變化至大型插入範圍內之特定核苷酸變化。根據一些實施例，使用HDR藉由將含有所需序列之DNA修復模板遞送至具有sgRNA及Cas9或Cas9切口酶之TIL中來基因編輯免疫檢查點基因。修復模板較佳含有緊鄰目標基因之上游及下游之所需編輯以及其他同源序列(通常稱為左及右同源臂)。

【0946】根據特定實施例，可使Cas9之酶促非活性型式(deadCas9或dCas9)靶向轉錄起始位點以藉由阻斷起始來抑制轉錄。因此，可在不使用DSB之情況下抑制目標免疫檢查點基因。dCas9分子保留基於sgRNA靶向序列結合於目標DNA之能力。根據本發明之一些實施例，CRISPR方法包含藉由抑制或阻止目標基因之轉錄來緘默化或降低一或多種免疫檢查點基因之表現。舉例而言，CRISPR方法可包含使轉錄抑制因子域(諸如Kruppel相關匣(KRAB)域)與Cas9之酶促非活性型式融合，藉此形成例如dCas9-KRAB，其靶向免疫檢查點基因之轉錄起始位點，引起抑制或阻止基因之轉錄。較佳地，使抑制因子域靶向轉錄起始位點下游，例如下游約500 bp處之窗口。此方法(其可稱為CRISPR干擾(CRISPRi))經由目標RNA之轉錄減少而引起穩定的基因減弱。

【0947】根據特定實施例，可使Cas9之酶促非活性型式(deadCas9或dCas9)靶向轉錄起始位點以活化轉錄。此方法可稱為CRISPR活化(CRISPRa)。根據一些實施例，CRISPR方法藉由活化目標基因之轉錄來增加一或多種免

疫檢查點基因之表現。根據此類實施例，可在不使用DSB之情況下活化目標免疫檢查點基因。CRISPR方法可包含使轉錄活化域靶向轉錄起始位點；舉例而言，藉由使轉錄活化因子(諸如VP64)與dCas9融合，藉此形成例如dCas9-VP64，其靶向免疫檢查點基因之轉錄起始位點，引起基因轉錄之活化。較佳地，使活化因子域靶向轉錄起始位點上游，例如下游約50-400 bp處之窗口。

【0948】本發明之其他實施例可利用經開發以用於哺乳動物細胞中之目標基因之強效活化之活化策略。非限制性實例包括經抗原決定基標記之dCas9及抗體-活化因子效應蛋白質(例如，SunTag系統)、與複數個不同的串聯活化域融合之dCas9(例如，dCas9-VPR)之共同表現，或具有經修飾之骨架gRNA及其他RNA結合輔助活化因子(例如，SAM活化因子)之dCas9-VP64之共同表現。

【0949】根據其他實施例，可根據本發明之實施例使用稱為CRISPR輔助合理蛋白質工程改造(CARPE)之CRISPR介導之基因體編輯方法，如美國專利案第9,982,278號中所揭示，其以引用之方式併入本文中。CARPE涉及產生「供體」及「目標」庫，其將來自單股DNA(ssDNA)或雙股DNA(dsDNA)編輯卡匣之定向突變直接併入基因體中。供體庫之構築涉及將合理設計之編輯寡核苷酸及與目標DNA序列雜交之嚮導RNA(gRNA)共同轉型至細胞中。編輯寡核苷酸經設計以使PAM之缺失或突變與相鄰基因中之一或多個所需密碼子之突變偶合。此使得能夠

在單一轉型中產生整個供體庫。使用來自編輯寡核苷酸之合成特徵，亦即，在基因之3'端同時併入之第二PAM缺失或突變，藉由重組染色體之擴增(諸如藉由PCR反應)來檢索供體庫。此使針對PAM缺失之密碼子目標突變共價偶合。接著，將供體庫與目標gRNA載體共同轉型至細胞中以產生表現合理設計之蛋白質庫之細胞群體。

【0950】根據其他實施例，可根據本發明之實施例使用稱為藉由可追蹤的富含CRISPR之重組工程進行之基因體工程改造(GEn-TraCER)的用於使用CRISPR介導之系統進行可追蹤、精確基因體編輯之方法，如美國專利案第9,982,278號中所揭示，其以引用之方式併入本文中。GEn-TraCER方法及載體在單一載體上組合編輯卡匣與編碼gRNA之基因。卡匣含有所需突變及PAM突變。將亦可編碼Cas9之載體引入細胞或細胞群體中。此活化細胞或細胞群體中之CRISPR系統之表現，引起gRNA將Cas9募集至目標區域，在該目標區域中發生dsDNA斷裂，實現PAM突變之整合。

【0951】可藉由經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而緘默化或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、

CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0952】可藉由經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配位體mDLL1。

【0953】用於藉由CRISPR方法改變目標基因序列之表現及可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利案第8,697,359號；第8,993,233號；第8,795,965號；第8,771,945號；第8,889,356號；第8,865,406號；第8,999,641號；第8,945,839號；第8,932,814號；第8,871,445號；第8,906,616號；及第8,895,308號中，其以引用之方式併入本文中。用於進行CRISPR方法之資源，諸如用於表現CRISPR/Cas9及CRISPR/Cpf1之質體，可購自公司，諸如金斯瑞(GenScript)。

【0954】在一些實施例中，可使用如美國專利案第US 9,790,490號中所描述之CRISPR/Cpf1系統進行如本文

中所描述之TIL群體之基因修飾，其揭示內容以引用之方式併入本文中。CRISPR/Cpf1系統在功能上與CRISPR-Cas9系統之不同之處在於，無需額外的tracrRNA即可將Cpf1相關CRISPR陣列處理成成熟crRNA。CRISPR/Cpf1系統中使用之crRNA具有間隔子或嚮導序列及直接重複序列。使用此方法形成之Cpf1p-crRNA複合物本身即足以使目標DNA裂解。

【0955】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二

TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)/Cas9系統及CRISPR/Cpf1系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現及調節至少一種檢查點蛋白質之表現。

【0956】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之

TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種選自由以下組成之群的基因編輯器系統：叢集規則穿插短回文重複序列(CRISPR)/Cas9系統及CRISPR/Cpf1系統，其中該至少一種基因編輯器系統實現第二TIL群體中之複數個細胞之細胞表面上之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及LAG-3之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

2. TALE方法

【0957】可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A)之任何實施例或如WO2018081473、WO2018129332或WO2018182817中所描述來進行用於將TIL擴增成治療性群體之方法，其中該方法進一步包含藉由TALE方法基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用TALE方法可引起細胞表面處之至少一種免疫調節組

合物之表現，且視情況引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之緘默或降低。或者，在TIL擴增過程期間使用TALE方法可引起細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，且視情況引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之增強。

【0958】TALE代表「轉錄活化因子樣效應」蛋白，其包括TALEN(「轉錄活化因子樣效應核酸酶」)。使用TALE系統來基因編輯之方法在本文中亦稱為TALE方法。TALE為來自植物病原細菌黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)之天然存在蛋白質，且含有由一系列各自識別單鹼基對之33-35個胺基酸之重複域構成之DNA結合域。TALE特異性係藉由被稱為重複可變二殘基(repeat-variable di-residue；RVD)之兩個高變胺基酸判定。模組化TALE重複序列連接在一起以識別連續DNA序列。DNA結合域中之特異性RVD識別目標基因座中之鹼基，從而提供結構特徵以組裝可預測的DNA結合域。將TALE之DNA結合域與IIS型FokI核酸內切酶之催化域融合，以製備可靶向的TALE核酸酶。為了誘導位點特異性突變，由14-20個鹼基對間隔區域分開之兩個個別TALEN臂將FokI單體拉近以二聚合及產生靶向的雙股斷裂。

【0959】若干個利用各種組裝方法之大的系統性研究指示，可併入TALE重複序列以識別幾乎任何使用者定義的序列。能夠實現定製TALE陣列之快速組裝之策略包括

Golden Gate分子選殖、高通量固相組裝及非連接依賴性選殖技術。定製設計的TALE陣列亦由Cellectis Bioresearch(法國巴黎)、Transposagen Biopharmaceuticals(美國肯塔基州列克星敦(Lexington, KY, USA))及Life Technologies(美國紐約州格蘭德島(Grand Island, NY, USA))市售。此外，可使用基於網路之工具，諸如TAL效應子-核苷酸目標2.0(TAL Effector-Nucleotide Target 2.0)，其能夠設計用於所需目標之定製TAL效應子重複序列陣列及提供所預測的TAL效應子結合位點。參見Doyle等人，《核酸研究(*Nucleic Acids Research*)》，**2012**，第40卷，W117-W122。適用於本發明之TALE及TALEN方法之實例描述於美國專利申請公開案第US 2011/0201118 A1號、第US 2013/0117869 A1號、第US 2013/0315884 A1號、第US 2015/0203871 A1號及第US 2016/0120906 A1號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【0960】根據本發明之一些實施例，TALE方法包含藉由抑制或阻止目標基因之轉錄來緘默化或降低一或多種免疫檢查點基因之表現。舉例而言，TALE方法可包括利用KRAB-TALE，其中該方法包含所轉錄Kruppel相關匣(KRAB)域與靶向基因之轉錄起始位點之DNA結合域融合，引起抑制或阻止基因之轉錄。

【0961】根據其他實施例，TALE方法包含藉由在目標基因中引入突變來緘默化或降低一或多種免疫檢查點基因之表現。舉例而言，TALE方法可包括使核酸酶效應子

域(諸如FokI)與TALE DNA結合域融合，產生TALEN。FokI在作為二聚體時具有活性；因此，該方法包含構築TALEN對以將FOKL核酸酶域定位至相鄰基因體目標位點，該等域在該等目標位點處引入DNA雙股斷裂。可在FokI之正確定位及二聚化之後完成雙股斷裂。在引入雙股斷裂之後，可經由兩種不同機制實現DNA修復：高保真同源重組對(HRR)(亦稱為同源定向修復或HDR)或易錯非同源末端接合(NHEJ)。經由NHEJ進行之雙股斷裂之修復較佳引起DNA目標位點缺失、插入或取代，亦即，NHEJ通常引起在斷裂位點處引入小型插入及缺失，通常誘導剔除基因功能之讀框轉移。根據特定實施例，使TALEN對靶向基因之大部分5'外顯子，促進早期讀框轉移突變或早熟終止密碼子。由TALEN引入之基因突變較佳為永久性的。因此，根據一些實施例，該方法包含藉由利用二聚化TALEN誘導位點特異性雙股斷裂，引起目標免疫檢查點基因中之一或多個突變來緘默化或降低免疫檢查點基因之表現，該位點特異性雙股斷裂係經由易錯NHEJ修復。

【0962】根據其他實施例，使用TALEN以經由HRR來引入基因變化，諸如非隨機點突變、目標缺失或DNA片段之添加。引入DNA雙股斷裂使得能夠在存在適合的供體DNA之情況下，經由同源重組進行基因編輯。根據一些實施例，該方法包含共同遞送二聚化TALEN及攜帶基因座特異性同源臂之供體質體，以誘導位點特異性雙股斷裂及將一或多個轉基因整合至DNA中。

【0963】根據其他實施例，可根據本發明之實施例使用TALEN，該TALEN為衍生自FokI及AvrXa7之雜交蛋白質，如美國專利公開案第2011/0201118號中所揭示。此TALEN保留對AvrXa7之目標核苷酸之識別特異性及FokI之雙股DNA裂解活性。可使用相同方法製備具有不同識別特異性之其他TALEN。舉例而言，可藉由工程改造具有不同RVD集合之核心TALE骨架以改變DNA結合特異性及靶向特異性單一dsDNA目標序列來產生緊密的TALEN。參見美國專利公開案第2013/0117869號。可將所選擇之催化域連接至骨架以實現DNA處理，其可經工程改造以確保當與核心TALE骨架融合，催化域能夠處理單一dsDNA目標序列附近之DNA。肽連接子亦可經工程改造以使催化域與骨架融合，從而產生由單一多肽鏈製成之緊密的TALEN，其無需用於靶向特異性單一dsDNA序列之二聚作用。核心TALE骨架亦可藉由使催化域(其可為TAL單體)與其N端融合，實現此催化域可與另一個與另一TAL單體融合之催化域相互作用之可能性，藉此產生可能處理目標序列附近的DNA之催化實體而經修飾。參見美國專利公開案第2015/0203871號。此架構僅允許靶向一個DNA股，其並非經典TALEN架構之選擇方案。

【0964】根據本發明之一些實施例，可使用習知RVD以產生能夠顯著降低基因表現之TALEN。在一些實施例中，使用四種RVD，即NI、HD、NN及NG，以分別靶向腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤及胸腺嘧啶。此等習知RVD可用於

例如產生靶向PD-1基因之TALEN。使用習知RVD之TALEN之實例包括Gautron等人，《分子療法：核酸(*Molecular Therapy: Nucleic Acids*)》，2017年12月，第9卷:312-321 (Gautron)中所揭示之T3v1及T1 TALEN，其以引用之方式併入本文中。T3v1及T1 TALEN靶向PD-L1結合位點所位於之*PDCD1*基因座之第二外顯子且能夠顯著減少PD-1產生。在一些實施例中，T1 TALEN藉由使用目標SEQ ID NO:256來達成此目的且T3v1 TALEN藉由使用目標SEQ ID NO:257來達成此目的。

【0965】根據其他實施例，使用非習知RVD修飾TALEN以改良其針對目標基因之活性及特異性，諸如Gautron中所揭示。天然存在之RVD僅涵蓋高變胺基酸位置之潛在多樣性譜系之一小部分。非習知RVD提供天然RVD之替代物且具有新穎的固有靶向特異性特徵，其可用於排除TALEN靶向位點外目標(基因體內之相對於目標序列含有少數錯配之序列)。可藉由產生及篩檢在陣列之既定位置處之兩個高變胺基酸位置處含有替代性胺基酸組合之TALEN之集合來鑑別非習知RVD，如Juillerat等人，《科學報導(*Scientific Reports*)》 5，編號8150 (2015)中所揭示，其以引用之方式併入本文中。接著，可選擇能夠區分錯配位置處存在之核苷酸之非習知RVD，其可防止位點外序列處之TALEN活性，同時仍允許目標位置之適當處理。接著可使用所選擇的非習知RVD置換TALEN中之習知RVD。其中習知RVD已由非習知RVD置換之TALEN之實例

包括由Gautron產生之T3v2及T3v3 PD-1 TALEN。此等TALEN與使用習知RVD之TALEN相比具有增加之特異性。

【0966】根據其他實施例，TALEN可用於引入基因變化以緘默化或降低兩種基因之表現。舉例而言，可產生兩種獨立的TALEN以靶向兩種不同的基因且接著共同使用。由兩種TALEN在其各別基因座及潛在脫靶位點處產生之分子事件可由高通量DNA定序表徵。此實現脫靶位點之分析及可能因使用兩種TALEN而產生之位點之鑑別。基於此資訊，可選擇適當的習知及非習知RVD以工程改造TALEN，其即使在共同使用時亦具有增加之特異性及活性。舉例而言，Gautron揭示組合使用T3v4 PD-1及TRAC TALEN以產生保持強效活體外抗腫瘤功能之雙重基因剔除CAR T細胞。

【0967】在一些實施例中，可使用Gautron之方法或本文中所描述之其他方法基因編輯TIL，接著可藉由本文中所描述之任何程序擴增該等TIL。在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包含以下步驟：

(a) 使用CD3及CD28活化珠粒或抗體將自腫瘤獲得之第一TIL群體活化1至5天，該腫瘤係自患者切除；

(b) 使用轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔來基因編輯至少一部分第一TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第二TIL群體之一部分細胞中之至少

一種免疫檢查點蛋白質之表現；

(c) 視情況培育第二TIL群體；

(d) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3之細胞培養基中培養第二TIL群體來進行第一擴增，以產生第三TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約3至14天以獲得第三TIL群體；

(e) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第三TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第四TIL群體，其中第二擴增進行約7至14天以獲得第四TIL群體，其中第四TIL群體為治療性TIL群體；

(f) 收集自步驟(e)獲得之治療性TIL群體；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(h) 其中在密閉、無菌系統中進行步驟(a)至(g)中之一或多者。

【0968】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及

CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0969】在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包含以下步驟：

(a) 使用CD3及CD28活化珠粒或抗體將自腫瘤獲得之第一TIL群體活化1至5天，該腫瘤係自患者切除；

(b) 在細胞穿孔(cytoporation)培養基中使用轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔來基因編輯至少一部分第一TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第二TIL群體之一部分細胞中之至少一種免疫檢查點蛋白質之表現；

(c) 視情況培育第二TIL群體；

(d) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3之細胞培養基中培養第二TIL群體來進行第一擴增，以產生第三TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約6至9天以獲得第三TIL群體；

(e) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第三TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第四TIL群體，其中第二擴增進行約9至11天以獲得第四TIL群體，其中第四TIL群體為治療性TIL群體；

(f) 收集自步驟(e)獲得之治療性TIL群體；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(h) 其中在密閉、無菌系統中進行步驟(a)至(g)中之一或多者。

【0970】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0971】在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包含以下步驟：

(a) 使用CD3及CD28活化珠粒或抗體將自腫瘤獲得之第一TIL群體活化1至5天，該腫瘤係自患者切除；

(b) 在細胞穿孔培養基中使用轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔來基因編輯至少一部分第一TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第二TIL群體之一部分細胞中之至少一種免疫檢查點蛋白質之表現；

(c) 視情況培育第二TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；

(d) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3之細胞培養基中培養第二TIL群體來進行第一擴增，以產生第三TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約6至9天以獲得第三TIL群體；

(e) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第三TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第四TIL群體，其中第二擴增進行約9至11天以獲得第四TIL群體，其中第四TIL群體為治療性TIL群體；

(f) 收集自步驟(e)獲得之治療性TIL群體；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(h) 其中在密閉、無菌系統中進行步驟(a)至(g)中之一或多者。

【0972】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及

CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0973】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 在細胞穿孔培養基中使用轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔來基因編輯至少一部分第三TIL群體，以獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0974】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或

促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0975】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在酶培養基中消化腫瘤組織以產生腫瘤消化物；

(c) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(d) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(e) 在細胞穿孔培養基中使用轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔來基因編輯至少一部分第三TIL群體，以獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現；

(f) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(g) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0976】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物

包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0977】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 藉由暫時破壞第三TIL群體之細胞膜來基因編輯第三TIL群體，以實現將轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸轉移至第三TIL群體中，從而獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第

二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0978】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 藉由暫時破壞第三TIL群體之細胞膜來基因編輯第三TIL群體，以實現將轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸轉移至第三TIL群體中，從而獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。

【0979】在一些實施例中，培養第四TIL群體之步驟係藉由以下來進行：將第四TIL群體在第二細胞培養基中培養約1-7天之第一時段，在第一時段結束時，將培養物拆分成複數個繼代培養物，將該複數個繼代培養物中之每一者在包含IL-2之第三培養基中培養約3-7天之第二時段，且在第二時段結束時，合併該複數個繼代培養物以得到經擴增之數目之TIL。

【0980】根據其他實施例，TALEN可經特定設計，從而實現能夠靶向基因之特定選擇之目標細胞內之DSB事件之較高發生率。參見美國專利公開案第2013/0315884號。使用此類罕見的切割核酸內切酶可增加實現經轉染的細胞中之目標基因之雙重不活化之幾率，實現產生經工程改造之細胞，諸如T細胞。此外，可將其他催化域與TALEN一起引入以增加突變誘發及增強目標基因不活化。成功地使用美國專利公開案第2013/0315884號中所描述之TALEN工程改造T細胞以使其適用於免疫療法。TALEN亦可用於不活化T細胞中之各種免疫檢查點基因，包括不活化單一T細胞中之至少兩個基因。參見美國專利公開案第2016/0120906號。此外，TALEN可用於不活化編碼免疫抑制劑及T細胞受體之目標之基因，如美國專利公開案第2018/0021379號中所揭示，其以引用之方式併入本文中。此外TALEN可用於抑制β2-微球蛋白(B2M)及/或II類主要組織相容複合物反式活化因子(CIITA)之表現，如美國專利公開案第2019/0010514號中所揭示，其以引用之方式併

入本文中。

【0981】可藉由經由TALE方法永久性基因編輯TIL而緘默化或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【0982】靶向PD-1基因之TALE-核酸酶之非限制性實例提供於下表中。在此等實例中，目標基因體序列含有由15-bp間隔子(以小寫字母展示)分隔之兩個17-鹼基對(bp)長序列(稱為半目標，以大寫字母展示)。每個半目標係由表11中所列之半TALE-核酸酶之重複序列識別。因此，根據特定實施例，根據本發明之TALE-核酸酶識別選自由以下組成之群的目標序列且使其裂解：SEQ ID NO:286及SEQ ID NO:287。TALEN序列及基因編輯方法亦描述於Gautron, 上文所論述中。

表 11 - TALEN PD-1 序列。

TALEN PD-1 第 1 號序列	
目標 PD-1 序列 (SEQ ID NO:286)	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA
重複 PD-1-左 (SEQ ID NO:288)	LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGL TPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLT PQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
重複 PD-1-右 (SEQ ID NO:289)	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASN IGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQA LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNG GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGG KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGG KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
PD-1-左 TALEN (SEQ ID NO:290)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATA CGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCT CGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTT CGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGG GTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAG CGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCG TTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACA GTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGG GAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTT CTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGT GCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGA CCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGT GGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCA CGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC

	CGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAAT ATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCC GGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTC CAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCC GGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAG GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGC CCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACG ATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGC CATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCC AGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCC ACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCTCAG CAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCT GGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGC CGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGG GCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTA TCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAA TCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACAT CGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCC TGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTAC AGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCA TCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGAC ACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGC CGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAAC AAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAG CGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGG CAACTACAAGGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACT GCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGC GAGATGATCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGA GGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA
PD-1-右 TALEN (SEQ ID NO:291)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGA CCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGAT ATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGA GAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACG AGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCG TTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTA TCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGA TCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACA GTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCG

	TGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACG GGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAAGTCGTCGCAATCGC CAGCAATAACGGAGGGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGG TTGCTTCCTGTGCTCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTGAGCAG GTGGTGGCCATCGCAAGTAACATTGGAGGAAAGCAAGCCTTGGA GACAGTGCAGGCCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACACGGCC TCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCAACATCGGGGGG AAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGGCCCTGCTGCCCGTCCTCTGT CAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGCCTCT AATAACGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGAGACTGC TCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCAACAGGTCG TCGCTATTGCCTCAAACAACGGGGGCAAGCAGGCCCTTGAGACT GTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGGCTCACGGGCTCAC TCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCAACGGCGGCGGAAAGC AAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTCCTGCCCGTGCTCTGTCAGG CTCATGGCCTGACACCACAACAAGTCGTGGCCATCGCCAGTAAT AATGGCGGGAAACAGGCTCTTGAGACCGTCCAGAGGCTGCTCCC AGTGCTCTGCCAGGCACACGGGCTGACCCCCCAGCAGGTGGTGG CTATCGCCAGCAATAATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGTC CAGCGCCTGCTGCCAGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCCC GAACAGGTCGTGGCAATCGCCTCCAACGGAGGGAAGCAGGCTCT GGAGACCGTGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGCCCACG GACTCACACCTCAGCAGGTCGTCGCCATTGCCTCTAACAACGGG GGCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCTGTGTT GTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCCATCG CCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCAGAG GTTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCCCAACA GGTCGTCGCCATTGCCAGCAACGGCGGAGGAAAGCAGGCTCTCG AAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTGTCAGGCTCATGGGC TGACCCCCCAGCAAGTGGTGGCTATTGCCTCTAACAATGGAGGC AAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTG CCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCAGGTGGTCGCCATCGCCA GTAACGGCGGGGGCAAACAGGCATTGGAAACCGTCCAGCGCCTG CTTCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGACTGACACCCGAACAGGT GGTGGCCATTGCATCCCATGATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGA CCGTGCAGAGACTCCTGCCAGTGTTGTGCCAAGCTCACGGCCTC ACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGGGGCCG GCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCC GGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTG CCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGG GGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAG GAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCA CGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGG ACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTG TACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGA CGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTGA TCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATC GGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGA CCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTAC CCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCAC TTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACAT CACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGA

	TCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAG GTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGA CTGATAA
TALEN PD-1 第 2 號序列	
目標 PD-1 序列 (SEQ ID NO:287)	TACCTCTGTGGGGCCATctccctggcccccaaGGCGCAGATCAAAGAGA
重複 PD-1-左 (SEQ ID NO:292)	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRL LPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP EQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGG KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
重複 PD-1-右 (SEQ ID NO:293)	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGL TPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLT PEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGG KQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE
PD-1-左 TALEN (SEQ ID NO:294)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATA CGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGCT CGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTT CGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGG GTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAG CGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCG TTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACA GTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGCGG GAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTT CTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCAGT GCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGA CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCA GGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCC ACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTG CCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGT GGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGAC CCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGC AGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAG GCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCA

	CGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCC CCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAG GCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGC CCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATG GCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGC CATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCC AGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGC GCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCC ACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAAT GGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGC TGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCAC GGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGG CGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGC TGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATC GCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGC GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCTCAGCA GGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGCAGGCCGGCGCTGG AGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCG CGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGC GTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATC AGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATC CGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCG AGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTG GAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAG GGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCT ACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACC AAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGA CGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAG CACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAA CTACAAGGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCA ACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAG ATGATCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGA AGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA
PD-1-右 TALEN (SEQ ID NO:295)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGA CCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGAT ATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGA GAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACG AGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCG TTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTA TCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGA TCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAG GCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACA

	GTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCG TGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACG GGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCGAGCAAGTCGTCGCAATCGC CAGCCATGATGGAGGGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCAGCGGT TGCTTCCTGTGCTCTGCCAGGCCCACGGCCTTACCCCTCAGCAGG TGGTGGCCATCGCAAGTAACGGAGGAGGAAAGCAAGCCTTGGA GACAGTGCAGCGCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACACGGCC TCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCCATGACGGGGGG AAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGAGGCTGCTGCCCGTCCTCTG TCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCATCGCCTC TAATGGCGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAGAGACTG CTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCAACAGGTC GTCGCTATTGCCTCAAACGGGGGGGGCAAGCAGGCCCTTGAGAC TGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGGCTCACGGGCTCA CTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCAACGGCGGCGGAAAG CAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTCCTGCCCGTGCTCTGTCAG GCTCATGGCCTGACACCACAACAAGTCGTGGCCATCGCCAGTAA TAATGGCGGGAAACAGGCTCTTGAGACCGTCCAGAGGCTGCTCC CAGTGCTCTGCCAGGCACACGGGCTGACCCCCGAGCAGGTGGTG GCTATCGCCAGCAATATTGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAAACAGT CCAGGCCCTGCTGCCAGTGCTTTGCCAGGCTCACGGGCTCACTCC CCAGCAGGTCGTGGCAATCGCCTCCAACGGCGGAGGGAAGCAG GCTCTGGAGACCGTGCAGAGACTGCTGCCCGTCTTGTGCCAGGC CCACGGACTCACACCTGAACAGGTCGTCGCCATTGCCTCTCACG ATGGGGGCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGGCTGTTGCCT GTGTTGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACAAGTGGTCGCC ATCGCCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGCTCTGGAGACAGTGCA GAGGTTGCTGCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGGCCTGACTCCCCA ACAGGTCGTCGCCATTGCCAGCAACAACGGAGGAAAGCAGGCTC TCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTGTGTCAGGCTCATG GGCTGACCCCCGAGCAAGTGGTGGCTATTGCCTCTAATGGAGGC AAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTG CCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCAGGTGGTCGCCATCGCCA GTAACAACGGGGGCAAACAGGCATTGGAAACCGTCCAGCGCCTG CTTCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGACTGACACCCGAACAGGT GGTGGCCATTGCATCCCATGATGGGGGCAAGCAGGCCCTGGAGA CCGTGCAGAGACTCCTGCCAGTGTTGTGCCAAGCTCACGGCCTC ACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGCCTCAAACGGGGGGGGCCG GCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGCCCTGATCC GGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCTTGGCCTG CCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAGGGATTGG GGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAG GAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCA CGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAGG ACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTG TACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGA CGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGACTACGGCGTGA TCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATC GGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGA CCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAGGTGTAC CCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCAC TTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCAGGCTGAACCACAT

	CACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGA TCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCCTGACCCTGGAGGAG GTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGA CTGATAA

【0983】在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包含以下步驟：

(a) 使用CD3及CD28活化珠粒或抗體將自腫瘤獲得之第一TIL群體活化1至5天，該腫瘤係自患者切除；

(b) 基因編輯至少一部分第一TIL群體，其中基因編輯包含在細胞穿孔培養基中使用靶向PD-1之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔，以獲得第二TIL群體，且其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第二TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(c) 視情況培育第二TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；

(d) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3之細胞培養基中培養第二TIL群體來進行第一擴增，以產生第三TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約6至9天以獲得第三TIL群體；

(e) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第三TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第四TIL群體，其中第二擴增進行約9至11天以獲得第四TIL群體，其中第四TIL群體為治療性TIL群體；

(f) 收集自步驟(e)獲得之治療性TIL群體；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(h) 其中在密閉、無菌系統中進行步驟(a)至(g)中之一或多者。

【0984】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0985】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(b) 基因編輯至少一部分第三TIL群體，其中基因編輯包含在細胞穿孔培養基中使用靶向PD-1之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔，以獲得第四TIL群體，且其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第三TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0986】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0987】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤

組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 藉由暫時破壞第三TIL群體之細胞膜來基因編輯至少一部分第三TIL群體，以實現將靶向PD-1之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸轉移至第三TIL群體中，以獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第三TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0988】在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選

自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0989】在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包含以下步驟：

(a) 使用CD3及CD28活化珠粒或抗體將自腫瘤獲得之第一TIL群體活化1至5天，該腫瘤係自患者切除；

(b) 基因編輯至少一部分第一TIL群體，其中基因編輯包含在細胞穿孔培養基中使用靶向SEQ ID NO:149或SEQ ID NO:150之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔，以獲得第二TIL群體，且其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第二TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(c) 視情況培育第二TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；

(d) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3之細胞培養基中培養第二TIL群體來進行第一擴增，以產生第三TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約6至9天以獲得第三TIL群體；

(e) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第三TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第四TIL群體，其中第二擴增進行約9至11天以獲得第

四TIL群體，其中第四TIL群體為治療性TIL群體；

(f) 收集自步驟(e)獲得之治療性TIL群體；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(h) 其中在密閉、無菌系統中進行步驟(a)至(g)中之一或多者。

【0990】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0991】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群

體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 基因編輯至少一部分第三TIL群體，其中基因編輯包含在細胞穿孔培養基中使用靶向SEQ ID NO:149或SEQ ID NO:150之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸之電致孔，以獲得第四TIL群體，且其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第三TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0992】在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0993】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤

組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 藉由暫時破壞第三TIL群體之細胞膜來基因編輯至少一部分第三TIL群體，以實現將靶向SEQ ID NO:149或SEQ ID NO:150之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼核酸轉移至第三TIL群體中，以獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第三TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0994】在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選

自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0995】在一些實施例中，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法包含以下步驟：

(a) 使用CD3及CD28活化珠粒或抗體將自腫瘤獲得之第一TIL群體活化1至5天，該腫瘤係自患者切除；

(b) 基因編輯至少一部分第一TIL群體，其中基因編輯包含在細胞穿孔培養基中使用根據SEQ ID NO:157及SEQ ID NO:158或SEQ ID NO:153及SEQ ID NO:154之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼mRNA之電致孔，以獲得第二TIL群體，且其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第二TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(c) 視情況培育第二TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；

(d) 藉由在包含IL-2及視情況選用之OKT-3之細胞培養基中培養第二TIL群體來進行第一擴增，以產生第三TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增，其中第一擴增進行約6至9天以獲得第三TIL群體；

(e) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充第三TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以

產生第四TIL群體，其中第二擴增進行約9至11天以獲得第四TIL群體，其中第四TIL群體為治療性TIL群體；

(f) 收集自步驟(e)獲得之治療性TIL群體；

(g) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(h) 其中在密閉、無菌系統中進行步驟(a)至(g)中之一或多者。

【0996】在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0997】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 基因編輯至少一部分第三TIL群體，其中基因編輯包含在細胞穿孔培養基中使用根據SEQ ID NO:157及SEQ ID NO:158或SEQ ID NO:153及SEQ ID NO:154之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼mRNA之電致孔，以獲得第四TIL群體，且其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第三TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【0998】在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【0999】在一些實施例中，本文中提供用於製備經擴

增之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法，其包含：

(a) 獲得及/或接受來源於自個體或患者切除之腫瘤組織之第一TIL群體；

(b) 在包含IL-2之第一細胞培養基中培養第一TIL群體約3-9天，以產生第二TIL群體；

(c) 使用抗CD3及抗CD28珠粒或抗體活化第二TIL群體1-7天，以產生第三TIL群體；

(d) 藉由暫時破壞第三TIL群體之細胞膜來基因編輯至少一部分第三TIL群體，以實現將根據SEQ ID NO:157及SEQ ID NO:158或SEQ ID NO:153及SEQ ID NO:154之轉錄活化子樣效應物核酸酶編碼mRNA轉移至第三TIL群體中，以獲得第四TIL群體，其中基因編輯實現細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，及抑制第三TIL群體之一部分細胞中之PD-1之表現；

(e) 視情況培育第四TIL群體，其中在約30-40℃及約5% CO_2下進行培育；及

(f) 在包含抗原呈現細胞(APC)、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基中培養第四TIL群體約5-15天，以產生經擴增之數目之TIL。

【1000】在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫

調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1001】可藉由經由TALE方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之其他非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配位體mDLL1。

【1002】用於藉由TALE方法來改變目標基因序列之表現及可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利案第8,586,526號中，其以引用之方式併入本文中。此等所揭示之實例包括使用具有兩個或更多個TALE-重複單元之非天然存在之DNA結合多肽，該TALE-重複單元含有重複RVD、由TALE蛋白質之殘基製成之N帽多肽及由TALE蛋白質之全長C端區域之片段製成之C帽多肽。

【1003】可用於有效進行TALEN介導之基因整合及不活化以及可根據本發明之實施例使用之TALEN設計及設計策略、活性評估、篩檢策略及方法之實例描述於Valton等人，《方法(*Methods*)》，**2014**, 69, 151-170中，其以引用之

方式併入本文中。

【1004】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收

集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送TALE核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現及調節至少一種免疫檢查點蛋白質及/或黏著分子之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1005】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中轉移至少一種基因編輯器之步驟包含遞送TALE核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現及調節至少一種免疫檢查點蛋白質及/或黏著分子之表現。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1006】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來

進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔步驟，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送TALE核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現及抑制PD-1及LAG-3之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之細胞介素。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1007】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉

變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中轉移至少一種基因編輯器之步驟包含遞送TALE核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及LAG-3之表現。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台

為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

3. 鋅指方法

【1008】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A)之任何實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由鋅指或鋅指核酸酶方法基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法可引起細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，且視情況引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之緘默或降低。或者，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法可引起細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現，且視情況引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之增強。

【1009】呈保守ββα組態之個別鋅指含有大約30個胺基酸。α-螺旋表面上之幾個胺基酸通常以不同的選擇性水準接觸DNA主溝槽中的3 bp。鋅指具有兩個蛋白域。第一域為DNA結合域，其包括真核轉錄因子且含有鋅指。第二域為核酸酶域，其包括FokI限制酶且負責催化裂解DNA。

【1010】個別ZFN之DNA結合域通常含有介於三個與六個之間的個別鋅指重複且各自可識別介於9個與18個之間的鹼基對。若鋅指域對其預期目標位點具有特異性，則甚至一對識別總共18個鹼基對之3指ZFN理論上可靶向哺乳動物基因體中之單個基因座。一個產生新的鋅指陣列之方法為組合具有已知特異性之較小鋅指「模組」。最常見的模組組裝過程涉及組合三個分開的可各自識別3個鹼基對DNA序列之鋅指，以產生可識別9個鹼基對目標位點之3指陣列。替代地，可使用基於選擇之方法，諸如寡聚池工程改造(oligomerized pool engineering；OPEN)，來自隨機分組文庫選擇新的鋅指陣列，該等隨機分組文庫考慮介於鄰近指之間的上下文依賴性相互作用(context-dependent interaction)。工程改造的鋅指為可商購的；Sangamo Biosciences(美國加利福尼亞州裡奇蒙(Richmond))已與西格瑪奧瑞奇(Sigma-Aldrich)(美國密蘇裡州聖路易斯(St.Louis, MO, USA))合作開發一種用於鋅指構築之專用平台(CompoZr®)。

【1011】可藉由經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而緘默化或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、TGIT、

TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【1012】可藉由經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配位體mDLL1。

【1013】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於以下中：美國專利案第6,534,261號、第6,607,882號、第6,746,838號、第6,794,136號、第6,824,978號、第6,866,997號、第6,933,113號、第6,979,539號、第7,013,219號、第7,030,215號、第7,220,719號、第

7,241,573 號 、 第 7,241,574 號 、 第 7,585,849 號 、 第 7,595,376號 、 第 6,903,185號 及 第 6,479,626號 ， 其 以 引 用 之 方 式 併 入 本 文 中 。

【1014】藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之其他實例描述於Beane等人，《分子療法》，**2015**, 23 1380-1390中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1015】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二

TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送鋅指核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現以及調節至少一種免疫檢查點蛋白質及/或黏著分子之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由

以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1016】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中轉移至少一種基因編輯器之步驟包含遞送鋅指核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現以及調節至少一種免疫檢查點蛋白質及/或黏著分子之表現。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1017】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球

(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群

體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送鋅指核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及LAG-3之表現。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

4. Cas-CLOVER方法

【1018】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如，過程2A)之任何實施例或如PCT/US2017/058610、PCT/US2018/012605或PCT/US2018/012633中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由Cas-CLOVER方法基因編輯至少一部分TIL。根據特

定實施例，在TIL擴增過程期間使用Cas-CLOVER方法可引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之緘默或降低。或者，在TIL擴增過程期間使用Cas-CLOVER方法可引起至少一部分治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之增強。

【1019】Cas-CLOVER為一種二聚體、高保真位點特異性核酸酶(SSN)，其由催化死亡SpCas9(dCas9)與來自梭菌Clo051 IIs型限制性核酸內切酶之核酸酶域之融合組成(Madison等人，「Cas-CLOVER is a novel high-fidelity nuclease for safe and robust generation of T SCM-enriched allogeneic CAR-T cells」，《分子療法-核酸(Molecular Therapy - Nucleic Acids)》，2022)。此得到一種核酸酶，其活性基於藉由RNA引導識別兩個相鄰20-nt目標序列而實現之Clo051核酸酶域之二聚化來判定。與配對切口酶方法不同，例如，在使用Cas9-D10A突變體時，單體Cas-CLOVER不會引入切口或DSB。Cas-CLOVER已證明具有低脫靶核酸酶活性。

【1020】例示性Cas-CLOVER系統包括在WO2019/126578中描述之彼等，該文獻之內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，Cas-CLOVER系統包含融合蛋白質，該融合蛋白質包含DNA定位組分及效應分子，基本上由其組成或由其組成。

DNA定位組分

【1021】在一些實施例中，DNA定位組分能夠結合特定DNA序列。在一些實施例中，DNA定位組分係選自例如DNA結合寡核苷酸、DNA結合蛋白、DNA結合蛋白複合物及其組合。其他合適之DNA結合組分將由一般技術者所認識。

【1022】在一些實施例中，DNA定位組分包含針對基因體中之一或多個特定基因座之寡核苷酸。寡核苷酸可選自DNA、RNA、DNA/RNA雜交體及其組合。

【1023】在一些實施例中，DNA定位組分包含核苷酸結合蛋白或蛋白質複合物，其在結合至目標DNA時結合寡核苷酸。蛋白質或蛋白質複合物可能能夠識別選自RNA-DNA異源雙鏈體、R環或其組合之特徵。在一些實施例中，DNA定位組分包含能夠識別選自Cas9、級聯複合物、RecA、RNase H、RNA聚合酶、DNA聚合酶或其組合之R環之蛋白質或蛋白質複合物。在一些實施例中，DNA定位組分包含能夠結合至目標DNA之工程改造蛋白質。在一些實施例中，DNA定位組分包含能夠結合選自大範圍核酸酶、鋅指陣列、轉錄活化子樣(TAL)陣列及其組合之DNA序列之蛋白質。在一些實施例中，DNA定位組分包含含有天然存在之DNA結合域之蛋白質。在一些實施例中，DNA定位組分包含bZIP域、螺旋-環-螺旋、螺旋-轉角-螺旋、HMG-盒、白胺酸拉鍊、鋅指或其組合。在一些實施例中，DNA定位組分包含針對基因體中特定基因座之寡核苷酸。例示性寡核苷酸包括但不限於DNA、RNA、

DNA/RNA雜交體及其任何組合。在一些實施例中，DNA定位組分包含能夠識別選自RNA-DNA異源雙鏈體、R環及其任何組合之特徵之蛋白質或蛋白質複合物。能夠識別R環之例示性蛋白質或蛋白質複合物包括但不限於Cas9、級聯複合物、RecA、RNase H、RNA聚合酶、DNA聚合酶及其任何組合。在一些實施例中，能夠識別R環之蛋白質或蛋白質複合物包含Cas9。在一些實施例中，DNA定位組分包含能夠結合選自大範圍核酸酶、鋅指陣列、TAL陣列及其任何組合之DNA序列之蛋白質。在一些實施例中，DNA定位組分包含針對基因體中目標位置之寡核苷酸及能夠結合至目標DNA序列之蛋白質。

【1024】在一些實施例中，DNA定位組分包含至少一種嚮導RNA(gRNA)，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，DNA定位組分包含兩個gRNA，基本上由其組成或由其組成，其中第一gRNA特異性結合至雙股DNA目標序列之第一股且第二gRNA特異性結合至雙股DNA目標序列之第二股。或者，在實施例中，DNA定位組分包含轉錄活化子樣效應物核酸酶(TALEN，亦稱為TAL蛋白)之DNA結合域，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，DNA定位組分包含源自黃單孢菌屬或羅氏桿菌屬(Ralstonia)之TALEN或TAL蛋白之DNA結合域，基本上由其組成或由其組成。

效應分子

【1025】在一些實施例中，效應分子能夠在基因體中之特定基因座處產生預定效應。例示性效應分子，但不限於轉錄因子(活化子或抑制子)、染色質重塑因子、核酸酶、核酸外切酶、核酸內切酶、轉位酶、甲基轉移酶、去甲基化酶、乙醯轉移酶、去乙醯酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重組酶、連接酶、拓撲異構酶、促旋酶、解旋酶、螢光團或其任何組合。

【1026】在一些實施例中，效應分子包含轉位酶。在一些實施例中，效應分子包含PB轉位酶(PBase)。在一些實施例中，效應分子包含核酸酶。核酸酶之非限制性實例包括限制性核酸內切酶、歸巢核酸內切酶、S1核酸酶、綠豆核酸酶、胰DNA酶I、微球菌核酸酶、酵母HO核酸內切酶或其任何組合。在某些實施例中，效應分子包含限制性核酸內切酶。在某些實施例中，效應分子包含IIS型限制性核酸內切酶。在一些實施例中，效應分子包含核酸內切酶。核酸內切酶之非限制性實例包括AciI、Mn1I、AlwI、BbvI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HgaI、HphI、HpyAV、Mbo1I、My1I、PleI、SfaNI、AcuI、BciVI、BfuAI、BmgBI、BmrI、BpmI、BpuEI、BsaI、BseRI、BsgI、BsmI、BspMI、BsrBI、BsrBI、BsrDI、BtgZI、BtsI、EarI、EciI、MmeI、NmeAIII、BbvCI、Bpu10I、BspQI、SapI、BaeI、BsaXI、CspCI、BfiI、MboII、Acc36I及Clo051。在一些實施例中，效應分子包含BmrI、BfiI或Clo051。

【1027】在一些實施例中，效應分子包含均二聚體或雜二聚體，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子包含核酸酶、視情況核酸內切酶，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含Cas9、Cas9核酸酶域或其片段，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，Cas9為催化非活性或「失活」之Cas9 (dCas9 (WO2019/126578之SEQ ID NO: 302及303))。在一些實施例中，Cas9為Cas9之催化非活性或「失活」之核酸酶域。在一些實施例中，dCas9由源自全長、催化失活之Cas9之較短序列編碼，在本文中稱為「小」dCas9或dSaCas9 (WO2019/126578之SEQ ID NO: 23)。

【1028】在融合蛋白質之一些實施例中，效應分子包含一或多種II型核酸酶之均二聚體或雜二聚體，基本上由其組成或由其組成。在融合蛋白質之一些實施例中，效應分子包含II型核酸酶之均二聚體或雜二聚體，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，II型核酸酶包含AciI、Mn1I、AlwI、BbvI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HgaI、HphI、HpyAV、Mbo1I、My1I、PleI、SfaNI、AcuI、BciVI、BfuAI、BmgBI、BmrI、BpmI、BpuEI、BsaI、BseRI、BsgI、BsmI、BspMI、BsrBI、BsrBI、BsrDI、BtgZI、BtsI、EarI、EciI、MmeI、NmeAIII、BbvCI、Bpu10I、BspQI、SapI、BaeI、BsaXI、CspCI、BfiI、MboII、Acc36I或Clo051中之一或多者。

【1029】在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含Clo051、BfiI或BmrI，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含與Clo051、BfiI或BmrI形成雜二聚體之Cas9、Cas9核酸酶域或其片段，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含與Clo051形成雜二聚體之催化失活形式之Cas9(例如dCas9或dSaCas9)或其片段，基本上由其組成或由其組成。例示性Clo051核酸酶域可包含以下胺基酸序列，基本上由其組成或由其組成：

EGIKSNISLLKDELRGQISHISHEYLSLIDLAFDSKQNRLFEMKVLELL VNEYGFKGRHLGGSRKPDGIVYSTTLEDNFGIIVDTKAYSEGYSLPIS QADEMERYVRENSNRDEEVNPNKWWENFSEEVKKYYFVFISGSFKG KFEEQLRRLSMTTGVNGSAVNVVNLLLGAEKIRSGEMTIEELERAMF NNSEFILKY (SEQ ID NO:386，WO2018/169948之SEQ ID NO: 34)。

【1030】在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含源自黃單孢菌屬或羅氏桿菌屬之TALEN或TAL蛋白之DNA結合域，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含與Clo051、BfiI或BmrI形成均二聚體或雜二聚體之源自黃單孢菌屬或羅氏菌屬之TALEN或TAL蛋白之DNA結合域，基本上由其

組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子，包括包含均二聚體或雜二聚體之彼等效應分子，包含與Clo051形成均二聚體或雜二聚體之源自黃單孢菌屬或羅氏菌屬之TALEN或TAL蛋白之DNA結合域，基本上由其組成或由其組成。

連接

【1031】在一些實施例中，融合蛋白質包含DNA定位組分及效應分子，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，編碼融合蛋白質之一或多種組分之核酸序列可於例如表現載體中可操作地連接。在一些實施例中，融合蛋白質為嵌合蛋白。在一些實施例中，融合蛋白質由一或多個重組核酸序列編碼。在一些實施例中，融合蛋白質亦包括連接子區以可操作地連接融合蛋白質之兩個組分。例如，在實施例中，融合蛋白質包含由連接子區可操作地連接之DNA定位組分及效應分子，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，DNA定位組分、連接子區及效應分子可由插入表現卡匣及/或表現載體中之一或多個核酸序列編碼，使得核酸序列之轉譯產生融合蛋白質。在實施例中，融合蛋白質可包含DNA定位組分與效應分子之間的非共價連接。非共價連接可包含抗體、抗體片段、抗體模擬物或支架蛋白。

融合蛋白質

【1032】在一些實施例中，DNA定位組分包含至少一種gRNA，基本上由其組成或由其組成，且效應分子包含Cas9、Cas9核酸酶域或其片段，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，DNA定位組分包含至少一種gRNA，基本上由其組成或由其組成，且效應分子包含失活之Cas9(dCas9)或失活之核酸酶域，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，DNA定位組分包含至少一種gRNA，基本上由其組成或由其組成，且效應分子包含失活之小Cas9(dSaCas9)，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，效應分子包含Cas9、dCas9、dSaCas9或其核酸酶域及第二核酸內切酶，基本上由其組成或由其組成。第二核酸內切酶可包含IIS型核酸內切酶，基本上由其組成或由其組成，該IIS型核酸內切酶包括但不限於AciI、Mn1I、AlwI、BbvI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HgaI、HphI、HpyAV、Mbo1I、My1I、PleI、SfaNI、AcuI、BciVI、BfuAI、BmgBI、BmrI、BpmI、BpuEI、BsaI、BseRI、BsgI、BsmI、BspMI、BsrBI、BsrBI、BsrDI、BtgZI、BtsI、EarI、EciI、MmeI、NmeAIII、BbvCI、Bpu10I、BspQI、SapI、BaeI、BsaXI、CspCI、BfiI、MboII、Acc36I、FokI或Clo051中之一或多者。

【1033】在融合蛋白質之一些實施例中，DNA定位組分包含轉錄活化子樣效應物核酸酶(TALEN，亦稱為TAL蛋白)之DNA結合域，基本上由其組成或由其組成，且效應子分子包含核酸內切酶，基本上由其組成或由其組成。

在本揭示案之融合蛋白質之一些實施例中，DNA定位組分包含源自黃單孢菌屬或羅氏桿菌屬之TALEN或TAL蛋白之DNA結合域，基本上由其組成或由其組成，且效應分子包含IIS型核酸內切酶，基本上由其組成或由其組成，該IIS型核酸內切酶包括但不限於AciI、Mn1I、AlwI、BbvI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HgaI、HphI、HpyAV、Mbo1I、My1I、PleI、SfaNI、AcuI、BciVI、BfuAI、BmgBI、BmrI、BpmI、BpuEI、BsaI、BseRI、BsgI、BsmI、BspMI、BsrBI、BsrBI、BsrDI、BtgZI、BtsI、EarI、EciI、MmeI、NmeAIII、BbvCI、Bpu10I、BspQI、SapI、BaeI、BsaXI、CspCI、BfiI、MboII、Acc36I或Clo051中之一或多者。

【1034】在某些實施例中，例示性dCas9-Clo051融合蛋白質可包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：WO2019/126578之SEQ ID NO: 305或307之胺基酸序列，或WO2019/126578之SEQ ID NO: 306或308之核酸序列。

構築體

【1035】在一些實施例中，核酸酶域包含dCas9及Clo051，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，核酸酶域包含dSaCas9及Clo051，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，核酸酶域包含黃單孢菌屬-TALE及Clo051，基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，核酸酶域包含羅氏桿菌屬-TALE及Clo051，基本上由

其組成或由其組成。在一些實施例中，融合蛋白質包含dCas9-Clo051、dSaCas9-Clo051、黃單孢菌屬-TALE-Clo051或羅氏桿菌屬-TALE-Clo051。在一些實施例中，編碼融合蛋白質之載體包含Csy4-T2A-Clo051-G4S連接子-dCas9(化膿性鏈球菌(Streptoccocus pyogenes))或pRT1-Clo051-dCas9雙NLS。

【1036】根據一些實施例，Cas-CLOVER系統包含含有DNA定位組分及效應分子之融合蛋白質，其中DNA定位組分與TIL中DNA分子之目標序列雜交，其中DNA分子編碼且TIL表現至少一種免疫檢查點分子，且效應分子切割DNA分子，藉此改變至少一種免疫檢查點分子之表現。

【1037】根據特定實施例，Cas-CLOVER方法包含藉由引入Cas-CLOVER系統(例如，dCas9-Clo051、dSaCas9-Clo051、黃單孢菌屬-TALE-Clo051或羅氏桿菌屬-TALE-Clo051融合蛋白質)來緘默化或降低TIL中之一或多種免疫檢查點基因之表現，該Cas-CLOVER系統對免疫檢查點基因之目標DNA序列具有特異性。融合蛋白質可作為DNA、mRNA、蛋白質遞送。在基因體與Cas-CLOVER系統接觸後，一或多股目標雙股DNA可經切割。若在存在一或多種DNA修復路徑或其組分之情況下進行切割，則Cas-CLOVER方法會中斷基因表現或藉由插入、缺失或取代一或多個鹼基對來修飾基因體序列。可藉由非同源末端接合(NHEJ，一種通常引起DNA中之插入或缺失(插入/缺失)之機制)來修復細胞中之DSB。插入/缺失通常引起讀框轉

移，產生功能喪失型對偶基因；舉例而言，藉由在目標基因之開放閱讀框架(ORF)內引起早熟終止密碼子。根據某些實施例，結果為目標免疫檢查點基因內之功能損失型突變。

【1038】或者，代替NHEJ，可藉由同源定向修復(HDR)來修復由Cas-CLOVER系統誘導之DSB。儘管NHEJ介導之DSB修復通常破壞基因之開放閱讀框架，但可使用同源定向修復(HDR)來產生在單一核苷酸變化至大型插入範圍內之特定核苷酸變化。根據一些實施例，使用HDR藉由將含有所需序列之DNA修復模板遞送至具有Cas-CLOVER系統之TIL中來基因編輯免疫檢查點基因。修復模板較佳含有緊鄰目標基因之上游及下游之所需編輯以及其他同源序列(通常稱為左及右同源臂)。

【1039】可藉由經由Cas-CLOVER方法永久性基因編輯TIL而緘默化或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、

GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。

【1040】藉由Cas-CLOVER方法改變目標基因序列表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於WO2019126578、US2017/0107541、US2017/0114149、US2018/0187185及美國專利案第10,415,024號中，其內容以全文引用之方式併入本文中。用於執行Cas-CLOVER方法之資源，諸如CLOVER mRNA及Cas-CLOVER mRNA構築體，可購自諸如Demeetra及Hera Biolabs之公司。

【1041】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種包含Cas-CLOVER系統之基因編輯器系統，該至少一種基因編輯器系統調節第二TIL群體之複數個細胞中至少一種檢查點蛋白質之表現。

【1042】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體以獲得第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 對第二TIL群體進行無菌電致孔，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中電致孔步驟包含遞送至少一種包含Cas-CLOVER系統之基因編輯器系統，該至少一種基因編輯器系統抑制第二TIL群體之複數個細胞中至少一種檢查點蛋白質之表現。

【1043】根據一些實施例，用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法包含：

(a) 藉由將自患者獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2且視情況包含OKT-3及/或4-1BB促效劑抗體之細胞培養基中培養第一TIL群體約3至11天來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行第一擴增；

(d) 藉由添加OKT-3且培養約1至3天來刺激第二TIL群體，其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(e) 暫時破壞第二TIL群體之細胞膜，以實現將至少一種基因編輯器轉移至第二TIL群體中之複數個細胞中；

(f) 將第二TIL群體靜置約1天；

(g) 藉由用額外的IL-2、視情況選用之OKT-3抗體、

視情況選用之OX40抗體及抗原呈現細胞(APC)補充第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中第二擴增進行約7至11天以獲得第三TIL群體，其中在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行第二擴增，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(g)獲得之治療性TIL群體以得到所收集之TIL群體，其中自步驟(g)至步驟(h)之轉變係在不開放系統之情況下進行，其中所收集之TIL群體為治療性TIL群體；

(i) 將所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(h)至(i)之轉移係在不開放系統之情況下進行；及

(j) 視情況使用冷凍保存介質來冷凍保存所收集之TIL群體，

其中轉移至少一種基因編輯器之步驟包含遞送鋅指核酸酶系統，其實現第二TIL群體之複數個細胞之細胞表面處之至少一種免疫調節組合物之表現以及抑制PD-1及LAG-3之表現。在一些實施例中，使用微流體平台暫時破壞第三TIL群體之細胞膜。在一些實施例中，微流體平台為SQZ無載體微流體平台。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例

如，CD40L或促效性CD40結合域)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。

【1044】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟係藉由以下進行：培養第三或第四TIL群體或進行第二擴增約1-7天之第一時段，在第一時段結束時，將培養物拆分成複數個繼代培養物，將該複數個繼代培養物中之每一者與額外的IL-2一起培養約3-7天之第二時段，且在第二時段結束時，合併該複數個繼代培養物以得到經擴增之數目之TIL或治療性TIL群體。

【1045】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天。

【1046】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-11天。

【1047】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-11天。

【1048】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-11天。

【1049】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7-11天。

【1050】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約8-11天。

【1051】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約9-11天。

【1052】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約10-11天。

【1053】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-10天。

【1054】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-10天。

【1055】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-10天。

【1056】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7-10天。

【1057】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約8-10天。

【1058】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約9-10天。

【1059】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-9天。

【1060】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-9天。

【1061】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-9天。

【1062】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7-9天。

【1063】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約8-9天。

【1064】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3-8天。

【1065】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3-7天。

【1066】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3-6天。

【1067】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3-5天。

【1068】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3-4天。

【1069】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-8天。

【1070】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-7天。

【1071】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-6天。

【1072】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-6天。

【1073】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-8天。

【1074】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-7天。

【1075】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5-6天。

【1076】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-8天。

【1077】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6-7天。

【1078】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7-8天。

【1079】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4-5天。

【1080】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約3天。

【1081】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約4天。

【1082】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約5天。

【1083】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約6天。

【1084】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約7天。

【1085】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約8天。

【1086】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約9天。

【1087】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約10天。

【1088】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第一TIL群體之步驟或第一擴增步驟進行約11天。

【1089】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。

【1090】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約2-7天。

【1091】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約3-7天。

【1092】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約4-7天。

【1093】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約5-7天。

【1094】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約6-7天。

【1095】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1-6天。

【1096】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1-5天。

【1097】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1-4天。

【1098】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1-3天。

【1099】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1-2天。

【1100】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約2-6天。

【1101】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約3-6天。

【1102】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約4-6天。

【1103】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約5-6天。

【1104】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約3-5天。

【1105】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約3-4天。

【1106】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約2-5天。

【1107】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約2-4天。

【1108】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約2-3天。

【1109】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約4-5天。

【1110】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約1天。

【1111】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約2天。

【1112】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約3天。

【1113】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約4天。

【1114】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約5天。

【1115】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約6天。

【1116】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得活化步驟進行約7天。

【1117】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得刺激步驟進行約1天、2天或3天。

【1118】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得刺激步驟進行約1-2天。

【1119】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得刺激步驟進行約2-3天。

【1120】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得刺激步驟進行約1天。

【1121】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得刺激步驟進行約2天。

【1122】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得刺激步驟進行約3天。

【1123】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或15天。

【1124】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-15天。

【1125】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-15天。

【1126】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-15天。

【1127】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9-15天。

【1128】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約10-15天。

【1129】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約11-15天。

【1130】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約12-15天。

【1131】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約13-15天。

【1132】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約14-15天。

【1133】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-14天。

【1134】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-14天。

【1135】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-14天。

【1136】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-14天。

【1137】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9-14天。

【1138】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約10-14天。

【1139】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約11-14天。

【1140】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約12-14天。

【1141】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約13-14天。

【1142】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-13天。

【1143】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-12天。

【1144】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-11天。

【1145】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-10天。

【1146】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-9天。

【1147】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-8天。

【1148】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-7天。

【1149】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5-6天。

【1150】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-13天。

【1151】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-12天。

【1152】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-11天。

【1153】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-10天。

【1154】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-9天。

【1155】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-8天。

【1156】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6-7天。

【1157】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-13天。

【1158】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-12天。

【1159】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-11天。

【1160】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-10天。

【1161】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-9天。

【1162】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7-8天。

【1163】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-13天。

【1164】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-12天。

【1165】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-11天。

【1166】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-10天。

【1167】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8-9天。

【1168】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9-13天。

【1169】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9-12天。

【1170】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9-11天。

【1171】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9-10天。

【1172】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約10-13天。

【1173】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約10-12天。

【1174】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約10-11天。

【1175】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約11-13天。

【1176】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約11-12天。

【1177】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約12-13天。

【1178】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約5天。

【1179】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約6天。

【1180】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約7天。

【1181】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約8天。

【1182】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約9天。

【1183】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約10天。

【1184】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約11天。

【1185】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約12天。

【1186】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約13天。

【1187】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約14天。

【1188】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之前述段落中之任一者中所描述之方法，使得培養第三或第四TIL群體之步驟或第二擴增步驟進行約15天。

5. 短髮夾RNA(shRNA)方法

【1189】在一些實施例中，使用短髮夾RNA(shRNA)修飾本文中所描述之標的TIL以減少內源性蛋白質表現。在一些實施例中，將編碼抑制內源性基因表現之RNA(例如，shRNA)之核酸引入標的TIL。

【1190】如本文中所用之「shRNA」為短髮夾RNA，其為產生緊密髮夾彎之RNA序列，其亦可用於經由RNA干

擾使基因表現緘默。shRNA於細胞中之表現通常藉由遞送質體或經由病毒或細菌載體來完成。shRNA為一種有利之RNAi介體，因為其具有相對較低之降解及周轉率。

【1191】shRNA設計通常分為兩種形式，簡單的莖環shRNA及microRNA適應之shRNA。基本shRNA以前驅microRNA(pre-miRNA)為模型，且選殖至病毒載體中，在此其在啟動子之控制下進行轉錄。例示性啟動子包括但不限於RNA聚合酶II(Pol II)及聚合酶III(Pol III)啟動子(例如，U6及H1啟動子)。shRNA以長度為約40-70個核苷酸之單股份子形式產生，且形成由19-29個鹼基對之雙股RNA區域(莖)與單股RNA區域(環)橋接組成之莖環結構及短的3'懸垂。一旦經轉錄，shRNA即離開細胞核，在環處由細胞質中之核酸酶Dicer切割，且進入RNA誘導之緘默複合物(RISC)以指導目標互補mRNA之切割及後續降解。microRNA適應之shRNA由經內源性microRNA之環及側翼序列圍繞之具有microRNA樣錯配之shRNA莖結構組成。microRNA適應之shRNA自RNA聚合酶ll(Pol ll)啟動子轉錄，經細胞核中之內源性RNase III Drosha酶切割，且隨後輸出至細胞質，在此其經Dicer加工且加載至RISC複合物中。研究表明，使用由Drosha及Dicer加工之microRNA支架可促進更有效之加工且降低活體內RNAi之毒性。在一些實施例中，用於TIL修飾之shRNA為簡單的莖環shRNA。在一些實施例中，用於TIL修飾之shRNA為microRNA適應之shRNA。

【1192】在一些實施例中，本文中所揭示之用於標的TIL修飾之shRNA包含與mRNA目標蛋白質之至少13個核苷酸、至少14個核苷酸、至少15個核苷酸、至少16個核苷酸、至少17個核苷酸、至少18個核苷酸、至少19個核苷酸、至少20個核苷酸、至少21個核苷酸、至少22個核苷酸、至少23個核苷酸、至少24個核苷酸、至少25個核苷酸、至少26個核苷酸、至少27個核苷酸、至少28個核苷酸、至少29個核苷酸或至少30個核苷酸互補之序列。在一些實施例中，本文中所揭示之用於標的TIL修飾之shRNA包含與mRNA目標蛋白質之13個核苷酸、14個核苷酸、15個核苷酸、16個核苷酸、17個核苷酸、18個核苷酸、19個核苷酸、20個核苷酸、21個核苷酸、22個核苷酸、23個核苷酸、24個核苷酸、25個核苷酸、26個核苷酸、27個核苷酸、28個核苷酸、29個核苷酸或30個核苷酸互補之序列。

【1193】在一些實施例中，用於TIL修飾之shRNA之長度為40-50個核苷酸，長度為45-55個核苷酸，長度為50-60個核苷酸，長度為55-65個核苷酸或長度為60-70個核苷酸。

【1194】可使用任何合適方法將shRNA遞送至細胞(例如，本文中所提供之經修飾之TIL)。對於質體，可採用典型轉染方法，諸如使用脂質轉染試劑或電致孔。在一些實施例中，慢病毒粒子用於將shRNA引入細胞中以進行修飾。在一些實施例中，包括可選擇標記物以允許消除培養物中未用shRNA成功轉染或轉導之細胞，進而允許包括

shRNA之經修飾細胞之純培養物。

【1195】在一些實施例中，shRNA用於降低本文中所描述之標的TIL中之免疫檢查點(例如，本文中所提供之任何免疫檢查點蛋白)的表現。可藉由經由shRNA方法永久性基因編輯TIL而緘默化或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、TGIT、TET2、TGFβR2、PRA、BAFF(BR3)、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、BCOR及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，將一或多種shRNA引入TIL中以修飾以下免疫檢查點蛋白質中之一或多者之表現：PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIGIT、TIM-3、Cish、TGFβ、PKA、CBLB、TOX及其任何組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。可用於修飾標的TIL之例示性shRNA序列描述

於實例中。

V. 擴增包括周邊血液(PBL)及/或骨髓(MIL)之治療性T細胞之方法的實施例

A. 擴增來自周邊血液之周邊血液淋巴球(PBL)之方法

【1196】PBL方法1。在本發明之一些實施例中，PBL係使用本文所描述之方法擴增。在本發明之一些實施例中，該方法包含獲得來自全血之PBMC樣品。在一些實施例中，該方法包含藉由使用非CD19+級份之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。在第0天，以1:1比率(珠粒:細胞)將純T細胞與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以及3000 IU/mL IL-2一起培養。在第4天，將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第7天，再用抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率(珠粒:細胞)刺激培養物，且將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第14天收集PBL，移除珠粒且對PBL進行計數及表現型分析。在一些實施例中，該方法包含藉由使用非CD19+級份之基於磁珠之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。

【1197】在本發明之一些實施例中，PBL方法1如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣品解凍且計算PBMC之數目。使用人類泛T細胞分離套組與LS管柱(美天旎生物技術)分離T細胞。對經分離之T細胞進行計數且在GRex 24孔盤中以5×10^5個細胞/孔接種，且以1:1比率與

DynaBeads®(抗CD3/抗CD28)及3000 IU/mL IL-2一起在每孔總共8 ml CM2培養基中共同培養。在第4天，將各孔中之培養基由CM2更換成具有新鮮的3000 IU/mL IL-2之AIM-V。在第7天，收集經擴增之細胞，計數，接著在GRex I0M瓶中以每瓶15×10^6個細胞，以1:1比率(珠粒:細胞)與DynaBeads®及3000 IU/mL IL-2一起在總共100 ml AIM-V培養基中培養。在第11天，將培養基更換成補充有新鮮的3000 IU/mL IL-2之CM-4培養基。在第14天，使用DynaMag磁體(DynaMag™-15)移除DynaBeads®且對細胞進行計數。

【1198】在本發明之一些實施例中，PBL方法1如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣品解凍且計算PBMC之數目。使用人類泛T細胞分離套組與LS管柱(美天旎生物技術)分離T細胞。對經分離之T細胞進行計數且在GRex 24孔盤中以5×10^5個細胞/孔接種，且以1:1比率與DynaBeads®(抗CD3/抗CD28)及3000 IU/mL IL-2一起在每孔總共8 ml CM2培養基中共同培養。在第4天，將各孔中之培養基由CM2更換成具有新鮮的3000 IU/mL IL-2之AIM-V。在第7天，收集PBL，計數，接著在新的GRex-24孔盤中以1×10^6個細胞/孔，以1:1比率(珠粒:細胞)與DynaBeads®及3000 IU/mL IL-2一起在總共8 ml AIM-V培養基中再接種。在第11天，將培養基更換成補充有新鮮的3000 IU/mL IL-2之CM-4培養基。在第14天，使用DynaMag磁體(DynaMag™-15)移除DynaBeads®且對細胞進行計數。

【1199】PBL方法2。在本發明之一些實施例中，PBL

係使用PBL方法2擴增，該方法包含獲得來自全血之PBMC樣品。藉由在37℃下培育PBMC至少三小時且接著分離非黏著細胞來富集來自PBMC之T細胞。與PBL方法1類似地擴增非黏著細胞，亦即，在第0天，以1:1比率(珠粒:細胞)將非黏著細胞與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)及3000 IU/mL IL-2一起培養。在第4天，將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第7天，再用抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率(珠粒:細胞)刺激培養物，且將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第14天收集PBL，移除珠粒且對PBL進行計數及表現型分析。

【1200】在本發明之一些實施例中，PBL方法2如下進行：在第0天，將經冷凍保存之PMBC樣品解凍，且將PBMC細胞以每孔6百萬個細胞接種於CM-2培養基中之6孔盤中並且在37℃下培育3小時。3小時後，移除非黏著細胞(其係PBL)且計算其數目。在GRex 24孔盤之各孔中，以1×10^6個細胞/孔，以1:1之珠粒:細胞之比率將PBL與抗CD3/抗CD28 DynaBeads®及3000 IU/mL IL-2一起在總共7 ml CM-2培養基中培養。在第4天，將各孔中之培養基更換成AIM-V培養基及新鮮的3000 IU/mL IL-2。在第7天，收集經擴增之細胞，計數，接著在GRex I0M瓶中以每瓶15×10^6個細胞，以1:1比率(T細胞:珠粒)與DynaBeads®及3000 IU/mL IL-2一起在總共100 ml AIM-V培養基中培養。在第11天，將培養基更換成CM-4培養基且補充新鮮的IL-2(3000 IU/mL)。在第14天，使用DynaMag™磁體

(DynaMag™-15)移除戴諾珠粒(DynaBeads)且對細胞進行計數。

【1201】在本發明之一些實施例中，PBL方法2如下進行：在第0天，將經冷凍保存之PMBC樣品解凍，且將PBMC細胞以每孔6百萬個細胞接種於CM-2培養基中之6孔盤中並且在37℃下培育3小時。3小時後，移除非黏著細胞(其係PBL)且計算其數目。在GRex 24孔盤之各孔中，以1×10^6個細胞/孔，以1:1之珠粒:細胞之比率將PBL與抗CD3/抗CD28 DynaBeads®及3000 IU/mL IL-2一起在總共7 ml CM-2培養基中培養。在第4天，將各孔中之培養基更換成AIM-V培養基及新鮮的3000 IU/mL IL-2。在第7天，收集經擴增之細胞，計數，接著在新的GRex 24孔盤中，以1×10^6個細胞/孔，以1:1比率(T細胞:珠粒)與DynaBeads®及3000 IU/mL IL-2一起在總共8 ml AIM-V培養基中培養。在第11天，將培養基更換成CM-4培養基且補充新鮮的IL-2(3000 IU/mL)。在第14天，使用DynaMag™磁體(DynaMag™-15)移除戴諾珠粒且對細胞進行計數。

【1202】PBL方法3。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法3擴增，該方法包含獲得來自周邊血液之PBMC樣品。B細胞係使用CD19+選擇分離且T細胞係使用負向選擇PBMC樣品之非CD19+級份來選擇。在第0天，以1:1比率(珠粒:細胞)將T細胞及B細胞與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)及3000 IU/mL IL-2共同培養。在第4天，將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第7天，再用

抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率(珠粒:細胞)刺激培養物，且將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第14天收集PBL，移除珠粒且對PBL進行計數及表現型分析。

【1203】在本發明之一些實施例中，PBL方法3如下進行：在第0天，將來源於周邊血液的冷凍保存之PBMC解凍且計算其數目。使用CD19多分選人類套組(美天旎生物技術)分選CD19+ B細胞。在非CD19+細胞級份中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱(美天旎生物技術)純化T細胞。在Grex 24孔盤中，在存在約3000 IU/ml IL-2之情況下，在約8 ml CM2培養基中以不同比率共同培養T細胞(PBL)及B細胞。B細胞:T細胞比率為0.1:1、1:1及10:1。用抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率(珠粒:細胞)刺激T細胞/B細胞共同培養物。在第4天，將培養基由CM2更換成AIM-V培養基且將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第7天，收集細胞且進行計數且在新的Grex 24孔盤中，在AIM-V培養基中以約1.5×10^5至約4×10^5個細胞/孔之細胞範圍再接種，且以1:1比率(珠粒:細胞)用抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)及3000 IU/ml之額外IL-2刺激。在第14天，使用DynaMag™磁體(DynaMag™-15)移除戴諾珠粒且對細胞進行計數。

【1204】在一些實施例中，PBMC係自全血樣品分離。在一些實施例中，使用PBMC樣品作為擴增PBL之起始物質。在一些實施例中，樣品在擴增過程之前經冷凍保

存。在其他實施例中，使用新鮮樣品作為擴增PBL之起始物質。在本發明之一些實施例中，使用此項技術中已知之方法自PBMC分離T細胞。在一些實施例中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱分離T細胞。在本發明之一些實施例中，使用此項技術中已知之抗體選擇方法(例如CD19負向選擇)自PBMC分離T細胞。

【1205】在本發明之一些實施例中，該過程進行經約7天、約8天、約9天、約10天、約11天、約12天、約13天或約14天。在其他實施例中，該過程進行約7天。在其他實施例中，該過程進行約14天。

【1206】在本發明之一些實施例中，將PBMC與抗CD3/抗CD28抗體一起培養。在一些實施例中，任何可用的抗CD3/抗CD28產品皆可用於本發明中。在本發明之一些實施例中，所使用之可商購產品係DynaBeads®。在一些實施例中，將DynaBeads®與PBMC以1:1(珠粒:細胞)之比率一起培養。在其他實施例中，抗體係與PBMC以1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1或5:1(珠粒:細胞)之比率一起培養的DynaBeads®。在本發明之一些實施例中，抗體培養步驟及/或用抗體再刺激細胞之步驟係進行約2至約6天、約3至約5天或約4天之時段。在本發明之一些實施例中，抗體培養步驟係進行約2天、3天、4天、5天或6天之時段。

【1207】在一些實施例中，將PBMC樣品與IL-2一起培養。在本發明之一些實施例中，用於自PBMC擴增PBL

之細胞培養基包含選自由以下組成之群的濃度之IL-2：約100 IU/mL、約200 IU/mL、約300 IU/mL、約400 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約500 IU/mL、約600 IU/mL、約700 IU/mL、約800 IU/mL、約900 IU/mL、約1,000 IU/mL、約1,100 IU/mL、約1,200 IU/mL、約1,300 IU/mL、約1,400 IU/mL、約1,500 IU/mL、約1,600 IU/mL、約1,700 IU/mL、約1,800 IU/mL、約1,900 IU/mL、約2,000 IU/mL、約2,100 IU/mL、約2,200 IU/mL、約2,300 IU/mL、約2,400 IU/mL、約2,500 IU/mL、約2,600 IU/mL、約2,700 IU/mL、約2,800 IU/mL、約2,900 IU/mL、約3,000 IU/mL、約3,100 IU/mL、約3,200 IU/mL、約3,300 IU/mL、約3,400 IU/mL、約3,500 IU/mL、約3,600 IU/mL、約3,700 IU/mL、約3,800 IU/mL、約3,900 IU/mL、約4,000 IU/mL、約4,100 IU/mL、約4,200 IU/mL、約4,300 IU/mL、約4,400 IU/mL、約4,500 IU/mL、約4,600 IU/mL、約4,700 IU/mL、約4,800 IU/mL、約4,900 IU/mL、約5,000 IU/mL、約5,100 IU/mL、約5,200 IU/mL、約5,300 IU/mL、約5,400 IU/mL、約5,500 IU/mL、約5,600 IU/mL、約5,700 IU/mL、約5,800 IU/mL、約5,900 IU/mL、約6,000 IU/mL、約6,500 IU/mL、約7,000 IU/mL、約7,500 IU/mL、約8,000 IU/mL、約8,500 IU/mL、約9,000 IU/mL、約9,500 IU/mL及約10,000 IU/mL。

【1208】在本發明之一些實施例中，用於擴增過程之PBMC的起始細胞數目為約25,000至約1,000,000、約

30,000至約900,000、約35,000至約850,000、約40、000至約800,000、約45,000至約800,000、約50,000至約750,000、約55,000至約700,000、約60,000至約650,000、約65,000至約600,000、約70,000至約550,000，較佳約75,000至約500,000、約80,000至約450,000、約85,000至約400,000、約90,000至約350,000、約95,000至約300,000、約100,000至約250,000、約105,000至約200,000或約110,000至約150,000。在本發明之一些實施例中，PBMC之起始細胞數目為約138,000、140,000、145,000或更多。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約28,000。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約62,000。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約338,000。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約336,000。

【1209】在本發明之一些實施例中，使細胞在GRex 24孔盤中生長。在本發明之一些實施例中，使用類似的孔盤。在一些實施例中，用於擴增之起始物質係約5×10^5個T細胞/孔。在本發明之一些實施例中，存在1×10^6個細胞/孔。在本發明之一些實施例中，每孔之細胞數目足以接種該孔且擴增T細胞。

【1210】在本發明之一些實施例中，PBL之擴增倍數為約20%至約100%、25%至約95%、30%至約90%、35%至約85%、40%至約80%、45%至約75%、50%至約100%或25%至約75%。在本發明之一些實施例中，擴增倍數為約25%。在本發明之其他實施例中，擴增倍數為約50%。在

其他實施例中，擴增倍數為約75%。

【1211】在本發明之一些實施例中，可在整個過程中之一或多天將額外的IL-2添加至培養物中。在本發明之一些實施例中，在第4天添加額外的IL-2。在本發明之一些實施例中，在第7天添加額外的IL-2。在本發明之一些實施例中，在第11天添加額外的IL-2。在另一實施例中，在第4天、第7天及/或第11天添加額外的IL-2。在本發明之一些實施例中，可在細胞培養過程中之一或多天更換細胞培養基。在一些實施例中，在過程中之第4天、第7天及/或第11天更換細胞培養基。在本發明之一些實施例中，將PBL與額外的IL-2一起培養1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天之時段。在本發明之一些實施例中，在每次添加IL-2之後，將PBL培養3天之時段。

【1212】在一些實施例中，在該方法期間，將細胞培養基更換至少一次。在一些實施例中，在添加額外的IL-2的同時更換細胞培養基。在其他實施例中，在第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天或第14天中之至少一天更換細胞培養基。在本發明之一些實施例中，在整個方法期間使用之細胞培養基可相同或不同。在本發明之一些實施例中，細胞培養基為CM-2、CM-4或AIM-V。

【1213】在本發明之一些實施例中，可在整個14天擴增過程中之一或多天用抗CD3/抗CD28抗體再刺激T細胞。

在一些實施例中，在第7天再刺激T細胞。在一些實施例中，使用GRex 10M瓶進行再刺激步驟。在本發明之一些實施例中，使用類似的瓶。

【1214】在本發明之一些實施例中，使用DynaMag™磁體移除DynaBeads®，對細胞計數，且使用如以下實例中進一步描述的表現型及功能分析來分析細胞。在本發明之一些實施例中，使用此項技術中已知之方法將抗體自PBL或MIL分離。在任何前述實施例中，使用基於磁珠進行的TIL、PBL或MIL之選擇。

【1215】在本發明之一些實施例中，PBMC樣品係在可有效鑑別非黏著細胞之所需溫度下培育一段時間。在本發明之一些實施例中，培育時間為約3小時。在本發明之一些實施例中，溫度為約37℃。接著使用上文所描述的過程擴增非黏著細胞。

【1216】在本發明之一些實施例中，PBMC係自已用依魯替尼或另一種ITK或激酶抑制劑治療之患者獲得，此類ITK及激酶抑制劑係如本文中其他地方所描述。在本發明之一些實施例中，ITK抑制劑係共價且不可逆地結合於ITK之共價ITK抑制劑。在本發明之一些實施例中，ITK抑制劑係結合於ITK之立體異位ITK抑制劑。在本發明之一些實施例中，PBMC係自在獲得用於與任何前述方法(包括PBL方法1、PBL方法2或PBL方法3)一起使用之PBMC樣品之前，已用依魯替尼或另一ITK抑制劑(包括如本文中其他地方所描述之ITK抑制劑)治療的患者獲得。在本發明之一

些實施例中，已投與ITK抑制劑治療至少1次、至少2次或至少3次或更多次。在本發明之一些實施例中，自預先用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療之患者擴增之PBL中所包含的LAG3+、PD-1+細胞少於自未預先用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療之患者擴增之PBL。在本發明之一些實施例中，與自未預先用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療之患者擴增之PBL相比，自預先用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療之患者擴增之PBL中所包含的IFNγ產量之位準有所增加。在本發明之一些實施例中，與自未預先用依魯替尼或其他ITK抑制劑治療之患者擴增之PBL，自預先用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療之患者擴增之PBL在較低的效應物:目標細胞比率下包含增加之溶解活性。在本發明之一些實施例中，預先用依魯替尼或其他ITK抑制劑治療之患者與未經治療之患者相比具有更高的擴增倍數。

【1217】在本發明之一些實施例中，該方法包括將ITK抑制劑添加至細胞培養物中之步驟。在一些實施例中，在過程中之第0天、第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天或第14天中之一或多天添加ITK抑制劑。在一些實施例中，在該方法期間之更換細胞培養基之日添加ITK抑制劑。在一些實施例中，在第0天及在更換細胞培養基時添加ITK抑制劑。在一些實施例中，在該方法期間在添加IL-2時添加ITK抑制劑。在一些實施例中，在該方法之第0天、第4天、第7天及視情況第11天添加ITK抑

制劑。在本發明之一些實施例中，在該方法之第0天及第7天添加ITK抑制劑。在本發明之一些實施例中，ITK抑制劑係此項技術中已知的ITK抑制劑。在本發明之一些實施例中，ITK抑制劑係本文中其他地方所描述之ITK抑制劑。

【1218】在本發明之一些實施例中，該方法中所使用之ITK抑制劑之濃度為約0.1 nM至約5 μM。在一些實施例中，該方法中所使用之ITK抑制劑之濃度為約0.1 nM、0.5 nM、1 nM、5 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、150 nM、200 nM、250 nM、300 nM、350 nM、400 nM、450 nM、500 nM、550 nM、600 nM、650 nM、700 nM、750 nM、800 nM、850 nM、900 nM、950 nM、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM或5 μM。

【1219】在本發明之一些實施例中，該方法包括當PBMC係衍生自先前未暴露於ITK抑制劑治療(諸如依魯替尼)之患者時，添加ITK抑制劑之步驟。

【1220】在一些實施例中，PBMC樣品係來自視情況已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，腫瘤樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者，其已進行治療至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個

月、至少5個月、至少6個月或1年或更長。在其他實施例中，PBMC係來源於當前進行ITK抑制劑方案(諸如伊布替尼(ibrutinib))之患者。

【1221】在一些實施例中，PBMC樣品係來自已用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療且難以用激酶抑制劑或ITK抑制劑(諸如伊布替尼)治療之個體或患者。

【1222】在一些實施例中，PBMC樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療並且尚未進行治療達至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或至少1年或更長之個體或患者。在其他實施例中，PBMC來源於先前暴露於ITK抑制劑但在至少3個月、至少6個月、至少9個月或至少1年內尚未經治療之患者。

【1223】在本發明之一些實施例中，在第0天，針對CD19+選擇細胞且據此分選。在本發明之一些實施例中，使用抗體結合珠粒進行選擇。在本發明之一些實施例中，在第0天自PBMC分離純T細胞。在本發明之一些實施例中，在第0天，將CD19+ B細胞及純T細胞與抗CD3/抗CD28抗體共同培養至少4天。在本發明之一些實施例中，在第4天，將IL-2添加至培養物中。在本發明之一些實施

例中，在第7天，用抗CD3/抗CD28抗體及額外的IL-2再刺激培養物。在本發明之一些實施例中，在第14天，收集PBL。

【1224】在本發明之一些實施例中，對於未預先用依魯替尼或其他ITK抑制劑治療之患者，10-15 ml白血球層將產生約5×10^9個PBMC，其在擴增過程結束時又將產生約5.5×10^7個起始細胞物質及約11×10^9個PBL。在本發明之一些實施例中，約54×10^6個PBMC將產生約6×10^5個起始物質及約1.2×10^8個MIL(約205倍擴增)。

【1225】在本發明之一些實施例中，對於預先用依魯替尼或其他ITK抑制劑治療之患者，擴增過程將產生約20×10^9個PBL。在本發明之一些實施例中，40.3×10^6個PBMC將產生約4.7×10^5個起始細胞物質及約1.6×10^8個PBL(約338倍擴增)。

【1226】在本發明之一些實施例中，對於慢性淋巴球性白血病(CLL)患者，適用於本發明中之PBL的臨床劑量係約0.1×10^9至約15×10^9個PBL、約0.1×10^9至約15×10^9個PBL、約0.12×10^9至約12×10^9個PBL、約0.15×10^9至約11×10^9個PBL、約0.2×10^9至約10×10^9個PBL、約0.3×10^9至約9×10^9個PBL、約0.4×10^9至約8×10^9個PBL、約0.5×10^9至約7×10^9個PBL、約0.6×10^9至約6×10^9個PBL、約0.7×10^9至約5×10^9個PBL、約0.8×10^9至約4×10^9個PBL、約0.9×10^9至約3×10^9個PBL或約1×10^9至約2×10^9個PBL。

【1227】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血

樣品，藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自此項技術中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

B. 擴增來自骨髓衍生之PBMC的骨髓浸潤性淋巴球(MIL)之方法

【1228】MIL方法1。在本發明之一些實施例中，描述用於擴增來自骨髓衍生之PBMC之MIL的方法。在本發明之一些實施例中，該方法進行14天。在一些實施例中，該方法包含獲得骨髓PBMC及冷凍保存PBMC。在第0天，以1:1比率(珠粒:細胞)將PBMC與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)及3000 IU/mL IL-2一起培養。在第4天，將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第7天，再用抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率(珠粒:細胞)刺激培養物，且將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第14天收集MIL，移除珠粒，且視情況對MIL進行計數及表現型分析。

【1229】在本發明之一些實施例中，如下進行MIL方法1：在第0天，將冷凍保存的衍生自骨髓之PBMC樣品解凍且對PBMC進行計數。在GRex 24孔盤中，在存在3000 IU/ml IL-2之情況下，以5×10^5個細胞/孔將PBMC與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率在每孔約8 ml CM-2細胞培養基(包含RPMI-1640、人類AB血清、L-麩醯胺酸、2-巰基乙醇、硫酸建它黴素(gentamicin sulfate)、AIM-V培養基)中共同培養。在第4天，將細胞培養基更換成補充有

3000 IU/ml之額外IL-2之AIM-V。在第7天，對經擴增之MIL進行計數。將1×10^{6}個細胞/孔轉移至新的GRex 24孔盤中且在存在3000 IU/ml IL-2之情況下，以1:1比率與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)一起在每孔約8ml AIM-V培養基中培養。在第11天，將細胞培養基自AIM-V更換成CM-4(包含AIM-V培養基、2 mM Glutamax及3000 IU/mL IL2)。在第14天，使用DynaMag磁體(DynaMag™15)移除DynaBeads®且對MIL進行計數。

【1230】MIL方法2。在本發明之一些實施例中，該方法進行7天。在一些實施例中，該方法包含獲得衍生自骨髓之PBMC及冷凍保存PBMC。在第0天，以3:1比率(珠粒:細胞)將PBMC與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)及3000 IU/mL IL-2一起培養。在第7天收集MIL，移除珠粒，且視情況對MIL進行計數及表現型分析。

【1231】在本發明之一些實施例中，如下進行MIL方法2：在第0天，將冷凍保存的PBMC樣品解凍且對PBMC進行計數。在GRex 24孔盤中，在存在3000 IU/ml IL-2之情況下，以5×10^{5}個細胞/孔將PBMC與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率在每孔約8 ml CM-2細胞培養基(包含RPMI-1640、人類AB血清、L-麩醯胺酸、2-巰基乙醇、硫酸建它黴素、AIM-V培養基)中共同培養。在第7天，使用DynaMag磁體(DynaMag™15)移除DynaBeads®且對MIL進行計數。

【1232】MIL方法3。在本發明之一些實施例中，該

方法包含獲得來自骨髓之PBMC。在第0天，針對CD3+/CD33+/CD20+/CD14+選擇PBMC且分選，且將非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+細胞級份進行音波處理且將一部分經音波處理之細胞級份添加回至所選細胞級份中。將3000 IU/ml IL-2添加至細胞培養物中。在第3天，以1:1比率(珠粒:細胞)將PBMC與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)及3000 IU/ml IL-2一起培養。在第4天，將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第7天，再用抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率(珠粒:細胞)刺激培養物，且將3000 IU/mL之額外IL-2添加至培養物中。在第11天，將3000 IU/ml IL-2添加至培養物中。在第14天收集MIL，移除珠粒，且視情況對MIL進行計數及表現型分析。

【1233】在本發明之一些實施例中，MIL方法3如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣品解凍且計算PBMC之數目。將細胞用CD3、CD33、CD20及CD14抗體染色且使用S3e細胞分選器(Bio-Rad)分選。將細胞分選成兩種級份：免疫細胞級份(MIL部分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)及AML胚細胞級份(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。將數目大致等於來自待接種於Grex 24孔盤上的免疫細胞級分(或MIL級分)之細胞之數目的來自AML胚細胞級分之細胞懸浮於100 µl培養基中且進行音波處理。在此實例中，獲取約2.8×10^4至約3.38×10^5個來自AML胚細胞級分之細胞且使其懸浮於100µl CM2培養基中，且接著音波處理30秒。在Grex 24孔盤中，將100 µl經音波處理之AML胚細

胞級分添加至免疫細胞級分中。在存在6000 IU/ml IL-2之情況下，免疫細胞以約2.8×10^4至約3.38×10^5個細胞/孔之量存在於每孔約8 ml CM-2細胞培養基中，且與該部分AML胚細胞級分一起培養約3天。在第3天，將抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)以1:1比率添加至各孔中且培養約1天。在第4天，將細胞培養基更換成補充有3000 IU/ml之額外IL-2之AIM-V。在第7天，對經擴增之MIL進行計數。將約1.5×10^5至4×10^5個細胞/孔轉移至新的GRex 24孔盤中且在存在3000 IU/ml IL-2之情況下，以1:1比率與抗CD3/抗CD28抗體(DynaBeads®)一起在每孔約8 ml AIM-V培養基中培養。在第11天，將細胞培養基自AIM-V更換成CM-4(補充有3000 IU/ml IL-2)。在第14天，使用DynaMag磁體(DynaMag™15)移除DynaBeads®且視情況對MIL進行計數。

【1234】在本發明之一些實施例中，PBMC係獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC係經由血球分離術、抽吸、針吸生檢或此項技術中已知之其他類似方式獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC為新鮮的。在其他實施例中，PBMC經冷凍保存。

【1235】在本發明之一些實施例中，該方法進行經約7天、約8天、約9天、約10天、約11天、約12天、約13天或約14天。在其他實施例中，該方法進行約7天。在其他實施例中，該方法進行約14天。

【1236】在本發明之一些實施例中，將PBMC與抗

CD3/抗CD28抗體一起培養。在一些實施例中，任何可用的抗CD3/抗CD28產品皆可用於本發明中。在本發明之一些實施例中，所使用之可商購產品係DynaBeads®。在一些實施例中，將DynaBeads®與PBMC以1:1(珠粒:細胞)之比率一起培養。在其他實施例中，抗體係與PBMC以1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1或5:1(珠粒:細胞)之比率一起培養的DynaBeads®。在任何前述實施例中，使用基於磁珠進行的免疫細胞級分(或MIL級分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)或AML胚細胞級分(非CD3+CD33+CD20+CD14+)之選擇。在本發明之一些實施例中，抗體培養步驟及/或用抗體再刺激細胞之步驟係進行約2至約6天、約3至約5天或約4天之時段。在本發明之一些實施例中，抗體培養步驟係進行約2天、3天、4天、5天或6天之時段。

【1237】在本發明之一些實施例中，來自AML胚細胞級分之細胞的數目與來自免疫細胞級分(或MIL級分)之細胞的數目之比率係約0.1:1至約10:1。在其他實施例中，該比率係約0.1:1至約5:1、約0.1:1至約2:1，或約1:1。在本發明之一些實施例中，視情況使AML胚細胞級分破裂以破壞細胞聚集。在一些實施例中，使用音波處理、均質化、細胞溶解、渦旋或振動來使AML胚細胞級分破裂。在其他實施例中，使用音波處理使AML胚細胞級分破裂。在本發明之一些實施例中，使用適合的溶解方法，包括高溫溶解、化學溶解(諸如有機醇)、酶溶解及此項技術中已知之其他細胞溶解方法，將非CD3+、非CD33+、非CD20+、非

CD14+細胞級分(AML胚細胞級分)溶解。

【1238】在本發明之一些實施例中，使來自AML胚細胞級分之細胞以每100 μL約0.2×10^5至約2×10^5個細胞之濃度懸浮且與免疫細胞級分一起添加至細胞培養物中。在其他實施例中，該濃度為每100 μL約0.5×10^5至約2×10^5個細胞、每100 μL約0.7×10^5至約2×10^5個細胞、每100 μL約1×10^5至約2×10^5個細胞或每100 μL約1.5×10^5至約2×10^5個細胞。

【1239】在一些實施例中，將PBMC樣品與IL-2一起培養。在本發明之一些實施例中，用於擴增MIL之細胞培養基包含選自由以下組成之群之濃度的IL-2：約100 IU/mL、約200 IU/mL、約300 IU/mL、約400 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約100 IU/mL、約500 IU/mL、約600 IU/mL、約700 IU/mL、約800 IU/mL、約900 IU/mL、約1,000 IU/mL、約1,100 IU/mL、約1,200 IU/mL、約1,300 IU/mL、約1,400 IU/mL、約1,500 IU/mL、約1,600 IU/mL、約1,700 IU/mL、約1,800 IU/mL、約1,900 IU/mL、約2,000 IU/mL、約2,100 IU/mL、約2,200 IU/mL、約2,300 IU/mL、約2,400 IU/mL、約2,500 IU/mL、約2,600 IU/mL、約2,700 IU/mL、約2,800 IU/mL、約2,900 IU/mL、約3,000 IU/mL、約3,100 IU/mL、約3,200 IU/mL、約3,300 IU/mL、約3,400 IU/mL、約3,500 IU/mL、約3,600 IU/mL、約3,700 IU/mL、約3,800 IU/mL、約3,900 IU/mL、約4,000 IU/mL、約4,100 IU/mL、約4,200 IU/mL、約4,300

IU/mL、約4,400 IU/mL、約4,500 IU/mL、約4,600 IU/mL、約4,700 IU/mL、約4,800 IU/mL、約4,900 IU/mL、約5,000 IU/mL、約5,100 IU/mL、約5,200 IU/mL、約5,300 IU/mL、約5,400 IU/mL、約5,500 IU/mL、約5,600 IU/mL、約5,700 IU/mL、約5,800 IU/mL、約5,900 IU/mL、約6,000 IU/mL、約6,500 IU/mL、約7,000 IU/mL、約7,500 IU/mL、約8,000 IU/mL、約8,500 IU/mL、約9,000 IU/mL、約9,500 IU/mL及約10,000 IU/mL。

【1240】在本發明之一些實施例中，可在整個方法中之一或多天將額外IL-2添加至培養物中。在本發明之一些實施例中，在第4天添加額外的IL-2。在本發明之一些實施例中，在第7天添加額外的IL-2。在本發明之一些實施例中，在第11天添加額外的IL-2。在其他實施例中，在第4天、第7天及/或第11天添加額外的IL-2。在本發明之一些實施例中，將MIL與額外的IL-2一起培養1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天之時段。在本發明之一些實施例中，在每次添加IL-2之後，將MIL培養3天之時段。

【1241】在一些實施例中，在該方法期間，將細胞培養基更換至少一次。在一些實施例中，在添加額外的IL-2的同時更換細胞培養基。在其他實施例中，在第1天、第2天、第3天、第4天、第5天、第6天、第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天或第14天中之至少一天更換細胞培養基。在本發明之一些實施例中，在整個

方法期間使用之細胞培養基可相同或不同。在本發明之一些實施例中，細胞培養基為CM-2、CM-4或AIM-V。在本發明之一些實施例中，在第11天之細胞培養基交換步驟係視情況選用的。在本發明之一些實施例中，用於擴增過程之PBMC之起始細胞數目為約25,000至約1,000,000、約30,000至約900,000、約35,000至約850,000、約40,000至約800,000、約45,000至約800,000、約50,000至約750,000、約55,000至約700,000、約60,000至約650,000、約65,000至約600,000、約70,000至約550,000，較佳約75,000至約500,000、約80,000至約450,000、約85,000至約400,000、約90,000至約350,000、約95,000至約300,000、約100,000至約250,000、約105,000至約200,000或約110,000至約150,000。在本發明之一些實施例中，PBMC之起始細胞數目為約138,000、140,000、145,000或更多。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約28,000。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約62,000。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約338,000。在其他實施例中，PBMC之起始細胞數目為約336,000。

【1242】在本發明之一些實施例中，MIL之擴增倍數約20%至約100%、25%至約95%、 30%至約90%、35%至約85%、40%至約80%、45%至約75%、50%至約100%或25%至約75%。在本發明之一些實施例中，擴增倍數為約25%。在本發明之其他實施例中，擴增倍數為約50%。在其他實施例中，擴增倍數為約75%。

【1243】在本發明之一些實施例中，MIL係自10-50 ml骨髓抽吸物擴增。在本發明之一些實施例中，自患者獲得10 ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得20ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得30ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得40ml骨髓抽吸物。在其他實施例中，自患者獲得50ml骨髓抽吸物。

【1244】在本發明之一些實施例中，由約10-50 ml骨髓抽吸物產生之PBMC之數目為約5×10^7至約10×10^7個PBMC。在其他實施例中，所產生之PMBC之數目為約7×10^7個PBMC。

【1245】在本發明之一些實施例中，約5×10^7至約10×10^7個PBMC產生約0.5×10^6至約1.5×10^6個擴增起始細胞物質。在本發明之一些實施例中，產生約1×10^6個擴增起始細胞物質。

【1246】在本發明之一些實施例中，在擴增週期結束時所收集之MIL之總數為約0.01×10^9至約1×10^9、約0.05×10^9至約0.9×10^9、約0.1×10^9至約0.85×10^9、約0.15×10^9至約0.7×10^9、約0.2×10^9至約0.65×10^9、約0.25×10^9至約0.6×10^9、約0.3×10^9至約0.55×10^9、約0.35×10^9至約0.5×10^9或約0.4×10^9至約0.45×10^9。

【1247】在本發明之一些實施例中，衍生自骨髓抽吸物之12×10^6個PBMC產生約1.4×10^5個起始細胞物質，其在擴增過程結束時產生約1.1×10^7個MIL。

【1248】在本發明之一些實施例中，與使用MIL方法

1或MIL方法2擴增之MIL相比，使用上文所描述的MIL方法3自骨髓PBMC擴增之MIL包含較高比例的CD8+細胞以及較少數目之LAG3+及PD1+細胞。在本發明之一些實施例中，與使用MIL方法1或MIL方法2擴增之PBL相比，使用上文所描述的MIL方法3自血液PBMC擴增之PBL包含較高比例之CD8+細胞及增加之IFNγ產量。

【1249】在本發明之一些實施例中，適用於急性骨髓性白血病(AML)患者之MIL的臨床劑量在約4×10^8至約2.5×10^9個MIL範圍內。在其他實施例中，本發明之醫藥組合物中所提供之MIL的數目為9.5×10^8個MIL。在其他實施例中，本發明之醫藥組合物中所提供之MIL的數目為4.1×10^8。在其他實施例中，本發明之醫藥組合物中所提供之MIL的數目為2.2×10^9。

【1250】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣品、骨髓、藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自此項技術中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

VI. Gen 2 TIL製造方法

【1251】圖1及圖2中描繪含有一些此等特徵之稱為Gen 2(亦被稱為方法2A)之例示性TIL程序系列。Gen 2之實施例展示於圖2中。

【1252】如本文所論述，本發明可包括與再刺激經冷凍保存之TIL以在移植至患者中之前提高其代謝活性且因

此提高相對健康狀況相關之步驟，及測試該代謝健康狀況之方法。如本文大體上概述，TIL通常獲自患者樣品且在移植至患者中之前經操作以擴增其數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。

【1253】在一些實施例中，TIL可經冷凍保存。在解凍後，其亦可在輸注至患者中之前經再刺激以增加其代謝。

【1254】在一些實施例中，將第一擴增(包括稱為預REP之過程以及圖1中所示之作為步驟A之過程)縮短為3至14天，且將第二擴增(包括稱為REP之過程以及圖1中所示之作為步驟B之過程)縮短為7至14天，如下文以及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，將第一擴增(例如圖1中步驟B描述之擴增)縮短為11天，將第二擴增(例如圖1中步驟D中描述之擴增)縮短為11天。在一些實施例中，將第一擴增及第二擴增之組合(例如，在圖1中描述為步驟B及步驟D之擴增)縮短為22天，如下文以及實例及圖式中所詳細論述。

【1255】下文中之「步驟」標示A、B、C等係參考圖1及參考本文中所描述之某些實施例。下文及圖1中之步驟之次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及額外步驟、步驟之重複及/或步驟之省略。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣品

【1256】一般而言，TIL最初獲自患者腫瘤樣品且隨後擴增成更大的群體以用於如本文中所描述之進一步操縱、視情況進行之冷凍保存、如本文所概述之再刺激及視情況評估作為TIL健康狀況之指標的表現型及代謝參數。

【1257】患者腫瘤樣品可使用此項技術中已知之方法獲得，通常經由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品的其他手段獲得。在一些實施例中，使用多病灶取樣。在一些實施例中，手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品的其他手段包括多病灶取樣(亦即，自患者中之一或多個腫瘤位點及/或位置以及在相同位置或緊密相鄰的一或多個腫瘤處獲得樣品)。一般而言，腫瘤樣品可來自任何實體腫瘤，包括原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣品亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可為肺組織。在一些實施例中，適用之TIL係獲自非小細胞肺癌(NSCLC)。實體腫瘤可為皮膚組織。在一些實施例中，適用之TIL係獲自黑色素瘤。

【1258】一旦獲得，腫瘤樣品通常使用銳器分割片段化成1 mm^3至約8 mm^3之間的小型片狀物，其中約2-3 mm^3為尤其適用的。在一些實施例中，使用酶腫瘤消化物自此等片段培養TIL。此類腫瘤消化物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建

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

【1259】腫瘤解離酶混合物可包括一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包括任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶(hyaluronidase)、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)、胰蛋白酶(trypsin)、酪蛋白酶(caseinase)、彈性蛋白酶(elastase)、木瓜酶(papain)、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶(pronase))、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【1260】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶復原。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液(諸如

HBSS)中復原。

【1261】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 mL無菌HBSS或另一緩衝液中復原。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實施例中，膠原蛋白酶係在5 mL至15 mL緩衝液中復原。在一些實施例中，在復原後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL，例如，約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL或約400 PZ U/mL。

【1262】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中復原。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。在一些實施例中，在復原後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/mL至約400 DMC/mL，例如，約100 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL至約350 DMC/mL、約100 DMC/mL至約300 DMC/mL、約150 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、

約300 DMC/mL、約350 DMC/mL或約400 DMC/mL。

【1263】在一些實施例中，DNA酶I係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中復原。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4 KU。在一些實施例中，在復原後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/mL至10 KU/mL，例如約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6 KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL或約10 KU/mL。

【1264】在一些實施例中，酶之儲備液係可變的且可能需要確定濃度。在一些實施例中，可檢驗凍乾儲備液之濃度。在一些實施例中，添加至消化混合液中之酶之最終量係基於所確定之儲備液濃度調節。

【1265】在一些實施例中，酶混合物包括約4.7 mL無菌HBSS中的約10.2 μl中性蛋白酶(0.36 DMC U/mL)、21.3 μL膠原蛋白酶(1.2 PZ/mL)及250 μl DNA酶I (200 U/mL)。

【1266】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經片段化。在一些實施例中，實體腫瘤未經片段化且以全腫瘤進行酶消化。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中

消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下消化隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定旋轉下消化隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤消化反應混合物。

【1267】在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及中性蛋白酶之酶混合物中消化。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及中性蛋白酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及中性蛋白酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及中性蛋白酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恒定旋轉下消化隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恒定旋轉下消化隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤消化反應混合物。

【1268】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶復原腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【1269】在一些實施例中，酶混合物包含膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備液為100 mg/mL之10X工作儲備液。

【1270】在一些實施例中，酶混合物包含DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備液為10,000 IU/mL之10X工作儲備液。

【1271】在一些實施例中，酶混合物包含玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備液為10 mg/mL之10X工作儲備液。

【1272】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL之膠原蛋白酶、1000 IU/mL之DNA酶及1 mg/mL之玻尿酸酶。

【1273】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL之膠原蛋白酶、500 IU/mL之DNA酶及1 mg/mL之玻尿酸酶。

【1274】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【1275】在一些實施例中，片段化包括物理片段化，包括例如分割以及消化。在一些實施例中，片段化為物理片段化。在一些實施例中，片段化為分割。在一些實施例中，片段化係藉由消化。在一些實施例中，TIL最初可自酶腫瘤消化物及腫瘤片段培養，該等酶腫瘤消化物及腫瘤片段係由將獲自患者之腫瘤樣品消化或片段化獲得。

【1276】在一些實施例中，當腫瘤為實體腫瘤時，在例如步驟A(如圖1中所提供)中獲得腫瘤樣品之後，腫瘤經歷物理片段化。在一些實施例中，片段化發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，片段化發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，片段化在獲得腫瘤之後並且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，將腫瘤片段化且將10、20、30、40或更多個片段或塊狀物置於各容器中以進行第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤片段化且將30

或40個片段或塊狀物置於各容器中以進行第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤片段化且將40個片段或塊狀物置於各容器中以進行第一擴增。在一些實施例中，多個片段包含約4個至約50個片段，其中各片段之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個片段包含約30個至約60個片段，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個片段包含約50個片段，其總體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個片段包含約50個片段，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個片段包含約4個片段。

【1277】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤片段。在一些實施例中，腫瘤片段係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤片段在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤片段在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤片段為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約6 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約7 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤為1-4 mm×1-4 mm×1-4 mm。在一些實施例中，腫瘤為1 mm×1 mm×1 mm。在一些實施例中，腫瘤為2 mm×2 mm×2 mm。在一些實施例中，腫瘤為3 mm×3

mm×3 mm。在一些實施例中，腫瘤為4 mm×4 mm×4 mm。

【1278】在一些實施例中，將腫瘤切割以使各塊狀物上之出血性、壞死性及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，將腫瘤切割以使各塊狀物上之出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，將腫瘤切割以使各塊狀物上之壞死性組織之量減至最小。在一些實施例中，將腫瘤切割以使各塊狀物上之脂肪組織之量減至最小。

【1279】在一些實施例中，進行腫瘤片段化以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切動作的情況下進行腫瘤片段化。在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤消化物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如(但不限於) RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤消化物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後若大片組織仍存在，則施加1或2次另外機械解離至樣品，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可使用Ficoll進行密度梯度分離以移除此等細胞。

【1280】在一些實施例中，將第一擴增步驟之前收集的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【1281】在一些實施例中，細胞可視情況在樣品收集之後冷凍且在進入步驟B(其在下文進一步詳細描述以及圖1及圖8中例示)中所描述之擴增之前冷凍儲存。

1. 胸膜滲出T細胞及TIL

【1282】在一些實施例中，樣品為胸膜液樣品。在一些實施例中，根據本文中所描述之方法的用於擴增之T細胞或TIL的來源為胸膜液樣品。在一些實施例中，樣品為源於胸腔積液之樣品。在一些實施例中，根據本文中所描述之方法的用於擴增之T細胞或TIL的來源為胸腔積液衍生之樣品。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

【1283】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸腔積液。此類樣品可來源於原發性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，樣品可衍生自來源於另一器官(例如乳房、卵巢、結腸或前列腺)之繼發性轉移性癌細胞。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣品為胸膜滲出物(pleural exudate)。在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法中之樣品為胸膜溢出物(pleural transudate)。其他生物樣

品可包括含有TIL之其他漿液，包括例如來自腹部之腹水液或胰囊腫液。腹水液及胸膜液涉及非常類似的化學系統；腹部及肺兩者在相同的惡性腫瘤事件中於胸腔及腹腔中皆具有間皮細胞株及流體形式，且在一些實施例中，此類流體含有TIL。在所揭示之方法利用胸膜液的一些實施例中，可使用含有TIL之腹水或其他囊腫液進行相同的方法以得到類似結果。

【1284】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在進一步處理步驟之前，將未經處理之胸膜液置放於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在進一步處理步驟之前，將未經處理之胸膜液置放於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施例中，在自患者收集之後立即將樣品置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降低。在一些實施例中，樣品係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣品係在4℃下自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。

【1285】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣品。在一些實施例中，稀釋度為1:10胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:9胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在其他

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

【1286】在其他實施例中，在進一步處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣品。在一些實施例中，在胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜液樣品自個體中取出後將其離心並將離心液或沈澱物再懸浮於緩衝液中來製備胸膜液樣品。在一些實施例中，對胸膜液樣品進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【1287】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣品。在一些實施例

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

【1288】在一些實施例中，使胸膜液樣品(包括例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞沈澱物與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣品中存在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包括單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包括BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包括Versalyse™系統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統或Erythrolyse II系統(貝克曼庫爾特公司(Beckman Coulter, Inc.))或氯化銨系統。在一些實施例中，溶解試劑可隨主要需求而變化，該等需求為紅血球之有效溶解及TIL之保守性及胸膜液中TIL之表現型特性。除使用單一試劑用於溶解以外，適用於本文中所描述之方法的溶解系統可包括

第二試劑，例如在該方法之剩餘步驟期間淬滅或延遲溶解試劑之作用的第二試劑，例如Stabilyse™試劑(貝克曼庫爾特公司)。視溶解試劑之選擇或該方法之較佳實施而定，亦可採用習知固定試劑。

【1289】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣品，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴增。

B. 步驟B：第一擴增

【1290】在一些實施例中，本發明之方法實現獲得年輕TIL，其與較年長的TIL(亦即，在向個體/患者投與之前進一步經歷更多輪複製之TIL)相比，在向個體/患者投與時能夠實現增加之複製循環且因此可提供額外治療益處。年輕TIL之特徵已描述於文獻中，例如於Donia等人,《斯堪的納維亞免疫學雜誌(*Scand. J. Immunol.*)》**2012,** *75,* 157-167；Dudley等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》**2010,** *16,* 6122-6131；Huang等人，《免疫學雜誌(*J. Immunother.*)》**2005,** *28,* 258-267；Besser等人，《臨床癌症研究》**2013,** *19,* OF1-OF9；Besser等人，《免疫學雜誌》**2009**, *32*:415-423；Robbins等人，《免疫學雜誌》**2004**, *173,* 7125-7130；Shen等人，《免疫學雜誌》**2007,** *30,* 123-129；Zhou等人，《免疫學雜誌》**2005,** *28,* 53-62；及Tran等人，《免疫學雜誌》**2008**, *31*, 742-751，其

各自以引用的方式併入本文中。

【1291】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文中提供之方法以外之其他方法製備的TIL，藉由本發明之方法獲得的TIL呈現T細胞貯庫多樣性之增加，該等其他方法包括例如除圖1中實施之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖5及/或圖6中例示之稱為過程1C之方法製備的TIL，藉由本發明之方法獲得的TIL呈現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第一擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些

實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。

【1292】在例如圖1之步驟A中所描述的腫瘤片段之解剖或消化之後，所得細胞在含有IL-2之血清中在相對於腫瘤及其他細胞有利於TIL生長之條件下培養。在一些實施例中，在2 mL孔中在包含具有6000 IU/mL IL-2之不活化人類AB血清之培養基中培育腫瘤消化物。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常3至14天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養7至14天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養10至14天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養約11天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【1293】在一些實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文中所描述之初始主體TIL擴增步驟(諸如圖1之步驟B中所描述之步驟，其可包括稱為預REP之過程)進行，接著進行如下文步驟D及本文中所描述之第二擴增(步驟D，包括稱為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況選用之冷凍保存，且接著進行如下文及本文中所描述之第二步驟D(包括稱為再刺激REP步驟之過程)。獲自此過程之TIL可視情況針對如本文中所描述之表現型特徵及代謝參數進行表徵。

【1294】在TIL培養係在24孔盤中起始，例如，使用Costar 24孔細胞培養簇之一些實施例中，平底(Corning Incorporated，Corning，NY，各孔可用含有1×10^6個腫瘤消化物細胞或一個腫瘤片段及IL-2 (6000 IU/mL；Chiron Corp., Emeryville, CA)的2 mL完全培養基(CM)接種。在一些實施例中，腫瘤片段在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【1295】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在具有40 mL容量及10 cm^2透氣矽底的透氣性瓶(例如，G-REX-10；Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)中起始培養之一些實施例中，各瓶裝載有含有$10\text{-}40\times10^6$個活腫瘤消化物細胞或5-30個腫瘤片段及IL-2之10-40 mL CM。G-REX-10及24孔盤皆在濕氣培育箱中在37℃、5% CO_2下培養且在培養起始後5天，移除一半培養基且更換為新鮮的CM及IL-2，且在第5天之後，每2-3天更換一半培養基。

【1296】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1297】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含

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

【1298】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括(但不限於)以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、

V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【1299】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包括(但不限於)CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1300】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【1301】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任

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

【1302】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫

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

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

【1303】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即，GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即，GlutaMAX®)。

【1304】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【1305】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培

養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群的成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群的成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物及一或多種選自由以下組成之群的成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培

養基選自由以下組成之群：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1306】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1307】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以以下表12中之標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列舉之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表12中之標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列舉之最終濃度存在。在其他實施

例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含以下表12中的標題「補充劑之較佳實施例」欄中列舉之類型及濃度的非微量部分成分。

表12：非微量元素部分成分之濃度

成分	補充劑之較佳實施例(mg/L)(約)	1X培養基中之濃度範圍(mg/L)(約)	1X培養基之較佳實施例(mg/L)(約)
甘胺酸	150	5-200	53
L-組胺酸	940	5-250	183
L-異白胺酸	3400	5-300	615
L-甲硫胺酸	90	5-200	44
L-苯丙胺酸	1800	5-400	336
L-脯胺酸	4000	1-1000	600
L-羥基脯胺酸	100	1-45	15
L-絲胺酸	800	1-250	162
L-蘇胺酸	2200	10-500	425
L-色胺酸	440	2-110	82
L-酪胺酸	77	3-175	84
L-纈胺酸	2400	5-500	454
硫胺素	33	1-20	9
還原麩胱甘肽	10	1-20	1.5
抗壞血酸-2-PO_4(Mg鹽)	330	1-200	50
運鐵蛋白(鐵飽和)	55	1-50	8
胰島素	100	1-100	10
亞硒酸鈉	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX®I	83.000	5000-50,000	12.500

【1308】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1309】在一些實施例中，Smith等人，《臨床與轉化免疫學(*Clin Transl Immunology*)》 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1310】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1311】在製備腫瘤片段之後，所得細胞(亦即，片段)在含有IL-2之血清中，在相對於腫瘤及其他細胞有利於TIL生長之條件下培養。在一些實施例中，將腫瘤消化物在2 mL孔中，在包含不活化人AB血清(或在一些情況下，如本文所概述，在存在APC細胞群體之情況下)及6000 IU/mL IL-2的培養基中培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常10至14天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，生長培養基在第一擴增期間包含IL-2或其變異體。在一些實施例中，IL為重組人類IL-2 (rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有25×10^6 IU/mg之

比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有5至7×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有6×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，如實例5中所描述製備IL-2儲備溶液。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約10,000 IU/mL IL-2、約9,000 IU/mL IL-2、約8,000 IU/mL IL-2、約7,000 IU/mL IL-2、約6000 IU/mL IL-2或約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約9,000 IU/mL IL-2至約5,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約8,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約7,000 IU/mL IL-2至約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約6,000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含1000與2000 IU/mL

之間、2000與3000 IU/mL之間、3000與4000 IU/mL之間、4000與5000 IU/mL之間、5000與6000 IU/mL之間、6000與7000 IU/mL之間、7000與8000 IU/mL之間或約8000 IU/mL的IL-2。

【1312】在一些實施例中，第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【1313】在一些實施例中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-

21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【1314】在一些實施例中，細胞培養基包含抗CD3促效劑抗體，例如OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL至1 ng/mL、1 ng/mL至5 ng/mL、5 ng/mL至10 ng/mL、10 ng/mL至20 ng/mL、20 ng/mL至30 ng/mL、30 ng/mL至40 ng/mL、40 ng/mL至50 ng/mL、及50 ng/mL至100 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基不包含OKT-3抗體。在一些實施例中，

OKT-3抗體為莫羅單抗。參見例如表1。

【1315】在一些實施例中，細胞培養基包含一或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【1316】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【1317】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。在具有40 mL容量及10 cm^2透氣矽底的透氣性瓶(例如，G-REX10；Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)中起始培養之一些實施例中，各瓶裝載有含10-40×10^6個活腫瘤消化物細胞或5-30個腫瘤片段之具有IL-2的10-40 mL CM。G-REX10及24孔

盤皆在濕氣培育箱中在37℃、5% CO_2下培養且在培養起始後5天，移除一半培養基且更換為新鮮的CM及IL-2，且在第5天之後，每2-3天更換一半培養基。在一些實施例中，CM為實例中所描述之CM1，參見實例1。在一些實施例中，第一擴增在初始細胞培養基或第一細胞培養基中進行。在一些實施例中，初始細胞培養基或第一細胞培養基包含IL-2。

【1318】在一些實施例中，第一擴增(包括諸如描述於圖1之步驟B中之過程的過程，其可包括有時稱為預REP之過程)縮短為3-14天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第一擴增(包括諸如圖1之步驟B中所描述之過程，其可包括有時稱為預REP之過程)縮短為7至14天，如實例中所論述以及圖4及圖5中所展示，以及包括例如圖1之步驟B中所描述之擴增。在一些實施例中，步驟B之第一擴增縮短為10-14天。在一些實施例中，第一擴增縮短為11天，如例如圖1之步驟B中所描述之擴增中所論述。

【1319】在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至14天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至14天。在一些實施例

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

【1320】在一些實施例中，使用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為第一擴增期間之組合。在一些實施例中，在第一擴增期間，包括例如在根據圖1以及本文所描述之步驟B過程期間可包括IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合。在一些實施例中，使用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為第一擴增期間之組合。在一些實施例中，在根據圖1以及如本文中所描述之步驟B過程期間可包

括IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合。

【1321】在一些實施例中，如實例及圖式中所論述，第一擴增(包括稱為預REP之過程；例如，根據圖1之步驟B)過程縮短為3至14天。在一些實施例中，步驟B之第一擴增縮短為7至14天。在一些實施例中，步驟B之第一擴增縮短為10至14天。在一些實施例中，第一擴增縮短為11天。

【1322】在一些實施例中，在密閉系統生物反應器中進行第一擴增，例如根據圖1之步驟B。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所使用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

1. 細胞介素及其他添加劑

【1323】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(尤其IL-2)之培養基，如此項技術中所已知。

【1324】或者，使用細胞介素之組合以及IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更多者之組合來進行TIL之快速擴增及/或第二擴增亦係可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能的組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21及IL-2，或IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且尤其如其中所描述之T細胞。

【1325】在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基中添加OKT-3抗體或莫羅單抗，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基中添加4-1BB促效劑，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基中添加OX-40促效劑，如本文中其他地方所描述。在其他實施例中，可在步驟B期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧化體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

C. 步驟C：第一擴增至第二擴增之轉變

【1326】在一些情況下，自第一擴增獲得之主體TIL群體，包括例如自例如圖1中所示之步驟B獲得的TIL群體，可使用下文所論述之方案立即冷凍保存。或者，獲自第一擴增之TIL群體(稱為第二TIL群體)可經歷第二擴增(其可包括有時稱為REP之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在經基因修飾之TIL將用於療法的情況下，第一TIL群體(有時稱為主體TIL群體)或第二TIL群體(其在一些實施例中可包括稱為REP TIL群體之群體)可在擴增之前或在第一擴增之後及在第二擴增之前進行基因修飾以用於適合的治療。

【1327】在一些實施例中，儲存獲自第一擴增(例

如，來自如圖1中所指示之步驟B)之TIL直至進行用於選擇之表現型分析。在一些實施例中，獲自第一擴增(例如，來自如圖1中所指示之步驟B)之TIL未經儲存且直接繼續進行第二擴增。在一些實施例中，獲自第一擴增之TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前未經冷凍保存。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後約3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後約3天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後約4天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後約4天至約10天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後約7-14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後約14天發生。

【1328】在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後1天至14天發生。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至14天。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後3天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後4天至14天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段

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

天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後9天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後10天至11天發生。在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後11天發生。

【1329】在一些實施例中，TIL在第一擴增之後且在快速第二擴增之前未經儲存，且TIL直接進行第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖1中所示之步驟B至步驟D之轉變期間未進行儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文中所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行第二擴增而無轉變期。

【1330】在一些實施例中，第一擴增至第二擴增之轉變(例如根據圖1之步驟C)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所使用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100生物反應器。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

D. 步驟D：第二擴增

【1331】在一些實施例中，TIL細胞群體之數目在收集及初始批量處理之後擴增，例如在步驟A及步驟B以及稱為步驟C之轉變之後，如圖1中所指示。此進一步擴增在本文中稱為第二擴增，其可包括在此項技術中通常稱為快

速擴增過程(REP)之擴增過程；以及如圖1之步驟D中所指示之過程。第二擴增通常使用包含多種組分(包括飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完成。

【1332】在一些實施例中，第二擴增或第二TIL擴增(其可包括有時稱為REP之擴增；以及如圖1之步驟D中所指示之過程)可使用熟習此項技術者已知之任何TIL瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天或14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約7天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約8天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約9天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約10天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約11天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約12天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約13天至約14天。在一些實施例中，第二TIL擴增可進行約14天。

【1333】在一些實施例中，第二擴增可在透氣容器中使用本揭示案之方法(包括例如稱為REP之擴增；以及如圖1之步驟D中所指示之過程)進行。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包括例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/mL OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自新澤西州拉裡坦市的Ortho-McNeil或加利福尼

亞州奧本市的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥市的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包括一或多種癌症之抗原(包括其抗原部分，諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表現，該載體諸如人類白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1 :26-35(27L)或gpl 00:209-217(210M)。其他適合的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【1334】在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含1000至2000

IU/mL、2000至3000 IU/mL、3000至4000 IU/mL、4000至5000 IU/mL、5000至6000 IU/mL、6000至7000 IU/mL、7000至8000 IU/mL、或8000 IU/mL IL-2。

【1335】在一些實施例中，細胞培養基包含OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL至1 ng/mL、1 ng/mL至5 ng/mL、5 ng/mL至10 ng/mL、10 ng/mL至20 ng/mL、20 ng/mL至30 ng/mL、30 ng/mL至40 ng/mL、40 ng/mL至50 ng/mL、及50 ng/mL至100 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基不包含OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【1336】在一些實施例中，細胞培養基包含一或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。

在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【1337】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【1338】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，在第二擴增期間，包括例如在根據圖1以及本文所描述之步驟D過程期間可包括IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，在根據圖1以及如本文中所描述之步驟D過程期間可包括IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合。

【1339】在一些實施例中，第二擴增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包含TNFRSF促效劑之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原

呈現細胞)之細胞培養基中發生。

【1340】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【1341】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些

實施例中，第二擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【1342】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中，TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【1343】在一些實施例中，REP及/或第二擴增係在瓶中進行，其中在150 mL培養基中混合主體TIL與100倍或200倍過量之不活化飼養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2。進行培養基更換(通常用新鮮培養基經由抽吸進行2/3培養基更換)直至細胞轉移至替代性生長箱室。替代生長箱室包括G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【1344】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為

REP過程之過程)縮短為7至14天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第二擴增縮短為11天。

【1345】在一些實施例中，REP及/或第二擴增可使用如先前描述的T-175瓶及透氣袋(Tran等人，《免疫療法雜誌(*J. Immunother.*)》**2008,** *31,* 742-51；Dudley等人，《免疫療法雜誌》**2003,** *26,* 332-42)或透氣性培養器皿(G-REX瓶)進行。在一些實施例中，第二擴增(包括稱為快速擴增之擴增)係在T-175培養瓶中進行，且可將懸浮於150 mL培養基中之約1×10^6個TIL添加至各T-175瓶中。TIL可在補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3的CM與AIM-V培養基之1:1混合物中培養。T-175瓶可在37℃、5% CO_2下培育。可在第5天使用具有3000 IU/mL IL-2的50/50培養基更換一半培養基。在一些實施例中，在第7天，可將來自兩個T-175瓶之細胞在3 L袋中組合，且將300 mL AIM V與5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2添加至300 mL TIL懸浮液中。每天或每兩天對各袋中之細胞數目進行計數，且添加新鮮培養基以使細胞計數保持在0.5與2.0×10^6個細胞/毫升之間。

【1346】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP之擴增，以及在圖1之步驟D中提及之擴增)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣瓶(G-REX 100，可購自美國明尼蘇達州新布賴頓市的威爾遜狼製造公司(Wilson Wolf Manufacturing Corporation))中進行，5×10^6或10×10^6個TIL可與PBMC一起在400 mL補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3(OKT3)之50/50培

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

【1347】在一些實施例中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)係在培養瓶中進行，其中在150 mL培養基中將主體TIL與100倍或200倍過量之不活化飼養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2混合。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，用新鮮培養基藉由抽吸來置換2/3的培養基。在一些實施例中，替代生長箱室包括G-REX瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【1348】在一些實施例中，進行第二擴增(包括稱為REP之擴增)，且進一步包含其中針對優良腫瘤反應性來選擇TIL之步驟。可使用此項技術中已知之任何選擇方法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其

揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【1349】視情況地，細胞存活率分析法可在第二擴增(包括稱為REP擴增之擴增)之後使用此項技術中已知之標準分析法進行。舉例而言，可在主體TIL樣品上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活率評估。在一些實施例中，TIL樣品可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活率。在一些實施例中，存活率係根據標準Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判定。

【1350】在一些實施例中，TIL之第二擴增(包括稱為REP之擴增)可使用如先前所描述之T-175瓶及透氣袋(Tran等人，**2008**，《免疫療法雜誌》，*31*，742-751，及Dudley等人，**2003**，《免疫療法雜誌》，*26*，332-342)或透氣G-REX瓶進行。在一些實施例中，使用瓶進行第二擴增。在一些實施例中，使用透氣G-REX瓶進行第二擴增。在一些實施例中，第二擴增係在T-175瓶中進行，且將約1×10^6個TIL懸浮於約150 mL培養基中且將其添加至各T-175瓶中。TIL與作為「飼養」細胞的經照射(50 Gy)之同種異體PBMC以1:100之比率一起培養且細胞在補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3的CM與AIM-V培養基之1:1混合物(50/50培養基)中培養。T-175瓶在37℃、5% CO_2下培育。在一些實施例中，在第5天使用具有3000 IU/mL IL-2的

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

【1351】在一些實施例中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)係在500 mL容量的具有100 cm^2透氣矽底的培養瓶(G-REX-100，Wilson Wolf)中進行，將約5×10^6或10×10^6個TIL與經照射之同種異體PBMC以1:100的比率在400 mL補充有3000 IU/mL IL-2及30 ng/mL抗CD3之50/50培養基中培養。G-REX-100瓶在37℃、5% CO_2下培育。在一些實施例中，在第5天，移出250 mL上清液且放入離心瓶中且以1500 rpm(491 g)離心10分鐘。TIL離心塊可隨後用具有3000 IU/mL IL-2之150 mL新鮮50/50培養基再懸浮且添加回初始G-REX-100瓶中。在TIL在G-REX-100瓶中連續擴增之一些實施例中，在第7天，將各G-REX-100中之TIL懸浮於各培養瓶中存在之300 mL培養基中，且將細胞懸浮液分成可用於接種3個G-REX-100瓶之三份100 mL等分試樣。隨後將150 mL具有5%人類AB血清及3000 IU/mL IL-2之AIM-V添加至各瓶中。G-REX-100瓶在37℃、5% CO_2下培育且在4天之後，將具有3000 IU/mL IL-2之150 mL AIM-V添加至各G-REX-100瓶中。在培養之第14天收集細胞。

【1352】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但

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

【1353】在一些實施例中，第二擴增培養基(例如，有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈現飼養細胞(APC)，如下文更詳細論述。

【1354】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培

養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1355】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括(但不限於)CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1356】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括(但不限於)以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫

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

【1357】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包括(但不限於)CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1358】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確

定培養基之總體積的約10%。

【1359】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【1360】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基及26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑在使用前混合在一起之組合。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%

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

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

【1361】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM的麩醯胺酸(亦即，GlutaMAX®)。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即，GlutaMAX®)。

【1362】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充

有濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，2-巰基乙醇於培養基中之最終濃度為55 μM。

【1363】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群的成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群的成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物及一或多種選自由以下組成之群的成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱

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

【1364】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1365】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元

素部分成分係以表12中之標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列舉之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表12中之標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列舉之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含表12中之標題「補充劑之較佳實施例」欄中列舉之類型及濃度的非微量部分成分。

【1366】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1367】在一些實施例中，Smith等人，《臨床與轉化免疫學(*Clin Transl Immunology*)》 4(1) 2015(doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1368】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第

一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1369】在一些實施例中，在密閉系統生物反應器中進行第二擴增，例如根據圖1之步驟D。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所使用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

【1370】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之縱向擴大(scaling up)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中在小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的TIL轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500-MCS容器)中且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的TIL約4天至7天之時段。

【1371】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大(scaling out)：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中在第一小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與第一容器相等的第二容器中，其中在各第二容器中，轉移

至此類第二容器中的來自第一小規模培養的TIL部分在第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。

【1372】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個TIL亞群中。

【1373】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中在小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分在較大規模培養中培養約4天至7天之時段。

【1374】在一些實施例中，快速或第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中在小規模培養中培養TIL約5天之時段來進行快速或第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養的TIL轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500 MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分在較大規模培養中培養約6天之時段。

【1375】在一些實施例中，在快速或第二擴增之分裂

後，各第二容器包含至少10^8個TIL。在一些實施例中，在快速或第二擴增之分裂後，各第二容器包含至少10^8個TIL、至少10^9個TIL或至少10^{10}個TIL。在一個例示性實施例中，各第二容器包含至少10^{10}個TIL。

【1376】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2、3、4或5個亞群中。

【1377】在一些實施例中，在完成快速或第二擴增後，複數個亞群包含治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速或第二擴增後，將一或多個TIL亞群合併在一起以產生治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，各TIL亞群包含治療有效量之TIL。

【1378】在一些實施例中，在分裂成複數個步驟之前，快速或第二擴增進行約3至7天之時段。在一些實施例中，快速或第二擴增之分裂發生在快速或第二擴增開始後約第3天、第4天、第5天、第6天或第7天。

【1379】在一些實施例中，快速或第二擴增之分裂發生在第一擴增(亦即，預REP擴增)開始後約第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天或第16天、第17天或第18天。在一個例示性實施例中，快速或第二擴增之分裂發生在第一擴增開始後約第16天。

【1380】在一些實施例中，在分裂之後，快速或第二擴增進一步進行約7至11天之時段。在一些實施例中，在分裂之後，快速或第二擴增進一步進行約5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段。

【1381】在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含與在分裂後用於快速或第二擴增之細胞培養基相同的組分。在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含與在分裂後用於快速或第二擴增之細胞培養基不同的組分。

【1382】在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC。在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及進一步視情況選用之APC。在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及APC。

【1383】在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC之新鮮細胞培養基置換第一擴增中

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

【1384】在一些實施例中，在分裂後用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2及視情況選用之OKT-3。在一些實施例中，在分裂後用於快速或第二擴增之細胞培養基包含IL-2及OKT-3。在一些實施例中，在分裂後用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及視情況選用之OKT-3之新鮮培養基置換在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂後用於快速或第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及OKT-3之新鮮培養基置換在分裂前用於快速或第二擴增之細胞培養基而產生。

【1385】在一些實施例中，快速擴增之分裂係在密閉系統中進行。

【1386】在一些實施例中，在快速或第二擴增期間之TIL培養規模之縱向擴大包含向TIL培養物中添加新鮮細胞培養基(亦稱為饋送TIL)。在一些實施例中，饋送包含頻繁地向TIL培養物中添加新鮮細胞培養基。在一些實施例中，饋送包含以規則間隔將新鮮細胞培養基添加至TIL培養物中。在一些實施例中，新鮮細胞培養基經由恆定流動而供應至TIL。在一些實施例中，使用諸如Xuri W25之自動細胞擴增系統進行快速擴增及饋送。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【1387】在一些實施例中，本文中所描述之第二擴增程序(例如包括諸如圖1之步驟D中所描述之擴增以及稱為REP之擴增)在REP TIL擴增期間及/或在第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【1388】一般而言，同種異體PBMC係經由照射或熱處理而不活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射之同種異體PBMC之無複製能力之例示性方案。

【1389】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在REP之第0天及/或第二擴增之第0天(亦即，第二擴增之起始日)放入培養物的初始活細胞數目，則認為PBMC係無複製能力的且可接受用於本文中所描述之TIL擴增程序。

【1390】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP之第0天及/或第二擴增之第0天(亦即，第二擴增之起始日)放入培養物的初始活細胞數目相比未增加，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文中所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1391】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP之第0天及/或第

二擴增之第0天(亦即，第二擴增之起始日)放入培養物的初始活細胞數目相比未增加，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文中所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。

【1392】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【1393】在一些實施例中，本文中所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞:約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文中所描述之第二擴增程序需要約2.5×10^9個飼養細胞:約50×10^6個TIL之比率。在其他實施例

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

【1394】在一些實施例中，本文中所描述之第二擴增程序在第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【1395】一般而言，同種異體PBMC係經由照射或熱處理而不活化，且用於本文中所描述之TIL擴增程序，包括圖式及實例中所描述之例示性程序。

【1396】在一些實施例中，在第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

2. 細胞介素及其他添加劑

【1397】本文中所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(尤其IL-2)之培養基，如此項技術中所已知。

【1398】或者，使用細胞介素之組合以及IL-2、IL-15及IL-21中之兩者或更多者之組合來進行TIL之快速擴增及/或第二擴增亦係可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別

有利於產生淋巴球，且尤其如其中所描述之T細胞。

【1399】在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基中添加OKT-3抗體或莫羅單抗，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基中添加4-1BB促效劑，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基中添加OX-40促效劑，如本文中其他地方所描述。此外，可在步驟D期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧化體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

E. 步驟E：收集TIL

【1400】在第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如圖1中所提供之一、二、三、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在兩個擴增步驟之後收集TIL，例如圖1中所提供。

【1401】TIL可以任何適當及無菌方式收集，包括例如離心。用於收集TIL之方法為此項技術中熟知的且任何此類已知方法皆可與本發明之方法一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【1402】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包括例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec

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

【1403】在一些實施例中，收集，例如根據圖1之步驟E，係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所使用的單一生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。

【1404】在一些實施例中，根據圖1之步驟E根據本文中所描述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例中所描述之密閉系統。

【1405】在一些實施例中，根據實例中所描述之方法

收集TIL。在一些實施例中，第1天及第11天之間的TIL係使用如本文提及之步驟中所描述之方法收集，例如實例中之第11天TIL收集。在一些實施例中，第12及第24天之間的TIL係使用如本文提及之步驟中所描述之方法收集，例如實例中之第22天TIL收集。在一些實施例中，第12及第22天之間的TIL使用如本文提及之步驟中所描述之方法收集，例如實例中之第22天TIL收集。

F. 步驟F：最終調配及轉移至輸注容器

【1406】在如圖1中以例示性次序提供且如上文及本文中所詳細概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器中以用於向患者投與，諸如輸注袋或無菌小瓶。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療足夠數目之TIL後，將其轉移至容器以用於向患者投與。

【1407】在一些實施例中，使用本揭示案之APC擴增之TIL以醫藥組合物之形式向患者投與。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投與。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

VII. Gen 3 TIL製造方法

【1408】在不受任何特定理論限制的情況下，咸信如

本發明方法中所描述之起動T細胞活化的啟始第一擴增及隨後的加強T細胞活化的快速第二擴增，允許製備保留「較年輕」表現型之經擴增T細胞，且因此預期本發明之經擴增T細胞相較於藉由其他方法擴增之T細胞可對癌細胞展現較高細胞毒性。特定言之，咸信如本發明方法所教示之藉由暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)、IL-2及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)來起動T細胞之活化且接著藉由後續暴露於另外的抗CD-3抗體(例如OKT-3)、IL-2及APC來加強，其限制或避免培養基中之T細胞的成熟，從而產生具有較不成熟表現型之T細胞群體，該等T細胞因培養擴增而耗減較少且對癌細胞展現較高細胞毒性。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下達成培養規模之縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100 MCS容器)中的小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的T細胞轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX 500 MCS容器)且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的T細胞約4天至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100 MCS容器)中的第一小規模培養中培養T細胞約3天至4天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)將來自第一小規模培養中的T細胞轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或

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

【1409】在一些實施例中，在快速擴增之分裂後，各第二容器包含至少10^8個TIL。在一些實施例中，在快速擴增之分裂後，各第二容器包含至少10^8個TIL、至少10^9個

TIL或至少10^{10}個TIL。在一個例示性實施例中，各第二容器包含至少10^{10}個TIL。

【1410】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2、3、4或5個亞群中。

【1411】在一些實施例中，在完成快速擴增後，複數個亞群包含治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，將一或多個TIL亞群合併在一起以產生治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，各TIL亞群包含治療有效量之TIL。

【1412】在一些實施例中，在分成複數個步驟之前將快速擴增進行約1至5天之時段。在一些實施例中，快速擴增之分裂發生在快速擴增開始後約第1天、第2天、第3天、第4天或第5天。

【1413】在一些實施例中，快速擴增之分裂發生在第一擴增(亦即，預REP擴增)開始後約第8天、第9天、第10天、第11天、第12天或第13天。在一個例示性實施例中，快速擴增之分裂發生在第一擴增開始後約第10天。在另一例示性實施例中，快速擴增之分裂發生在第一擴增開始後約第11天。

【1414】在一些實施例中，在分裂之後，快速擴增進一步進行約4至11天之時段。在一些實施例中，在分裂之

後，快速擴增進一步進行約3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段。

【1415】在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基包含與在分裂後用於快速擴增之細胞培養基相同的組分。在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基包含與在分裂後用於快速擴增之細胞培養基不同的組分。

【1416】在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC。在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及進一步視情況選用之APC。在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及APC。

【1417】在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮細胞培養基

來替換第一擴增中的細胞培養基而產生。

【1418】在一些實施例中，在分裂後用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2及視情況選用之OKT-3。在一些實施例中，在分裂後用於快速擴增之細胞培養基包含IL-2及OKT-3。在一些實施例中，在分裂後用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及視情況選用之OKT-3之新鮮培養基來替換在分裂前用於快速擴增之細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂後用於快速擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及OKT-3之新鮮培養基來替換在分裂前用於快速擴增之細胞培養基而產生。

【1419】在一些實施例中，快速擴增之分裂係在密閉系統中進行。

【1420】在一些實施例中，在快速擴增期間TIL培養規模之縱向擴大包含向TIL培養物中添加新鮮細胞培養基(亦稱為饋送TIL)。在一些實施例中，饋送包含頻繁地向TIL培養物中添加新鮮細胞培養基。在一些實施例中，饋送包含以規則間隔將新鮮細胞培養基添加至TIL培養物中。在一些實施例中，新鮮細胞培養基經由恆定流動而供應至TIL。在一些實施例中，使用諸如Xuri W25之自動細胞擴增系統進行快速擴增及饋送。

【1421】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由啟始第一擴增所實現之T細胞活化開始降低、趨緩、衰退或消退之後進行。

【1422】在一些情況下，快速第二擴增係在藉由啟始

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

【1423】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由啟始第一擴增所實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至100%之範圍中的百分比之後進行。

【1424】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由啟始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1%至10%、10%至20%、20%至30%、30%至40%、40%至50%、50%至60%、60%至70%、70%至80%、80%至90%或90%至100%之範圍中之百分比之後進行。

【1425】在一些實施例中，快速第二擴增係在藉由啟始第一擴增實現之T細胞活化已降低在至少或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、

54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%之後進行。

【1426】在一些情況下，快速第二擴增係在藉由啟始第一擴增實現之T細胞活化已降低剛好或大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%之後進行。

【1427】在一些實施例中，藉由啟始第一擴增實現之T細胞活化之降低係藉由T細胞回應於抗原刺激而釋放之干擾素γ之量的減少來判定。

【1428】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係於至多剛好或大約7天或大約8天之時段內進行。

【1429】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【1430】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係

在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行。

【1431】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約11天之時段內進行。

【1432】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【1433】在一些實施例中，T細胞之快速第二擴增係在1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【1434】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約11天之時段內進行。

【1435】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係於至多剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【1436】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係於在剛好或大約1天至剛好或大約8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在剛好或大約1天至剛好或大約9天之時段內進行。

【1437】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係

在8天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【1438】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係於在剛好或大約1天至處於或約7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在處於或約1天至處於或約9天之時段內進行。

【1439】在一些實施例中，T細胞之啟始第一擴增係在7天之時段內進行且T細胞之快速第二擴增係在9天之時段內進行。

【1440】在一些實施例中，T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【1441】在一些實施例中，T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【1442】在一些實施例中，T細胞為周邊血液淋巴球(PBL)。

【1443】在一些實施例中，T細胞獲自罹患癌症之供體。

【1444】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患癌症之患者所切除之腫瘤的TIL。

【1445】在一些實施例中，T細胞為獲自罹患血液惡性病之患者之骨髓的MIL。

【1446】在一些實施例中，T細胞為獲自供體之周邊血液單核細胞(PBMC)的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症為選自由以下組成之群之癌

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

【1447】在本發明之某些態樣中，免疫效應細胞(例如T細胞)可使用本領域技術人員已知之任何數目之技術(諸如FICOLL分離)自收集自個體之血液單元獲得。在一個較佳態樣中，藉由血球分離術獲得來自個體之循環血液的細胞。血球分離術產物通常含有淋巴球，包括T細胞、單核球、顆粒球、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一態樣中，藉由血球分離術收集之細胞可經洗滌以移除血漿級份且視情況將細胞置於適當緩衝液或培養基中以用於後續處理步驟。在一些實施例中，細胞係用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌。在一替代實施例中，洗滌溶液缺乏鈣，且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。在一個態樣中，藉由溶解紅血球及例如藉由經由

PERCOLL梯度離心或藉由逆流離心淘析耗減單核球，自周邊血液淋巴球分離T細胞。

【1448】在一些實施例中，T細胞為自供體之全血或富含淋巴球之血球分離術產物分離的PBL。在一些實施例中，供體罹患癌症。在一些實施例中，癌症為選自由以下組成之群之癌症：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係選自由以下組成之群：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，供體罹患腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為液體腫瘤。在一些實施例中，腫瘤為實體腫瘤。在一些實施例中，供體罹患血液惡性病。在一些實施例中，PBL係藉由使用陽性或陰性選擇方法而自全血或富含淋巴球之血球分離術產物分離，亦即，使用T細胞表現型之標記物(例如，CD3+CD45+)移除PBL，或移除非T細胞表現型細胞而留下PBL。在其他實施例中，PBL係藉由梯度離心分離。在自供體組織分離PBL後，PBL之啟始第一擴增可根據本文所描述之任何方法之啟始第一擴增步驟，藉由將適合數目之經分離PBL(在一些實施例中，約

1×10^7個PBL)接種於啟始第一擴增培養物中來起始。

【1449】含有一些此等特徵的稱為過程3(在本文中亦稱為Gen 3)之例示性TIL過程描繪於圖8(特定言之，例如圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中，且本發明之此實施例與Gen 2相比的一些優勢描述於圖1、圖2、圖8、圖30及圖31(特定言之，例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中。Gen 3之實施例展示於圖1、圖8及圖30(特定言之，例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中。過程2A或Gen 2或Gen 2A亦描述於美國專利公開案第2018/0280436號中，其以全文引用之方式併入本文中。Gen 3過程亦描述於國際專利公開案WO 2020/096988中。

【1450】如本文中所論述及大體上概述，TIL係取自患者樣品，並且使用本文所描述且稱為Gen 3之TIL擴增過程操作以在移植至患者中之前擴增其數目。在一些實施例中，TIL可視情況如下文所論述經基因操作。在一些實施例中，TIL可在擴增之前或之後冷凍保存。在解凍後，其亦可在輸注至患者中之前經再刺激以增加其代謝。

【1451】在一些實施例中，啟始第一擴增(包括本文中稱為預快速擴增(預REP)的過程，以及圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中示為步驟B之過程)縮短為1至8天，且快速第二擴增(包括在本文中稱為快速擴增方案(REP)的過程以及圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中示為步驟D的過程)縮短為1至9天，如以下及實例及圖式中所詳細論述。在一些實施例中，啟始

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

描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為8至9天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)縮短為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為7至8天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為8天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為9天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)為8天，且快速第二擴增(例如，如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為10天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為7至10天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例

如，圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為8至10天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為9至10天。在一些實施例中，啟始第一擴增(例如，圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中描述為步驟B之擴增)縮短為7天，且快速第二擴增(例如，如圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟D中所描述之擴增)為7至9天。在一些實施例中，啟始第一擴增及快速第二擴增(例如，在圖8 (尤其例如圖1B及/或圖8C)中描述為步驟B及步驟D之擴增)之組合為14至16天，如下文以及實例及圖式中所詳細論述。特定言之，認為本發明之某些實施例包含啟始第一擴增步驟，其中TIL藉由在IL-2存在下暴露於抗CD3抗體(例如OKT-3)或在至少IL-2及抗CD3抗體(例如OKT-3)存在下暴露於抗原而活化。在某些實施例中，在如上文所描述之啟始第一擴增步驟中活化之TIL為第一TIL群體，亦即，其為初代細胞群體。

【1452】下文中的「步驟」標識A、B、C等係參考圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中之非限制性實例及參考本文中所描述之某些非限制性實施例。以

下及圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中的步驟次序為例示性的，且本申請案及本文中所揭示之方法涵蓋步驟之任何組合或次序，以及另外的步驟、步驟重複及/或步驟省略。

A. 步驟A：獲得患者腫瘤樣品

【1453】通常，TIL最初係獲自患者腫瘤樣品(「初代TIL」)或獲自循環淋巴球(諸如周邊血液淋巴球，包括具有TIL樣特徵之周邊血液淋巴球)，且接著擴增成較大群體以進行如本文中所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表現型及作為TIL健康指標之代謝參數。

【1454】患者腫瘤樣品可使用此項技術中已知之方法獲得，通常經由手術切除、針吸生檢或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物之樣品的手段獲得。一般而言，腫瘤樣品可來自任何實體腫瘤，包括原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣品亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。實體腫瘤可為任何癌症類型，包括(但不限於)乳癌、胰臟癌、前列腺癌、大腸直腸癌、肺癌、腦癌、腎癌、胃癌及皮膚癌(包括(但不限於)鱗狀細胞癌、基底細胞癌及黑色素瘤)。在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包括例如頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(GBM)、胃腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰臟癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例

中，適用的TIL係獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為據報導此等腫瘤具有特別高含量之TIL。

【1455】一旦獲得，腫瘤樣品通常使用銳器分割片段化成1 mm^3至約8 mm^3之間的小型片狀物，其中約2-3 mm^3為尤其適用的。TIL係自此等片段使用酶素性腫瘤消化物培養。此類腫瘤消化物可藉由在酶素性培養基(例如羅斯威爾公園癌症研究所(Roswell Park Memorial Institute；RPMI)1640緩衝液、2 mM麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素、30單位/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，接著進行機械解離(例如使用組織解離器)來產生。腫瘤消化物可藉由以下產生：將腫瘤置放於酶素性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，隨後在前述條件下重複機械解離及培育循環，直至僅存在小組織片。在此過程結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用FICOLL分支鏈親水性多醣之密度梯度分離以移除此等細胞。可使用此項技術中已知之替代方法，諸如美國專利申請公開案第2012/0244133A1號中所描述之方法，該公開案之揭示內容以引用之方式併入本文中。任何前述方法可用於本文中所描述之任何實施例中擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【1456】如上文所指出，在一些實施例中，TIL係衍生自實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤未經片段化。在一些實施例中，實體腫瘤未經片段化且以全腫瘤進行酶消化。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA

酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化。在一些實施例中，腫瘤係在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、旋轉下在包含膠原蛋白酶、DNA酶及玻尿酸酶之酶混合物中消化1至2小時。在一些實施例中，腫瘤係在恆定旋轉下消化隔夜。在一些實施例中，腫瘤係在37℃、5% CO_2、恆定旋轉下消化隔夜。在一些實施例中，整個腫瘤與酶組合以形成腫瘤消化反應混合物。

【1457】在一些實施例中，在無菌緩衝液中用凍乾酶復原腫瘤。在一些實施例中，緩衝液為無菌HBSS。

【1458】在一些實施例中，酶混合物包含膠原蛋白酶。在一些實施例中，膠原蛋白酶為膠原蛋白酶IV。在一些實施例中，膠原蛋白酶之工作儲備液為100 mg/mL 10X工作儲備液。

【1459】在一些實施例中，酶混合物包含DNA酶。在一些實施例中，DNA酶之工作儲備液為10,000 IU/mL 10X工作儲備液。

【1460】在一些實施例中，酶混合物包含玻尿酸酶。在一些實施例中，玻尿酸酶之工作儲備液為10 mg/mL 10X工作儲備液。

【1461】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL膠原蛋白酶、1000 IU/mLDNA酶和1 mg/mL玻尿酸酶。

【1462】在一些實施例中，酶混合物包含10 mg/mL膠原蛋白酶、500 IU/mLDNA酶和1 mg/mL玻尿酸酶。

【1463】一般而言，獲自腫瘤之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包含抗原呈現細胞、IL-12及OKT-3之細胞培養基。

【1464】在一些實施例中，片段化包括物理片段化，包括例如分割以及消化。在一些實施例中，片段化為物理片段化。在一些實施例中，片段化為分割。在一些實施例中，片段化係藉由消化。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤消化物及腫瘤片段培養。在一些實施例中，TIL最初可自獲自患者之酶素性腫瘤消化物及腫瘤片段培養。

【1465】在一些實施例中，當腫瘤為實體腫瘤時，在例如步驟A(如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供)中獲得腫瘤樣本之後，對腫瘤進行物理片段化。在一些實施例中，片段化發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，片段化發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，片段化在獲得腫瘤之後並且在不進行任何冷凍保存的情況下發生。在一些實施例中，片段化步驟係活體外或離體過程。在一些實施例中，將腫瘤片段化且將10、20、30、40或更多個片段或塊置於各容器中進行啟始第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤片段化且將30或40個片段或塊置於各容器中進行啟始第一擴增。在一些實施例中，

將腫瘤片段化且將40個片段或塊置於各容器中進行啟始第一擴增。在一些實施例中，多個片段包含約4個至約50個片段，其中各片段之體積為約27 mm^3。在一些實施例中，多個片段包含約30個至約60個片段，其總體積為約1300 mm^3至約1500 mm^3。在一些實施例中，多個片段包含約50個片段，其總體積為約1350 mm^3。在一些實施例中，多個片段包含約50個片段，其總質量為約1公克至約1.5公克。在一些實施例中，多個片段包含約4個片段。

【1466】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤片段。在一些實施例中，腫瘤片段係藉由銳器分割獲得。在一些實施例中，腫瘤片段在約1 mm^3與10 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤片段在約1 mm^3與8 mm^3之間。在一些實施例中，腫瘤片段為約1 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約2 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約3 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約4 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約5 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約6 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約7 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約8 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約9 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為約10 mm^3。在一些實施例中，腫瘤片段為1至4 mm×1至4 mm×1至4 mm。在一些實施例中，腫瘤片段為1 mm×1 mm×1 mm。在一些實施例中，腫瘤片段為2 mm×2 mm×2 mm。在一些實施例中，腫瘤片段為3 mm×3 mm×3 mm。在一些實施例中，腫瘤片段為4 mm×4 mm×4 mm。

【1467】在一些實施例中，腫瘤經片段化以使各塊上出血性、壞死及/或脂肪組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經片段化以使各塊上出血性組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經片段化以使各塊上壞死組織之量減至最小。在一些實施例中，腫瘤經片段化以使各塊上脂肪組織之量減至最小。在某些實施例中，腫瘤片段化步驟係活體外或離體方法。

【1468】在一些實施例中，進行腫瘤片段化以便維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，在不使用解剖刀進行鋸切動作的情況下進行腫瘤片段化。在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤消化物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如(但不限於)RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤消化物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在37℃下在5% CO_2中再培育30分鐘之後，可將腫瘤第三次機械破壞大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後若大片組織仍存在，則施加1或2次另外機械解離至樣品，不論是否再在37℃下在5% CO_2中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，若細胞懸浮液含有大量紅血球或死細胞，則可進行使用Ficoll之密度梯度分離以移除此等細胞。

【1469】在一些實施例中，將啟始第一擴增步驟之前的細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。

【1470】在一些實施例中，細胞可視情況在樣品分離之後(例如，在獲得腫瘤樣品後及/或在自腫瘤樣品獲得細胞懸浮液後)冷凍，且在進入步驟B中所描述之擴增之前冷凍儲存，該步驟B進一步詳細描述於下文且例示於圖8(尤其例如圖8B)中。

1. 粗針/小型生檢衍生之TIL

【1471】在一些實施例中，TIL最初係獲自藉由粗針生檢或類似程序獲得之患者腫瘤樣品(「初代TIL」)且隨後擴增成較大群體以進行如本文中所描述之進一步操作，視情況經冷凍保存且視情況評估表現型及代謝參數。

【1472】在一些實施例中，患者腫瘤樣品可使用此項技術中已知之方法獲得，通常經由小型生檢、粗針生檢、針吸生檢或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物之樣品的手段獲得。一般而言，腫瘤樣品可來自任何實體腫瘤，包括原發性腫瘤、侵襲性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣品亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病之腫瘤。在一些實施例中，樣品可來自多個小腫瘤樣品或生檢。在一些實施例中，樣品可包含來自同一患者之單一腫瘤的多個腫瘤樣品。在一些實施例中，樣品可包含來自同一患者之一個、兩個、三個或四個腫瘤的多個腫瘤樣品。在一些實施

例中，樣品可包含來自同一患者之多個腫瘤的多個腫瘤樣品。實體腫瘤可為肺及/或非小細胞肺癌(NSCLC)。

【1473】一般而言，獲自腫瘤核心或片段之細胞懸浮液稱為「初代細胞群體」或「新鮮獲得的」或「新鮮分離的」細胞群體。在某些實施例中，新鮮獲得之TIL細胞群體暴露於包含抗原呈現細胞、IL-2及OKT-3之細胞培養基。

【1474】在一些實施例中，若腫瘤為轉移性腫瘤且在過去已有效治療/移除原發性病灶，則可能需要移除一個轉移性病灶。在一些實施例中，若可用，微創方法係移除皮膚病灶或頸部或腋窩區域上的淋巴結。在一些實施例中，移除皮膚病灶或移除其小型生檢。在一些實施例中，移除淋巴結或其小型生檢。在一些實施例中，腫瘤為黑色素瘤。在一些實施例中，黑色素瘤之小型生檢包含黑痣或其一部分。

【1475】在一些實施例中，小型生檢為穿孔生檢。在一些實施例中，穿孔生檢係以圓形刀片壓入皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔生檢係以圓形刀片壓入可疑黑痣周圍的皮膚中獲得。在一些實施例中，穿孔生檢係以圓形刀片壓入皮膚中獲得，並且移除一塊圓形皮膚。在一些實施例中，小型生檢為穿孔生檢且移除圓形部分的腫瘤。

【1476】在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢。在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢且移除整個黑痣或生長物。在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢且連

同小邊緣之正常外觀皮膚移除整個黑痣或生長物。

【1477】在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢。在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢且僅採集最不規則部分之黑痣或生長物。在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢，且該切開式生檢係在其他技術無法完成時使用，諸如當可疑黑痣非常大時使用。

【1478】在一些實施例中，小型生檢為肺生檢。在一些實施例中，小型生檢係藉由支氣管鏡檢獲得。一般而言，支氣管鏡檢係在患者麻醉下使小工具通過鼻或口、下至咽喉且進入支氣管通道，其中小工具係用於移除一些組織。在一些實施例中，在無法經由支氣管鏡檢達到腫瘤或生長物的情況下，可以採用經胸針吸生檢。一般而言，對於經胸針吸生檢，患者亦處於麻醉下且將針穿過皮膚直接插入可疑位點以移除小樣品的組織。在一些實施例中，經胸針吸生檢可能需要介入性放射線學(例如使用x射線或CT掃描引導針頭)。在一些實施例中，小型生檢係藉由針吸生檢獲得。在一些實施例中，小型生檢係經內視鏡超音波獲得(例如，內視鏡附燈且經口置於食道中)。在一些實施例中，小型生檢係經手術獲得。

【1479】在一些實施例中，小型生檢為頭頸生檢。在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢。在一些實施例中，小型生檢為切開式生檢，其中自外觀異常區域切除一小塊組織。在一些實施例中，若容易接近異常區，則無需住院即可採集樣品。在一些實施例中，若腫瘤在口腔或咽

喉內部較深處，則生檢可能需要在手術室全身麻醉進行。在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢。在一些實施例中，小型生檢為切除式生檢，其中移除整個區域。在一些實施例中，小型生檢為細針抽吸(FNA)。在一些實施例中，小型生檢為細針抽吸(FNA)，其中使用附接至注射器之非常細的針頭自腫瘤或腫塊抽取(抽吸)細胞。在一些實施例中，小型生檢為穿孔生檢。在一些實施例中，小型生檢為穿孔生檢，其中使用穿孔鑷移除一塊可疑區域。

【1480】在一些實施例中，小型生檢為子宮頸生檢。在一些實施例中，小型生檢係經由陰道鏡獲得。通常，陰道鏡方法採用附接至雙目放大鏡的附燈放大儀器(陰道鏡)，接著用於對一小部分之子宮頸進行生檢檢查。在一些實施例中，小型生檢為子宮頸錐狀切除/錐狀生檢。在一些實施例中，小型生檢為子宮頸錐狀切除/錐狀生檢，其中可能需要門診手術以自子宮頸移除較大塊組織。在一些實施例中，除了有助於確診之外，錐狀生檢亦可以用作初始治療。

【1481】術語「實體腫瘤」係指通常不含囊腫或液體區域的異常組織團塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。術語「實體腫瘤癌症」係指惡性、贅生性或癌性實體腫瘤。實體腫瘤癌症包括肺癌。在一些實施例中，癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，癌症為非小細胞肺癌(NSCLC)。實體腫瘤之組織結構包括相互相依組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支援性微環境之支援

性基質細胞。

【1482】在一些實施例中，來自腫瘤之樣品係以細針抽吸物(FNA)、粗針生檢、小型生檢(包括例如穿孔生檢)形式獲得。在一些實施例中，首先將樣品置放於G-REX-10中。在一些實施例中，當存在1個或2個芯針生檢及/或小型生檢樣品時，首先將樣品置於G-REX-10中。在一些實施例中，當存在3、4、5、6、8、9或10個或更多個芯針生檢及/或小型生檢樣品時，首先將樣品置放於G-REX-100中。在一些實施例中，當存在3、4、5、6、8、9或10個或更多個芯針生檢及/或小型生檢樣品時，首先將樣品置放於G-REX-500中。

【1483】FNA可獲自皮膚腫瘤，包括例如黑色素瘤。在一些實施例中，FNA係獲自皮膚腫瘤，諸如來自患有轉移性黑色素瘤之患者的皮膚腫瘤。在一些情況下，患有黑色素瘤之患者先前已經歷手術治療。

【1484】FNA可獲自肺腫瘤，包括例如NSCLC。在一些實施例中，FNA係獲自肺腫瘤，諸如來自非小細胞肺癌(NSCLC)患者的肺腫瘤。在一些情況下，NSCLC患者先前已經受外科治療。

【1485】本文所描述之TIL可獲自FNA樣品。在一些情況下，FNA樣品係使用在18號針頭至25號針頭範圍中的細號規針頭自患者獲得或分離。細號規針頭可為18號、19號、20號、21號、22號、23號、24號或25號。在一些實施例中，來自患者之FNA樣品可含有至少400,000個TIL，例

如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【1486】在一些情況下，本文所描述之TIL係獲自粗針生檢樣品。在一些情況下，粗針生檢樣品係使用在11號針頭至16號針頭範圍中的外科或醫用針頭自患者獲得或分離。針頭可為11號、12號、13號、14號、15號或16號。在一些實施例中，來自患者之粗針生檢樣品可含有至少400,000個TIL，例如400,000個TIL、450,000個TIL、500,000個TIL、550,000個TIL、600,000個TIL、650,000個TIL、700,000個TIL、750,000個TIL、800,000個TIL、850,000個TIL、900,000個TIL、950,000個TIL或更多。

【1487】一般而言，經收集之細胞懸浮液被稱為「初代細胞群體」或「新鮮收集的」細胞群體。

【1488】在一些實施例中，TIL並非獲自腫瘤消化物。在一些實施例中，實體腫瘤核心未經片段化。

【1489】在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤消化物。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如(但不限於)RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)中培育，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術的GentleMACS)來產生腫瘤消化物。在將腫瘤置於酶培養基中之後，可以機械方式將腫瘤解離大約1分鐘。隨後可將溶液在37℃下在5%

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

【1490】在一些實施例中，獲得第一TIL群體包含多病灶取樣方法。

【1491】腫瘤解離酶混合物可包括一或多種解離(消化)酶，諸如但不限於膠原蛋白酶(包括任何摻合或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、酪蛋白酶、彈性蛋白酶、木瓜酶、XIV型蛋白酶(鏈蛋白酶)、去氧核糖核酸酶I(DNA酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。

【1492】在一些實施例中，解離酶係自凍乾酶復原。在一些實施例中，凍乾酶係在一定量之無菌緩衝液，諸如漢克氏平衡鹽溶液(Hank's balance salt solution，HBSS)中復原。

【1493】在一些情況下，膠原蛋白酶(諸如無動物源1型膠原蛋白酶)係在10 mL無菌HBSS或另一緩衝液中復原。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶2892 PZ U。在一些實

施例中，膠原蛋白酶係在5 mL至15 mL緩衝液中復原。在一些實施例中，在復原後，膠原蛋白酶儲備液的範圍為約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL，例如約100 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL至約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL至約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL或約400 PZ U/mL。

【1494】在一些實施例中，中性蛋白酶係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中復原。凍乾儲備酶之濃度可為每小瓶175 DMC U。在一些實施例中，在復原後，中性蛋白酶儲備液之範圍為100 DMC/mL至約400 DMC/mL，例如，約100 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL至約350 DMC/mL、約100 DMC/mL至約300 DMC/mL、約150 DMC/mL至約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL或約400 DMC/mL。

【1495】在一些實施例中，DNA酶I係在1 mL無菌HBSS或另一緩衝液中復原。凍乾儲備酶之濃度為每小瓶4

KU。在一些實施例中，在復原後，DNA酶I儲備液的範圍為約1 KU/mL至10 KU/mL，例如約1 KU/mL、約2 KU/mL、約3 KU/mL、約4 KU/mL、約5 KU/mL、約6 KU/mL、約7 KU/mL、約8 KU/mL、約9 KU/mL或約10 KU/mL。

【1496】在一些實施例中，酶儲備液可發生變化，因此驗證凍乾儲備液之濃度且相應地修改添加至消化混合液中的酶之最終量。

【1497】在一些實施例中，酶混合物包括約4.7 mL無菌HBSS中的約10.2 μl中性蛋白酶(0.36 DMC U/mL)、21.3 μl膠原蛋白酶(1.2 PZ/mL)及250 μl DNA酶I (200 U/mL)。

2. 胸腔積液T細胞和TIL

【1498】在一些實施例中，樣品為胸膜液樣品。在一些實施例中，根據本文中所描述之方法的用於擴增之T細胞或TIL的來源為胸膜液樣品。在一些實施例中，樣品為源於胸腔積液之樣品。在一些實施例中，根據本文中所描述之方法的用於擴增之T細胞或TIL的來源為胸腔積液衍生之樣品。參見例如美國專利公開案US 2014/0295426中所描述之方法，其出於所有目的以全文引用之方式併入本文中。

【1499】在一些實施例中，可以採用疑似及/或含有TIL之任何胸膜液或胸腔積液。此類樣品可來源於原發性或轉移性肺癌，諸如NSCLC或SCLC。在一些實施例中，

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

【1500】在一些實施例中，胸膜液呈未經處理之形式直接自患者移除。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準血液收集管(諸如EDTA或肝素管)中。在一些實施例中，在接觸步驟之前，將未經處理之胸膜液置於標準CellSave®管(Veridex)中。在一些實施例中，在自患者收集之後立即將樣品置於CellSave管中，以避免活TIL之數目減少。若保留在未經處理之胸膜液中，即使在4℃下，活TIL之數目可能在24小時內顯著降低。在一些實施例中，樣品係在自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，樣品係在4℃下自患者移除之後1小時、5小時、10小時、15小時或至多24小時內置於適當收

集管中。

【1501】在一些實施例中，可以稀釋來自所選個體之胸膜液樣品。在一些實施例中，稀釋度為1:10胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:9胸膜液對稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:8胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:5胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:2胸膜液比稀釋劑。在其他實施例中，稀釋度為1:1胸膜液比稀釋劑。在一些實施例中，稀釋劑包括鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水、另一緩衝液或生理學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，樣品係在自患者收集及稀釋之後立即置於CellSave管中，以避免活TIL減少，若保留在未經處理之胸膜液中，則即使在4℃下，活TIL可能在24至48小時內顯著減少。在一些實施例中，胸膜液樣品係在自患者移除且稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。在一些實施例中，胸膜液樣品係在自患者移除且在4℃下稀釋之後1小時、5小時、10小時、15小時、24小時、36小時、至多48小時內置於適當收集管中。

【1502】在其他實施例中，在進一步處理步驟之前，藉由習知手段濃縮胸膜液樣品。在一些實施例中，在胸膜液必須冷凍保存以便運送至進行該方法之實驗室或用於後續分析(例如，在收集後24至48小時之後)之情形下，此胸膜液之預處理較佳。在一些實施例中，藉由在將胸膜液樣品自個體中取出後將其離心並將離心液或沈澱物再懸浮於

緩衝液中來製備胸膜液樣品。在一些實施例中，對胸膜液樣品進行多次離心及再懸浮，隨後將其冷凍保存以用於運輸或以後的分析及/或處理。

【1503】在一些實施例中，在進一步的處理步驟之前，藉由使用過濾方法濃縮胸膜液樣品。在一些實施例中，在接觸步驟中使用之胸膜液樣品係藉由將流體經由含有已知且基本均勻的孔徑的過濾器過濾而製備的，該孔徑允許胸膜液通過膜但保留腫瘤細胞。在一些實施例中，膜中的孔之直徑可為至少4 μM。在其他實施例中，孔徑可為5 μM或更大，且在其他實施例中，可為6 μM、7 μM、8 μM、9 μM或10 μM中之任一者。過濾之後，可將被膜保留之細胞(包括TIL)自膜上衝出至適合的生理學上可接受之緩衝液中。接著可以將以此方式濃縮之細胞(包括TIL)用於該方法之接觸步驟中。

【1504】在一些實施例中，使胸膜液樣品(包括例如未經處理之胸膜液)、經稀釋之胸膜液或再懸浮之細胞沈澱物與溶解試劑接觸，該溶解試劑係差異性地溶解樣品中存在之無核紅血球。在一些實施例中，在胸膜液含有大量RBC之情形下，此步驟係在進一步的處理步驟之前進行。適合的溶解試劑包括單一溶解試劑或溶解試劑及淬滅試劑，或溶解試劑、淬滅試劑及固定試劑。適合的溶解系統為市售的，且包括BD Pharm Lyse™系統(碧迪醫療公司(Becton Dickenson))。其他溶解系統包括Versalyse™系統、FACSlyse™系統(碧迪醫療公司)、Immunoprep™系統

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

【1505】在一些實施例中，在約-140℃之溫度下冷凍保存如上文所描述之未經處理、稀釋或多次離心或處理的胸膜液樣品，隨後如本文所提供進行進一步處理及/或擴增。

3. 擴增來自周邊血液之周邊血液淋巴球(PBL)之方法

【1506】PBL方法1。在本發明之一些實施例中，PBL係使用本文所描述之方法擴增。在本發明之一些實施例中，該方法包含獲得來自全血之PBMC樣品。在一些實施例中，該方法包含藉由使用非CD19+級份之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。在一些實施例中，該方法包含藉由使用非CD19+級份之基於磁珠之負向選擇以自PBMC中分離純T細胞來富集T細胞。

【1507】在本發明之一些實施例中，PBL方法1如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣品解凍且計算

PBMC之數目。使用人類泛T細胞分離套組與LS管柱(美天旎生物技術)分離T細胞。

【1508】PBL方法2。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法2擴增，該方法包含獲得來自全血之PBMC樣品。藉由在37℃下培育PBMC至少三小時且接著分離非黏著細胞來富集來自PBMC之T細胞。

【1509】在本發明之一些實施例中，PBL方法2如下進行：在第0天，將經冷凍保存之PMBC樣品解凍，且將PBMC細胞以每孔6百萬個細胞接種於CM-2培養基中之6孔盤中並且在37℃下培育3小時。3小時後，移除非黏著細胞(其係PBL)且計算其數目。

【1510】PBL方法3。在本發明之一些實施例中，PBL係使用PBL方法3擴增，該方法包含獲得來自周邊血液之PBMC樣品。B細胞係使用CD19+選擇分離且T細胞係使用負向選擇PBMC樣品之非CD19+級份來選擇。

【1511】在本發明之一些實施例中，PBL方法3如下進行：在第0天，將來源於周邊血液的冷凍保存之PBMC解凍且計算其數目。使用CD19多分選人類套組(美天旎生物技術)分選CD19+ B細胞。在非CD19+細胞級份中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱(美天旎生物技術)純化T細胞。

【1512】在一些實施例中，PBMC係自全血樣品分離。在一些實施例中，使用PBMC樣品作為擴增PBL之起始物質。在一些實施例中，樣品在擴增過程之前經冷凍保

存。在其他實施例中，使用新鮮樣品作為擴增PBL之起始物質。在本發明之一些實施例中，使用此項技術中已知之方法自PBMC分離T細胞。在一些實施例中，使用人類泛T細胞分離套組及LS管柱分離T細胞。在本發明之一些實施例中，使用此項技術中已知之抗體選擇方法(例如CD19負向選擇)自PBMC分離T細胞。

【1513】在本發明之一些實施例中，PBMC樣品係在可有效鑑別非黏著細胞之所需溫度下培育一段時間。在本發明之一些實施例中，培育時間為約3小時。在本發明之一些實施例中，溫度為約37℃。接著使用上文所描述的過程擴增非黏著細胞。

【1514】在一些實施例中，PBMC樣品係來自視情況已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，腫瘤樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療之個體或患者，其已進行治療至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或1年或更長。在其他實施例中，PBMC係來源於當前進行ITK抑制劑方案(諸如伊布替尼(ibrutinib))之患者。

【1515】在一些實施例中，PBMC樣品係來自已用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療且難以用激酶抑制劑或ITK抑制劑(諸如伊布替尼)治療之個體或患

者。

【1516】在一些實施例中，PBMC樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療之個體或患者。在一些實施例中，PBMC樣品係來自已經用包含激酶抑制劑或ITK抑制劑之方案進行預治療但不再進行激酶抑制劑或ITK抑制劑治療並且尚未進行治療達至少1個月、至少2個月、至少3個月、至少4個月、至少5個月、至少6個月或至少1年或更長之個體或患者。在其他實施例中，PBMC來源於先前暴露於ITK抑制劑但在至少3個月、至少6個月、至少9個月或至少1年內尚未經治療之患者。

【1517】在本發明之一些實施例中，在第0天，針對CD19+選擇細胞且據此分選。在本發明之一些實施例中，使用抗體結合珠粒進行選擇。在本發明之一些實施例中，在第0天自PBMC分離純T細胞。

【1518】在本發明之一些實施例中，對於未經伊布替尼或其他ITK抑制劑預先治療之患者，10至15 mL白血球層將產生約5×10^9個PBMC，其又將產生約5.5×10^7個PBL。

【1519】在本發明之一些實施例中，對於經伊布替尼或其他ITK抑制劑預治療之患者，擴增過程將產生約20×10^9個PBL。在本發明之一些實施例中，40.3×10^6個PBMC將產生約4.7×10^5個PBL。

【1520】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣品，藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自此項

技術中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

【1521】在一些實施例中，PBL係使用美國專利申請公開案第US 2020/0347350 A1號中所描述之方法製備，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

4. 擴增來自骨髓衍生之PBMC的骨髓浸潤性淋巴球(MIL)之方法

【1522】MIL方法3。在本發明之一些實施例中，該方法包含獲得來自骨髓之PBMC。在第0天，針對CD3+/CD33+/CD20+/CD14+選擇PBMC且分選，且將非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+細胞級份進行音波處理且將一部分經音波處理之細胞級份添加回至所選細胞級份中。

【1523】在本發明之一些實施例中，MIL方法3如下進行：在第0天，將冷凍保存之PBMC樣品解凍且計算PBMC之數目。將細胞用CD3、CD33、CD20及CD14抗體染色且使用S3e細胞分選器(Bio-Rad)分選。將細胞分選成兩種級份：免疫細胞級份(MIL部分)(CD3+CD33+CD20+CD14+)及AML胚細胞級份(非CD3+CD33+CD20+CD14+)。

【1524】在本發明之一些實施例中，PBMC係獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC係經由血球分離術、抽吸、針吸生檢或此項技術中已知之其他類似方式獲自骨髓。在一些實施例中，PBMC為新鮮的。在其他實施例中，PBMC經冷凍保存。

【1525】在本發明之一些實施例中，MIL係自10-50

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

【1526】在本發明之一些實施例中，自約10至50 mL骨髓抽吸物產生之PBMC的數目為約5×10^7至約10×10^7個PBMC。在其他實施例中，產生之PMBC之數目為約7×10^7個PBMC。

【1527】在本發明之一些實施例中，約5×10^7至約10×10^7個PBMC產生約0.5×10^6至約1.5×10^6個MIL。在本發明之一些實施例中，產生約1×10^6個MIL。

【1528】在本發明之一些實施例中，來源於骨髓抽吸物之12×10^6個PBMC產生大約1.4×10^5個MIL。

【1529】在任何前述實施例中，PBMC可來源於全血樣品、骨髓、藉由血球分離術獲得，來源於白血球層，或自此項技術中已知之用於獲得PBMC之任何其他方法獲得。

【1530】在一些實施例中，使用美國專利申請公開案第US 2020/0347350 A1號中所描述之方法製備MIL，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

B. 步驟B：啟始第一擴增

【1531】在一些實施例中，本發明方法提供較年輕

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

【1532】在例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C)之步驟A中所描述的腫瘤片段及/或腫瘤片段之分割或消化之後，將所得細胞在有利於TIL但不利於腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、OKT-3及飼養細胞(例如抗原呈現飼養細胞)的血清中。在一些實施例中，IL-2、OKT-3及飼養細胞在培養起始時(例如在第0天)與腫瘤消化物及/或腫瘤片段一起添加。在一些實施例中，腫瘤消化物及/或腫瘤片段以每容器至多60個片段且與6000 IU/mL IL-2培育於容器中。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養1至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數

天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，啟始第一擴增發生1至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，啟始第一擴增發生1至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生5至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生5至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生約6至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生約6至7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生約7至8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生約7天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，此啟始第一擴增發生約8天之時段，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。

【1533】在一些實施例中，TIL之擴增可使用如下文及本文中所描述之啟始第一擴增步驟(例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之步驟，其可包括稱為預REP或啟始REP之過程且其自第0天及/或自培養起始含有飼養細胞)進行，接著進行如下文在步驟D中及本文中所描述之快速第二擴增(步驟D，包括稱

為快速擴增方案(REP)步驟之過程)，隨後進行視情況選用之冷凍保存，且接著進行如下文及本文中所描述之第二步驟D(包括稱為再刺激REP步驟之過程)。獲自此過程之TIL可視情況針對如本文中所描述之表現型特徵及代謝參數進行表徵。在一些實施例中，腫瘤片段在約1 mm^3與10 mm^3之間。

【1534】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，步驟B之CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含GlutaMAX之RPMI 1640組成。

【1535】在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤片段。在一些實施例中，有少於或等於240個腫瘤片段被放入少於或等於4個容器中。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，少於或等於60個腫瘤片段被放入1個容器中。在一些實施例中，各容器包含每容器少於或等於500 mL培養基。在一些實施例中，培養基包含IL-2。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，培養基包含抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在一些實施例中，培養基包含每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含OKT-3。在一些實施例中，培養基包含每容器30 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2、30 ng OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養

細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【1536】在製備腫瘤片段之後，將所得細胞(亦即，為初代細胞群體之片段)在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下培養於含有IL-2、抗原呈現飼養細胞及OKT-3之培養基中，且其允許自第0天培養起始開始TIL起動及加速生長。在一些實施例中，腫瘤消化物及/或腫瘤片段與6000 IU/mL IL-2以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3一起培育。將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至8天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在啟始第一擴增期間的生長培養基包含IL-2或其變異體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，將此初代細胞群體培養數天之時段，通常1至7天，產生通常約1×10^8個主體TIL細胞之主體TIL群體。在一些實施例中，在啟始第一擴增期間的生長培養基包含IL-2或其變異體以及抗原呈現飼養細胞及OKT-3。在一些實施例中，IL-2為重組人類IL-2 (rhIL-2)。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20至30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有20×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有25×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，1 mg小瓶之IL-2儲備液具有30×10^6 IU/mg之比活性。在一些實施例中，IL-2儲備液具有4至8×10^6 IU/mg IL-2之最終濃度。在一些實施例中，IL-2儲備液具有5至7×10^6 IU/mg IL-2之最終濃

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

IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。

【1537】在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【1538】在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實

施例中，啟始第一擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【1539】在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含OKT-3抗體。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL至1 ng/mL、1 ng/mL至5 ng/mL、5 ng/mL至10 ng/mL、10 ng/mL至20 ng/mL、20 ng/mL至30 ng/mL、30 ng/mL至40 ng/mL、40 ng/mL至50 ng/mL、及50 ng/mL至100 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含15 ng/mL至30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包

含30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。參見例如表1。

【1540】在一些實施例中，啟始第一擴增細胞培養基在細胞培養基中包含一或多種TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB促效劑，且該4-1BB促效劑選自由以下組成之群：烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及其片段、衍生物、變異體、生物類似物及組合。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成0.1 μg/mL至100 μg/mL之濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑之添加濃度足以在細胞培養基中達成20 μg/mL至40 μg/mL之濃度。

【1541】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，啟始第一擴增細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，啟始第一擴增細胞培養基進一步包含初始濃度約6000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【1542】在一些實施例中，啟始第一擴增培養基稱為「CM」(培養基之縮寫)。在一些實施例中，其稱為CM1(培養基1)。在一些實施例中，CM由補充有10%人類AB血清、25 mM Hepes及10 mg/mL建它黴素的含

GlutaMAX之RPMI 1640組成。在一些實施例中，CM為實例中所描述之CM1。在一些實施例中，啟始第一擴增係在初始細胞培養基或第一細胞培養基中進行。在一些實施例中，啟始第一擴增培養基或初始細胞培養基或第一細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(在本文中亦稱為飼養細胞)。

【1543】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1544】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括(但不限於)CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1545】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物

包括(但不限於)以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【1546】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清替代物與習知生長培養基一起使用，該習知生長培養基包括(但不限於)CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CST™ AIM-V SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基

(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1547】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【1548】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基與26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑之組合，其在使用之前混合在一起。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)，且2-巰基乙醇於培養基中之最終

濃度為55 μM。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 μM 2-巰基乙醇。

【1549】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基與26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑之組合，其在使用之前混合在一起。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含

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

【1550】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養

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

【1551】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM，或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，培養基中之2-巰基乙醇之最終濃度為55 μM。

【1552】在一些實施例中，以引用之方式併入本文中的國際PCT公開案第WO/1998/030679號中所描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群的成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群的成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素

取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白或白蛋白取代物及一或多種選自由以下組成之群的成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，基礎細胞培養基選自由以下組成之群：達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1553】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺

酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1554】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表12中之標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列舉之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表12中之標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列舉之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含表12中之標題「補充劑之較佳實施例」欄中列舉之類型及濃度的非微量部分成分。

【1555】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可

進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1556】在一些實施例中，Smith等人，《臨床轉譯免疫學(*Clin. Transl. Immunology*)》，4(1), 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31)中描述之確定培養基可用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1557】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1558】在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為1至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為2至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為3

至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為4至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為5至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為6至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖1(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為7至8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為8天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為1至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如

圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為2至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為3至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為4至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8B及/或圖8C)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為5至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為6至7天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，啟始第一擴增過程(包括諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等過程，其可包括有時稱為預REP或啟始REP之彼等過程)為7天，如實例及圖式中所論述。

【1559】在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至8

天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行1天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行2天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行3天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行4天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行5天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行6天至7天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7至8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後進行8天。在一些實施例中，初始第一TIL擴增可在片段化發生

後及/或第一初始擴增步驟起始後進行7天。

【1560】在一些實施例中，TIL之啟始第一擴增可進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行1天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行2天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行3天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行4天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行5天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行6天至7天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天至8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行8天。在一些實施例中，第一TIL擴增可進行7天。

【1561】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在啟始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，在啟始第一擴增期間，包括例如在根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)以及本文所描述之步驟B過程期間可包括IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在啟始第一擴增期間之組合。在一些實施例中，在根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及

/或圖8D)以及如本文中所描述之步驟B過程期間可包括IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合。

【1562】在一些實施例中，啟始第一擴增(例如根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-10。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【1563】在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第4至8天

期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第4至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第5至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第5至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第6至8天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述

之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第6至7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第7或8天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第7天期間的任何時間添加。在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時不需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)，而係在啟始第一擴增期間第8天期間的任何時間添加。

【1564】在一些實施例中，本文中所描述之啟始第一

擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8B)之步驟B中所描述之彼等擴增以及稱為預REP或啟始REP之彼等擴增)在TIL擴增起始時及啟始第一擴增期間需要飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，啟始第一擴增期間使用2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，啟始第一擴增期間使用每容器2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，啟始第一擴增期間使用每GREX-10 2.5×10^8個飼養細胞。在一些實施例中，啟始第一擴增期間使用每GREX-100 2.5×10^8個飼養細胞。

【1565】一般而言，同種異體PBMC係經由照射或熱處理而不活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射之同種異體PBMC之無複製能力之例示性方案。

【1566】在一些實施例中，若第14天活細胞總數小於在啟始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。

【1567】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在啟始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一

些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1568】在一些實施例中，若第7天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在啟始第一擴增第0天放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在5至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在10至50 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在20至40 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在25至35 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在15 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1569】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、

約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【1570】在一些實施例中，本文所描述之啟始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之啟始第一擴增程序需要約2.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之啟始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在其他實施例中，本文所描述之啟始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞。在其他實施例中，啟始第一擴增所需的飼養細胞數目為用於快速第二擴增之飼養細胞數目之四分之一、三分之一、十二分之五或二分之一。

【1571】在一些實施例中，啟始第一擴增中之培養基包含IL-2。在一些實施例中，啟始第一擴增中之培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，啟始第一擴增中之培養基包含抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，啟始第一擴增中之培養基包含每容器2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，啟始第一擴增中之培養基包含OKT-3。在一些實施例中，培養基包含每容器30 ng OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，

培養基包含每容器6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器每2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，培養基包含每容器500 mL培養基及15 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為GREX100 MCS培養瓶。在一些實施例中，培養基包含500 mL培養基、6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器500 mL培養基、6000 IU/mL IL-2、15 μg OKT-3及2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器每2.5×10^8個抗原呈現飼養細胞500 mL培養基及15 μg OKT-3。

【1572】在一些實施例中，本文所描述之啟始第一擴增程序在第二擴增期間需要多於TIL的過量飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。

【1573】一般而言，同種異體PBMC係經由照射或熱處理而不活化，且用於本文中所描述之TIL擴增程序，包括圖式及實例中所描述之例示性程序。

【1574】在一些實施例中，在啟始第一擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

2. 細胞介素及其他添加劑

【1575】本文所描述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(尤其IL-2)之培養基，如此項技術中所已知。

【1576】或者，使用細胞介素與以下之組合進行TIL之啟始第一擴增亦為可能的：如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述的IL-2、IL-15及IL-21中之兩種或更多種的組合，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且尤其如其中所描述之T細胞。參見例如表2。

【1577】在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基中添加OKT-3抗體或莫羅單抗，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基中添加4-1BB促效劑，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟B亦可包括向培養基中添加OX-40促效劑，如本文中其他地方所描述。此外，可在步驟B期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧化體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

C. 步驟C：啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變

【1578】在一些情況下，獲自啟始第一擴增(其可包括有時稱為預REP之擴增)之主體TIL群體，包括例如獲自例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B的TIL群體，可經歷快速第二擴增(其可包括有時稱為快速擴增方案(REP)之擴增)且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在經基因修飾之TIL將用於療法的情況下，來自啟始第一擴增之經擴增TIL群體或來自快速第二擴增之經擴增TIL群體可在擴增步驟之前或在啟始第一擴增之後且在快速第二擴增之前進行基因修飾以用於合適治療。

【1579】在一些實施例中，獲自啟始第一擴增(例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B)之TIL經儲存直至為了選擇而測定表現型。在一些實施例中，獲自啟始第一擴增(例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B)之TIL未經儲存且直接進行快速第二擴增。在一些實施例中，獲自啟始第一擴增之TIL在啟始第一擴增之後且在快速第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在腫瘤片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約3天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟

起始後約3天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約4天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約5天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約6天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後約8天發生。

【1580】在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至7天發生。

在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後1天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後2天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後3天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後4天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至7天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後5天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至7天發生在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後6天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初

始擴增步驟起始後7天至8天發生。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後7天發生在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變在片段化發生後及/或第一初始擴增步驟起始後8天發生。

【1581】在一些實施例中，TIL在啟始第一擴增之後且在快速第二擴增之前未經儲存，且TIL直接進行快速第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所展示的步驟B至步驟D之轉變期間未經儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文中所描述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自啟始第一擴增之TIL(第二TIL群體)直接進行快速第二擴增而無轉變期。

【1582】在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變(例如根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟C)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用單一生物反應器。在一些實施例中，所採用的單一生物反應器為例如GREX-10或GREX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器為單一生物反應器。在一些實施例中，啟始第一擴增至快速第二擴增之轉變涉及容器大小之規模縱向擴大。在一些實施例中，啟始第一擴增與快速第二擴增相比係在較小容器中進行。在一些實施例中，啟始第一擴增在GREX-100中

進行且快速第二擴增在GREX-500中進行。

D. 步驟D：快速第二擴增

【1583】在一些實施例中，TIL細胞群體在如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之收集及啟始第一擴增(步驟A及步驟B)及稱為步驟C之轉變之後進一步擴增數目。此進一步擴增在本文中稱為快速第二擴增或快速擴增，其可包括在此項技術中通常稱為快速擴增過程(快速擴增方案或REP)之擴增過程；以及如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所指示之過程。快速第二擴增通常使用包含多種組分(包括飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)之培養基在透氣容器中完成。在一些實施例中，在快速第二擴增起始後1天、2天、3天或4天(亦即，在整體Gen 3過程之第8、9、10或11天)，將TIL轉移至較大體積容器。

【1584】在一些實施例中，TIL之快速第二擴增(其可包括有時稱為REP之擴增；以及如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所指示之過程)可使用此項技術中熟習此項技術者已知之任何TIL培養瓶或容器進行。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天至約10天。

在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約3天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天至約10天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約1天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約2天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進

行約3天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約4天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約5天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約6天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約7天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約8天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約9天。在一些實施例中，第二TIL擴增可在快速第二擴增起始後進行約10天。

【1585】在一些實施例中，快速第二擴增可在透氣容器中使用本發明之方法(包括例如稱為REP之擴增；以及如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所指示之過程)進行。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞(在本文中亦稱為「抗原呈現細胞」)存在下擴增。在一些實施例中，TIL在快速第二擴增中在IL-2、OKT-3及飼養細胞存在下擴增，其中將飼養細胞添加至最終濃度，該最終濃度為存在於啟始第一擴增中之飼養細胞濃度的兩倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍或4倍。舉例而言，TIL可在介白素-2(IL-2)或介白素-15(IL-15)存在下使用非特異性T細胞受體刺激而快速擴增。非特異性T細胞受體刺激物可包括例如抗CD3抗體，諸如約30 ng/mL OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自新澤西州拉裡坦市的Ortho-McNeil或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)或UHCT-1(可購自美國加利福尼亞州聖

地亞哥市的BioLegend)。TIL可藉由在第二擴增期間包括一或多種癌症之抗原(包括其抗原部分，諸如抗原決定基)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可視情況在T細胞生長因子(諸如300 IU/mL IL-2或IL-15)存在下視情況自載體表現，該載體諸如人類白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μM MART-1 :26-35(27 L)或gpl 00:209-217(210M)。其他適合的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或其抗原部分。TIL亦可藉由用脈衝至表現HLA-A2之抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激而快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如實例經照射之自體淋巴球或用經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激作為第二擴增之部分發生。在一些實施例中，第二擴增在經照射之自體淋巴球或經照射之HLA-A2+同種異體淋巴球及IL-2存在下發生。

【1586】在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL或約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，細胞培養基包含1000至2000 IU/mL、2000至3000 IU/mL、3000至4000 IU/mL、4000至

5000 IU/mL、5000至6000 IU/mL、6000至7000 IU/mL、7000至8000 IU/mL、或8000 IU/mL IL-2。

【1587】在一些實施例中，細胞培養基包含OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL及約1 μg/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含0.1 ng/mL至1 ng/mL、1 ng/mL至5 ng/mL、5 ng/mL至10 ng/mL、10 ng/mL至20 ng/mL、20 ng/mL至30 ng/mL、30 ng/mL至40 ng/mL、40 ng/mL至50 ng/mL、及50 ng/mL至100 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含15 ng/mL至30 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含30 ng/mL至60 ng/mL OKT-3抗體。在一些實施例中，細胞培養基包含約30 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，細胞培養基包含約60 ng/mL OKT-3。在一些實施例中，OKT-3抗體為莫羅單抗。

【1588】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含IL-2。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養

基包含每容器7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-REX-100 MCS瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【1589】在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含IL-2。在一些實施例中，培養基包含6000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，培養基包含每容器5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含OKT-3。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含每容器500 mL培養基及30 μg OKT-3。在一些實施例中，容器為G-REX-100 MCS瓶。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含6000 IU/mL IL-2、60 ng/mL OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，快速第二擴增中之培養基包含每容器500 mL培養基及6000 IU/mL IL-2、30 μg OKT-3及5×10^8至7.5×10^8個抗原呈現飼養細胞。

【1590】在一些實施例中，細胞培養基包含一或多種TNFRSF促效劑於細胞培養基中。在一些實施例中，

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

【1591】在一些實施例中，除了一或多種TNFRSF促效劑之外，細胞培養基進一步包含初始濃度約3000 IU/mL之IL-2及初始濃度約30 ng/mL之OKT-3抗體，且其中該一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【1592】在一些實施例中，採用IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，在第二擴增期間，包括例如在根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)以及本文所描述之步驟D過程期間可包括IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及其任何組合。在一些實施例中，採用IL-2、IL-15及IL-21之組合作為在第二擴增期間之組合。在一些實施例中，在根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)以及如本文中所描述之步驟D過程期間可包括IL-2、IL-15及IL-21以及其任何組合。

【1593】在一些實施例中，第二擴增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈現飼養細胞且視情況包含TNFRSF促效劑

之補充細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在補充細胞培養基中發生。在一些實施例中，補充細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC；亦稱為抗原呈現飼養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞(亦即抗原呈現細胞)之細胞培養基中發生。

【1594】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15、約400 IU/mL IL-15、約300 IU/mL IL-15、約200 IU/mL IL-15、約180 IU/mL IL-15、約160 IU/mL IL-15、約140 IU/mL IL-15、約120 IU/mL IL-15或約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約500 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約400 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約300 IU/mL IL-15至約100 IU/mL IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約200 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL IL-15。

【1595】在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21、約15 IU/mL IL-21、約12 IU/mL IL-21、約10 IU/mL IL-21、約5 IU/mL IL-21、約4 IU/mL IL-21、約3 IU/mL IL-21、約2 IU/mL IL-21、約1 IU/mL IL-21或約0.5

IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約20 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約15 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約12 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約10 IU/mL IL-21至約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約5 IU/mL IL-21至約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約2 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL IL-21。在一些實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL IL-21。

【1596】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞(APC)為PBMC。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC及/或抗原呈現細胞之比率為約1比10、約1比15、約1比20、約1比25、約1比30、約1比35、約1比40、約1比45、約1比50、約1比75、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比50與1比300之間。在一些實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中TIL與PBMC之比率介於1比100與1比200之間。

【1597】在一些實施例中，REP及/或快速第二擴增係在瓶中進行，其中在150 ml培養基中混合主體TIL與100倍或200倍過量的不活化飼養細胞、30 ng/mL OKT3抗CD3抗體及6000 IU/mL IL-2，其中飼養細胞濃度係啟始第一擴增中之飼養細胞濃度的至少1.1倍(1.1X)、1.2X、1.3X、1.4X、1.5X、1.6X、1.7X、1.8X、1.8X、2X、2.1X、2.2X、2.3X、2.4X、2.5X、2.6X、2.7X、2.8X、2.9X、3.0X、3.1X、3.2X、3.3X、3.4X、3.5X、3.6X、3.7X、3.8X、3.9X或4.0X。替換培養基(通常經由抽取2/3用過的培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基)直至細胞轉移至替代生長箱室。替代生長箱室包括G-REX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【1598】在一些實施例中，快速第二擴增(其可包括稱為REP過程之過程)為7至9天，如實例及圖式中所論述。在一些實施例中，第二擴增為7天。在一些實施例中，第二擴增為8天。在一些實施例中，第二擴增為9天。

【1599】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP之擴增，以及在圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中提及之擴增)可在500 mL容量的具有100 cm透氣矽底之透氣瓶(G-REX-100，可購自美國明尼蘇達州新布賴頓市的威爾遜狼製造公司(Wilson Wolf Manufacturing Corporation))中進行，5×10^6或10×10^6個TIL可與PBMC一起在400 mL的補充有5%人類AB血清、3000 IU/mL IL-2及30 ng/ml 抗CD3(OKT3)之50/50培養基中培

養。G-REX-100瓶可在37℃下在5% CO_2中培育。在第5天，可將250 mL上清液移除且放入離心瓶中且以1500 rpm(491×g)離心10分鐘。可將TIL沈澱物用150 mL的含有5%人類AB血清、6000 IU/mL IL-2之新鮮培養基再懸浮，且添加回原始GREX-100培養瓶中。當TIL在GREX-100培養瓶中連續擴增時，在第10或11天可將TIL移至較大培養瓶，諸如GREX-500。可在培養第14天收集細胞。細胞可在培養的第15天收集。細胞可在培養的第16天收集。在一些實施例中，替換培養基直至細胞轉移至替代生長箱室。在一些實施例中，藉由抽取用過的培養基且用相等體積的新鮮培養基替換來替換2/3培養基。在一些實施例中，替代生長箱室包括GREX培養瓶及透氣容器，如下文更充分論述。

【1600】在一些實施例中，本文揭示之擴增過程中使用的培養基為無血清培養基或確定培養基。在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，無血清或確定培養基用於防止及/或減少部分因含血清培養基之批次間變化所致之實驗變化。

【1601】在一些實施例中，無血清或確定培養基包含基礎細胞培養基及血清補充劑及/或血清替代物。在一些實施例中，基礎細胞培養基包括(但不限於) CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基、CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM、CTS™ AIM-V培養基、CTS™ AIM-V

SFM、LymphoONE™ T細胞擴增無Xeno培養基、達爾伯克氏改良伊格爾氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、伊格爾氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(αMEM)、格拉斯哥氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及伊斯科夫氏改良達爾伯克氏培養基。

【1602】在一些實施例中，血清補充劑或血清替代物包括(但不限於)以下中之一者或多者：CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™免疫細胞血清替代物、一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種抗生素及一或多種微量元素。在一些實施例中，確定培養基包含白蛋白及一或多種選自由以下組成之群的成分：甘胺酸、L-組胺酸、L-異白胺酸、L-甲硫胺酸、L-苯丙胺酸、L-脯胺酸、L-羥基脯胺酸、L-絲胺酸、L-蘇胺酸、L-色胺酸、L-酪胺酸、L-纈胺酸、硫胺素、還原麩胱甘肽、L-抗壞血酸-2-磷酸鹽、鐵飽和運鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部分Ag^{+}、Al^{3+}、Ba^{2+}、Cd^{2+}、Co^{2+}、Cr^{3+}、Ge^{4+}、Se^{4+}、Br、T、Mn^{2+}、P、Si^{4+}、V^{5+}、Mo^{6+}、Ni^{2+}、Rb^{+}、Sn^{2+}及Zr^{4+}之化合物。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或2-巰基乙醇。

【1603】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞

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

【1604】在一些實施例中，以無血清或確定培養基之總體積計，無血清或確定培養基中之總血清替代物濃度(vol%)為約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一些實施例中，總血清替代物濃度為無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【1605】在一些實施例中，無血清或確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基與26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑之組合，其在使用之前混合在一起。在一些實施例

中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。

【1606】在一些實施例中，確定培養基為CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM(賽默飛世爾科技)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM為1 L CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基與26 mL CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑之組合，其在使用之前混合在一起。在一些實施例中，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)以及55 mM的2-巰基乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM的2-巰基乙醇及2 mM的L-麩醯胺酸。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3% CTS™免疫細胞血清替代物(SR)(賽默飛世爾科技)、55 mM 2-巰基乙醇及2 mM L-麩醯胺酸，且進一步包

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

【1607】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約0.1 mM至約10 mM、0.5 mM至約9 mM、1 mM至約8 mM、2 mM至約7 mM、3 mM至約6 mM或4 mM至約5 mM之麩醯胺酸(亦即，GlutaMAX®)。在一些實施例

中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約2 mM之麩醯胺酸(亦即，GlutaMAX®)。

【1608】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約5 mM至約150 mM、10 mM至約140 mM、15 mM至約130 mM、20 mM至約120 mM、25 mM至約110 mM、30 mM至約100 mM、35 mM至約95 mM、40 mM至約90 mM、45 mM至約85 mM、50 mM至約80 mM、55 mM至約75 mM、60 mM至約70 mM，或約65 mM之2-巰基乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度為約55 mM之2-巰基乙醇。

【1609】在一些實施例中，國際專利申請公開案第WO 1998/030679號及美國專利申請公開案第US 2002/0076747 A1號中所描述之確定培養基(其以引用之方式併入本文中)適用於本發明中。在該公開案中，描述無血清真核細胞培養基。無血清真核細胞培養基包括補充有能夠支持細胞在無血清培養中生長之無血清補充劑的基礎細胞培養基。無血清真核細胞培養基補充劑包含一或多種選自由以下組成之群的成分，或藉由組合一或多種選自由以下組成之群的成分而獲得：一或多種白蛋白或白蛋白取代物、一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種運鐵蛋白或運鐵蛋白取代物、一或多種抗氧化劑、一或多種胰島素或胰島素取代物、一或多種膠原蛋白前驅物、一或多種微量元素及一或多種抗生素。在一些實施例中，確定培養基進一步包含L-麩醯胺酸、碳酸氫鈉及/或β-巰基乙醇。

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

【1610】在一些實施例中，確定培養基中甘胺酸之濃度在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸之濃度為約5至250 mg/L，L-異白胺酸之濃度為約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸之濃度為約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸之濃度為約5至400 mg/L，L-脯胺酸之濃度為約1至1000 mg/L，L-羥基脯

胺酸之濃度為約1至45 mg/L，L-絲胺酸之濃度為約1至250 mg/L，L-蘇胺酸之濃度為約10至500 mg/L，L-色胺酸之濃度為約2至110 mg/L，L-酪胺酸之濃度為約3至175 mg/L，L-纈胺酸之濃度為約5至500 mg/L，硫胺素之濃度為約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽之濃度為約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽之濃度為約1至200 mg/L，鐵飽和運鐵蛋白之濃度為約1至50 mg/L，胰島素之濃度為約1至100 mg/L，亞硒酸鈉之濃度為約0.000001至0.0001 mg/L，且白蛋白(例如AlbuMAX® I)之濃度為約5000至50,000 mg/L。

【1611】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表12中之標題「1X培養基中之濃度範圍」欄中列舉之濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部分成分係以表12中之標題「1X培養基之較佳實施例」欄中列舉之最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基為包含無血清補充劑之基礎細胞培養基。在一些此等實施例中，無血清補充劑包含表12中之標題「補充劑之較佳實施例」欄中列舉之類型及濃度的非微量部分成分。

【1612】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓介於約280與310 mOsmol之間。在一些實施例中，確定培養基補充有至多約3.7 g/L或約2.2 g/L碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度為約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度為約100 μM)、

2-巰基乙醇(最終濃度為約100 μM)。

【1613】在一些實施例中，於Smith等人，《臨床與轉化免疫學》4(1)2015(doi: 10.1038/cti.2014.31)中所描述之確定培養基適用於本發明。簡言之，RPMI或CTS™ OpTmizer™用作基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清替代物。

【1614】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰基乙醇，CAS 60-24-2)。

【1615】在一些實施例中，進行快速第二擴增(包括稱為REP之擴增)，且其進一步包含其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL之步驟。可使用此項技術中已知之任何選擇方法。舉例而言，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述之方法可用於選擇具有優異腫瘤反應性之TIL。

【1616】視情況，可在快速第二擴增(包括稱為REP擴增之擴增)之後使用此項技術中已知之標準分析來進行細胞存活率分析。舉例而言，可在主體TIL樣品上進行台盼藍排除分析，其選擇性標記死細胞且允許存活率評估。在一些實施例中，TIL樣品可使用Cellometer K2自動化細胞計數器(馬薩諸塞州勞倫斯市的Nexcelom Bioscience)計算及判定存活率。在一些實施例中，存活率係根據標準

Cellometer K2 Image Cytometer自動化細胞計數器方案判定。

【1617】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第二擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRab(即，TCRα/β)之表現增加。

【1618】在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二

細胞培養基)包含6000 IU/mL IL-2、30 μg/培養瓶OKT-3以及如下文更詳細論述之7.5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含IL-2、OKT-3以及如下文更詳細論述之抗原呈現飼養細胞(APC)。在一些實施例中，快速第二擴增培養基(例如有時稱為CM2或第二細胞培養基)包含6000 IU/mL IL-2、30 μg/培養瓶OKT-3以及如下文更詳細論述之5 × 10^8個抗原呈現飼養細胞(APC)。

【1619】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例如G-REX-100或G-REX-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-500。

【1620】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將小規模培養中的TIL轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500-MCS容器)且在第二容器中的較大規模培養中培養來自小規模培養的TIL約4天至7天之時

段。

【1621】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的第一小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小與第一容器相等的第二容器中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器的來自第一小規模培養的TIL部分在第二小規模培養中培養約4天至7天之時段。

【1622】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個TIL亞群中。

【1623】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX-100 MCS容器)中的小規模培養中培養TIL約3天至7天之時段來進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養中的TIL轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器的來自小規模培養的TIL部分在較大規模培養中培養約4天至7天之時段。

【1624】在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為

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

【1625】在一些實施例中，在快速第二擴增之分裂後，各第二容器包含至少10^8個TIL。在一些實施例中，在快速或第二擴增之分裂後，各第二容器包含至少10^8個TIL、至少10^9個TIL或至少10^{10}個TIL。在一個例示性實施例中，各第二容器包含至少10^{10}個TIL。

【1626】在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2至5個亞群中。在一些實施例中，將第一小規模TIL培養物分配至複數個約2、3、4或5個亞群中。

【1627】在一些實施例中，在完成快速第二擴增後，複數個亞群包含治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速或第二擴增後，將一或多個TIL亞群合併在一起以產生治療有效量之TIL。在一些實施例中，在完成快速擴增後，各TIL亞群包含治療有效量之TIL。

【1628】在一些實施例中，在分成複數個步驟之前將

快速第二擴增進行約3至7天之時段。在一些實施例中，快速第二擴增之分裂發生在快速或第二擴增開始後約第3天、第4天、第5天、第6天或第7天。

【1629】在一些實施例中，快速第二擴增之分裂發生在第一擴增(亦即預REP擴增)開始後約第7天、第8天、第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天或第16天、第17天或第18天。在一個例示性實施例中，快速或第二擴增之分裂發生在第一擴增開始後約第16天。

【1630】在一些實施例中，在分裂之後，快速第二擴增進一步進行約7至11天之時段。在一些實施例中，在分裂之後，快速第二擴增進一步進行約5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段。

【1631】在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基包含與分裂後用於快速第二擴增之細胞培養基相同的組分。在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基包含與分裂後用於快速第二擴增之細胞培養基不同的組分。

【1632】在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC。在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及進一步視情況選用之APC。在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2、OKT-3及APC。

【1633】在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴

增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮培養基來補充第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、視情況選用之OKT-3及進一步視情況選用之APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生。在一些實施例中，在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2、OKT-3及APC之新鮮細胞培養基來替換第一擴增中的細胞培養基而產生。

【1634】在一些實施例中，分裂後用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2及視情況選用之OKT-3。在一些實施例中，分裂後用於快速第二擴增之細胞培養基包含IL-2及OKT-3。在一些實施例中，分裂後用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及視情況選用之OKT-3之新鮮培養基來替換在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基而產生。在一些實施例中，分裂後用於快速第二擴增之細胞培養基係藉由用包含IL-2及OKT-3之新鮮培養基來替換在分裂前用於快速第二擴增之細胞培養基而產生。

1. 飼養細胞及抗原呈現細胞

【1635】在一些實施例中，本文中所描述之快速第二

擴增程序(例如包括如下擴增，諸如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中所描述之彼等擴增以及稱為REP之彼等擴增)在REP TIL擴增期間及/或在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自健康血液供體之標準全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。

【1636】一般而言，同種異體PBMC係經由照射或熱處理而不活化，且如實例中所描述用於REP程序，其提供用於評估經照射之同種異體PBMC之無複製能力之例示性方案。

【1637】在一些實施例中，若第7或14天活細胞總數小於在REP之第0天及/或第二擴增之第0天(亦即，第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文中所描述之TIL擴增程序。

【1638】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP之第0天及/或第二擴增之第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文中所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在60 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC

在60 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1639】在一些實施例中，若第7天及第14天在OKT3及IL-2存在下培養的活細胞總數與在REP之第0天及/或第二擴增之第0天(亦即第二擴增之起始日)放入培養的初始活細胞數目相比並未增加，則認為PBMC係無複製能力的且可接受其用於本文中所描述之TIL擴增程序。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及1000至6000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及2000至5000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及2000至4000 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及2500至3500 IU/mL IL-2存在下培養。在一些實施例中，PBMC在30至60 ng/mL OKT3抗體及6000 IU/mL IL-2存在下培養。

【1640】在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為PBMC。在一些實施例中，抗原呈現飼養細胞為人工抗原呈現飼養細胞。在一些實施例中，第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率為約1比10、約1比25、約1比50、約1比100、約1比125、約1比150、約1比175、約1比200、約1比225、約1比250、約1比275、約1比300、約1比325、約1比350、約1比375、約1比400或約1比500。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比

50與1比300之間。在一些實施例中，在第二擴增中TIL與抗原呈現飼養細胞之比率介於1比100與1比200之間。

【1641】在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在一些實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約100×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約50×10^6個TIL之比率。在其他實施例中，本文中所描述之第二擴增程序需要約5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在其他實施例中，本文中所描述之第二擴增程序需要約7.5×10^8個飼養細胞與約25×10^6個TIL。在其他實施例中，快速第二擴增需要快速第二擴增的兩倍數目的飼養細胞。在其他實施例中，當本文中所描述之啟始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約5×10^8個飼養細胞。在其他實施例中，當本文中所描述之啟始第一擴增需要約2.5×10^8個飼養細胞時，快速第二擴增需要約7.5×10^8個飼養細胞。在其他實施例中，快速第二擴增需要啟始第一擴增的兩倍(2.0X)、2.5X、3.0X、3.5X或4.0X數目的飼養細胞。

【1642】在一些實施例中，本文所描述之快速第二擴增程序在快速第二擴增期間需要過量的飼養細胞。在許多實施例中，飼養細胞係獲自同種異體健康血液供體之標準

全血單位的周邊血液單核細胞(PBMC)。PBMC使用標準方法，諸如Ficoll-Paque梯度分離法獲得。在一些實施例中，使用人工抗原呈現細胞(aAPC)代替PBMC。在一些實施例中，PBMC以添加至啟始第一擴增之PBMC濃度的兩倍添加至快速第二擴增。

【1643】一般而言，同種異體PBMC係經由照射或熱處理而不活化，且用於本文中所描述之TIL擴增程序，包括圖式及實例中所描述之例示性程序。

【1644】在一些實施例中，在快速第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來替代PBMC或與PBMC組合使用。

2. 細胞介素及其他添加劑

【1645】本文中所描述之快速第二擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(尤其IL-2)之培養基，如此項技術中所已知。

【1646】或者，使用細胞介素之組合來快速第二擴增TIL亦係可能的，如美國專利申請公開案第US 2017/0107490 A1號中所描述，使用兩種或更多種IL-2、IL-15及IL-21之組合，其揭示內容以引用之方式併入本文中。因此，可能組合包括IL-2及IL-15、IL-2及IL-21、IL-15及IL-21以及IL-2、IL-15及IL-21，其中後者在許多實施例中具有特定用途。使用細胞介素之組合特別有利於產生淋巴球，且尤其如其中所描述之T細胞。

【1647】在一些實施例中，步驟D(尤其來自例如圖

8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)亦可包括將OKT-3抗體或莫羅單抗添加至培養基中，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟D亦可包括向培養基中添加4-1BB促效劑，如本文中其他地方所描述。在一些實施例中，步驟D(尤其來自例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)亦可包括將OX-40促效劑添加至培養基中，如本文中其他地方所描述。此外，可在步驟D(尤其來自例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)期間在培養基中使用添加劑，諸如過氧化體增殖物活化受體γ共活化劑I-α促效劑，包括增殖物活化受體(PPAR)-γ促效劑，諸如噻唑啶二酮化合物，如在美國專利申請公開案第US 2019/0307796 A1號中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。

E. 步驟E：收集TIL

【1648】在快速第二擴增步驟之後，可收集細胞。在一些實施例中，在例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之一、二、三、四個或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之兩個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之兩個擴增步驟(一個啟始第一擴增及一個快速第二擴增)之後收集TIL。

【1649】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包括

例如離心。收集TIL之方法為此項技術中熟知的且任何此類已知方法均可與本發明過程一起使用。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【1650】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自各種來源，包括例如費森尤斯卡比(Fresenius Kabi)、Tomtec Life Science、珀金埃爾默(Perkin Elmer)及Inotech Biosystems International, Inc.。本發明之方法可採用任何基於細胞之收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統為基於膜之細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集係經由細胞處理系統，諸如LOVO系統(由費森尤斯卡比製造)進行。術語「LOVO細胞處理系統」亦係指由任何供應商製造之任何可在無菌及/或密閉系統環境中將包含細胞之溶液泵送通過膜或過濾器(諸如旋轉膜或旋轉過濾器)的儀器或裝置，從而允許連續流動及細胞處理以移除上清液或細胞培養基而不發生團塊化。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中進行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【1651】在一些實施例中，快速第二擴增(例如根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D)係在密閉系統生物反應器中進行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文中所描述之TIL擴增。在一些實施例中，採用生物反應器。在一些實施例中，採用生物反應器作為容器。在一些實施例中，所採用的生物反應器為例

如G-REX-100或G-REX-500。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-100。在一些實施例中，所採用的生物反應器為G-REX-500。

【1652】在一些實施例中，根據圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟E係根據本文中所描述之過程進行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如本文中所描述之密閉系統。

【1653】在一些實施例中，根據本文所描述之方法收集TIL。在一些實施例中，使用如本文中所描述之方法收集第14與16天之間的TIL。在一些實施例中，使用如本文中所描述之方法在第14天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文中所描述之方法在第15天收集TIL。在一些實施例中，使用如本文中所描述之方法在第16天收集TIL。

F. 步驟F：最終調配物及轉移至輸注容器

【1654】在如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中以例示性次序提供且如上文及本文中所概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器中以用於向患者投與，諸如輸注袋或無菌小瓶。在一些實施例中，一旦使用上文所描述之擴增方法獲得治療足夠數目之TIL後，將其轉移至容器以用於向患者投與。

【1655】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組合物之形式向患者投與。在一些實施例

中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。如本文所揭示擴增之TIL可藉由如此項技術中已知之任何合適途徑投與。在一些實施例中，TIL係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

VIII. 其他Gen 2、Gen 3及其他TIL製造過程實施例

A. PBMC飼養細胞比率

【1656】在一些實施例中，用於本文中所描述之擴增方法(參見例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D))的培養基包括抗CD3抗體，例如OKT-3。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》1985, *135*, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【1657】在一些實施例中，PBMC飼養細胞層之數目如下計算：

A. T細胞體積(直徑10 μm)：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 523.6\ \mu m^3$

B. 具有40 μm(4個細胞)高度之G-REX-100(M)體積：$V = (4/3)\ \pi r^3 = 4\times10^{12}\ \mu m^3$

C. 填滿體積B所需之細胞數目：$4\times10^{12}\ \mu m^3/523.6\ \mu m^3 = 7.6\times10^8\ \mu m^3\times0.64 = 4.86\times10^8$

D. 可在4D空間中經最佳活化之細胞數目：$4.86\times10^8/24 = 20.25\times10^6$

E. 外推至G-REX-500之飼養細胞及TIL數目：TIL：100×10^6及飼養細胞：2.5×10^9

【1658】在此計算中，使用在具有100 cm^2基底的圓柱體中提供TIL活化之二十面體幾何學所需的單核細胞近似數目。計算導出的T細胞臨界值活化的實驗結果為約5×10^8，其與NCI實驗資料密切相關，如Jin等人，《免疫療法雜誌》2012, *35*, 283-292中所描述。在(C)中，乘數(0.64)係等效球體的隨機填充密度，由Jaeger及Nagel，《科學》, 1992, *255*, 1523-3計算得出。在(D)中，除數24係4維空間中可接觸類似物體的等效球體的數目或「牛頓數」，如Musin, 《俄羅斯數學評論(*Russ. Math. Surv.*)》2003, *58*, 794-795中所描述。

【1659】在一些實施例中，在啟始第一擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞數目大約為在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞數目的一半。在某些實施例中，方法包含在相較於快速第二擴增之細胞培養基包含大約50%較少抗原呈現細胞的細胞培養基中進行啟始第一擴增。

【1660】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的抗原呈現飼養細胞(APC)數目大於在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目。

【1661】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範

圍。

【1662】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1663】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1664】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1665】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1666】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1667】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範

圍。

【1668】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1669】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1670】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1671】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1672】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1673】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範

圍。

【1674】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1675】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1676】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1677】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1678】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1679】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範

圍。

【1680】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1681】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1682】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1683】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1684】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1685】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1686】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範

圍。

【1687】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1688】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1689】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1690】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1691】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1692】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範

圍。

【1693】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約2:1。

【1694】在其他實施例中，在快速第二擴增期間外源供應的APC數目與在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目之比率係剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【1695】在其他實施例中，在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、

6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC。

【1696】在其他實施例中，在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍。

【1697】在其他實施例中，在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC的範圍。

【1698】在其他實施例中，在啟始第一擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約2.5×10^8個APC，且在快速第二擴增期間外源供應的APC數目係剛好或大約5×10^8個APC。

【1699】在一些實施例中，在啟始第一擴增第0天添加的APC(包括例如PBMC)數目係在啟始第一擴增第7天(例

如方法之第7天)添加的PBMC數目的大約一半。在某些實施例中，方法包含在啟始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞的數目係在啟始第一擴增第7天(例如方法之第7天)添加之抗原呈現細胞數目的大約50%。

【1700】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目大於在啟始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目。

【1701】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1702】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1703】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1704】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1705】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、

1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1706】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1707】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1708】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1709】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1710】在其他實施例中，在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、

4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1711】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約1.0×10^6、1.1×10^6、1.2×10^6、1.3×10^6、1.4×10^6、1.5×10^6、1.6×10^6、1.7×10^6、1.8×10^6、1.9×10^6、2×10^6、2.1×10^6、2.2×10^6、2.3×10^6、2.4×10^6、2.5×10^6、2.6×10^6、2.7×10^6、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6或4.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2、2.6×10^6個APC/cm^2、2.7×10^6個APC/cm^2、2.8×10^6、2.9×10^6、3×10^6、3.1×10^6、3.2×10^6、3.3×10^6、3.4×10^6、3.5×10^6、3.6×10^6、3.7×10^6、3.8×10^6、3.9×10^6、4×10^6、4.1×10^6、4.2×10^6、4.3×10^6、4.4×10^6、4.5×10^6、4.6×10^6、4.7×10^6、4.8×10^6、4.9×10^6、5×10^6、5.1×10^6、5.2×10^6、5.3×10^6、5.4×10^6、5.5×10^6、5.6×10^6、5.7×10^6、5.8×10^6、5.9×10^6、6×10^6、6.1×10^6、6.2×10^6、6.3×10^6、6.4×10^6、6.5×10^6、6.6×10^6、6.7×10^6、6.8×10^6、

6.9×10^6、7×10^6、7.1×10^6、7.2×10^6、7.3×10^6、7.4×10^6或7.5×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1712】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1713】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1714】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約2×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以選自剛好或大約4×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍之密度接種於培養瓶中。

【1715】在其他實施例中，在啟始第一擴增外源供應的APC係以剛好或大約2×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中，且在快速第二擴增外源供應的APC係以剛好或大約4×10^6個APC/cm^2之密度接種於培養瓶中。

【1716】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【1717】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1718】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的PBMC數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1719】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1720】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1721】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1722】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1723】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1724】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1725】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1726】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1727】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1728】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1729】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1730】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1731】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1732】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1733】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1734】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【1735】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1736】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【1737】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【1738】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【1739】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【1740】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【1741】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【1742】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【1743】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【1744】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【1745】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【1746】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【1747】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【1748】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係剛好或大約2:1。

【1749】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目與在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目之比率係剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【1750】在其他實施例中，在啟始第一擴增之第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、

1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC(包括例如PBMC)，且在快速第二擴增之第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC(包括例如PBMC)。

【1751】在其他實施例中，在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約1×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約3.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約3.5×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約1×10^9個

APC(包括例如PBMC)的範圍。

【1752】在其他實施例中，在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約4×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約7.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍。

【1753】在其他實施例中，在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約2×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約2.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC(包括例如PBMC)至剛好或大約5.5×10^8個APC(包括例如PBMC)的範圍。

【1754】在其他實施例中，在啟始第一擴增之第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約2.5×10^8個APC(包括例如PBMC)，且在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)數目係剛好或大約5×10^8個APC(包括例如PBMC)。

【1755】在一些實施例中，在啟始第一擴增第0天添加的APC(包括例如PBMC)層數係在快速第二擴增第7天添加的APC(包括例如PBMC)層數的大約一半。在某些實施例中，方法包含在啟始第一擴增第0天添加抗原呈現細胞層

至第一TIL群體且在第7天添加抗原呈現細胞層至第二TIL群體，其中在第0天添加之抗原呈現細胞層的數目係在第7天添加之抗原呈現細胞層的數目的大約50%。

【1756】在其他實施例中，在快速第二擴增第7天外源供應的APC(包括例如PBMC)層數大於在啟始第一擴增第0天外源供應的APC(包括例如PBMC)層數。

【1757】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1758】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1759】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1760】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約一個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度

剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1761】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1762】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1個細胞層至剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1763】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約2個細胞層至剛好或大約3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1764】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在

平均厚度剛好或大約2個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1765】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在平均厚度剛好或大約1、2或3個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在平均厚度剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生。

【1766】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍。

【1767】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範

圍。

【1768】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍。

【1769】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍。

【1770】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範

圍。

【1771】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍。

【1772】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍。

【1773】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範

圍。

【1774】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍。

【1775】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍。

【1776】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範

圍。

【1777】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍。

【1778】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍。

【1779】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範

圍。

【1780】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍。

【1781】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍。

【1782】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係剛好或大約1:2。

【1783】在其他實施例中，啟始第一擴增的第0天在具有等於第一APC(包括例如PBMC)層數之第一平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，且快速第二擴增的第7天在具有等於第二APC(包括例如PBMC)層數之第二平均厚度的層狀APC(包括例如PBMC)存在下發生，其中第一APC(包括例如PBMC)層數與第二APC(包括例如PBMC)層數之比率係選自剛好或大約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

【1784】在一些實施例中，啟始第一擴增中之APC數目係選自約1.0×10^6個APC/cm^2至約4.5×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約2.5×10^6個APC/cm^2至約7.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

【1785】在一些實施例中，啟始第一擴增中之APC數目係選自約1.5×10^6個APC/cm^2至約3.5×10^6個APC/cm^2的範

圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約3.5×10^6個APC/cm^2至約6.0×10^6個APC/cm^2的範圍。

【1786】在一些實施例中，啟始第一擴增中之APC數目係選自約2.0×10^6個APC/cm^2至約3.0×10^6個APC/cm^2的範圍，且快速第二擴增中之APC數目係選自約4.0×10^6個APC/cm^2至約5.5×10^6個APC/cm^2的範圍。

A. 視情況選用的細胞培養基組分

1. 抗CD3抗體

【1787】在一些實施例中，用於本文所描述之擴增方法(參見例如圖1及圖8(尤其例如圖8B))的培養基包括抗CD3抗體。抗CD3抗體與IL-2之組合在TIL群體中誘導T細胞活化及細胞分裂。此效應可見於全長抗體以及Fab及F(ab')2片段，前者通常較佳；參見例如Tsoukas等人，《免疫學雜誌》 **1985,** *135*, 1719，特此以全文引用之方式併入。

【1788】如此項技術中熟習此項技術者將瞭解，一些合適的抗人類CD3抗體可用於本發明，包括來自各種哺乳動物之抗人類CD3多株及單株抗體，包括(但不限於)鼠類、人類、靈長類動物、大鼠及犬科動物抗體。在一些實施例中，使用OKT3抗CD3抗體莫羅單抗(可購自新澤西州拉裡坦市的Ortho-McNeil公司或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)。參見表1。

【1789】如此項技術中熟習此項技術者將瞭解，一些

合適的抗人類CD3抗體可用於本發明，包括來自各種哺乳動物之抗人類CD3多株及單株抗體，包括(但不限於)鼠類、人類、靈長類動物、大鼠及犬科動物抗體。在一些實施例中，使用OKT3抗CD3抗體莫羅單抗(可購自新澤西州拉裡坦市的Ortho-McNeil公司或加利福尼亞州奧本市的美天旎生物技術公司)。

2. 4-1BB(CD137)促效劑

【1790】在一些實施例中，啟始第一擴增及/或快速第二擴增之細胞培養基包含TNFRSF促效劑。在一些實施例中，TNFRSF促效劑為4-1BB(CD137)促效劑。4-1BB促效劑可為此項技術中已知之任何4-1BB結合分子。4-1BB結合分子可為能夠與人類或哺乳動物4-1BB結合之單株抗體或融合蛋白質。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可包含免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文所使用，術語結合分子亦包括抗體(包括全長抗體)；單株抗體(包括全長單株抗體)；多株抗體；多特異性抗體(例如雙特異性抗體)；人類、人類化或嵌合抗體；以及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生的片段、任何上述者之抗原決定基結合片段，以及與4-1BB結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一些實施例中，4-1BB促效劑

為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，4-1BB促效劑為一種人類化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本發明所揭示之方法及組合物中之4-1BB促效劑包括抗4-1BB抗體、人類抗4-1BB抗體、小鼠抗4-1BB抗體、哺乳動物抗4-1BB抗體、單株抗4-1BB抗體、多株抗4-1BB抗體、嵌合抗4-1BB抗體、抗4-1BB阿德奈汀(adnectin)、抗4-1BB域抗體、單鏈抗4-1BB片段、重鏈抗4-1BB片段、輕鏈抗4-1BB片段、抗4-1BB融合蛋白質，及其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。已知促效性抗4-1BB抗體誘導強烈免疫反應。Lee等人，《公共科學圖書館·綜合(*PLOS One*)》 **2013**, *8*, e69677。在一些實施例中，4-1BB促效劑為促效性抗4-1BB人類化或完全人類單株抗體(亦即，衍生自單一細胞株之抗體)。在一些實施例中，4-1BB促效劑為EU-101(Eutilex Co. Ltd.)、烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。在一些實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。

【1791】在一些實施例中，4-1BB促效劑或4-1BB結合分子亦可為融合蛋白質。在一些實施例中，相較於通常具有兩個配位體結合域之促效性單株抗體，多聚4-1BB促效劑，諸如三聚或六聚4-1BB促效劑(具有三個或六個配位體結合域)可誘導優良受體(4-1BBL)聚類及內部細胞信號傳導複合物形成。包含三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視

情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白質之三聚(三價)或六聚(或六價)或更大融合蛋白質描述於例如Gieffers等人，《分子癌症治療學(*Mol. Cancer Therapeutics*)》**2013,** *12,* 2735-47中。

【1792】已知促效性4-1BB抗體及融合蛋白質誘導強烈免疫反應。在一些實施例中，4-1BB促效劑係以足以減少毒性之方式與4-1BB抗原特異性結合的單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)(例如NK細胞毒性)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，4-1BB促效劑係消除Fc區功能性之促效性4-1BB單株抗體或融合蛋白質。

【1793】在一些實施例中，4-1BB促效劑之特徵在於以高親和力及促效活性與人類4-1BB(SEQ ID NO:40)結合。在一些實施例中，4-1BB促效劑為與人類4-1BB(SEQ ID NO:40)結合之結合分子。在一些實施例中，4-1BB促效劑為與鼠類4-1BB(SEQ ID NO:41)結合之結合分子。4-1BB促效劑或結合分子所結合之4-1BB抗原的胺基酸序列概述於表13中。

表 13. 4-1BB 抗原之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:40 人類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員 9 (智人)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:41 鼠類 4-1BB，腫瘤壞死因子受體超家族成員 9 (家鼷鼠)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

【1794】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB、或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠類4-1BB。

【1795】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類

或鼠類4-1BB結合的4-1BB促效劑。

【1796】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類4-1BB結合的4-1BB促效劑。

【1797】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括4-1BB促效劑，該4-1BB促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類4-1BB結合、或以約1 nM或更低之IC_{50}

與人類或鼠類4-1BB結合。

【1798】在一些實施例中，4-1BB促效劑為烏圖木單抗(亦稱為PF-05082566或MOR-7480)或其片段、衍生物、變異體或生物類似物。烏圖木單抗可購自輝瑞公司(Pfizer, Inc.)。烏圖木單抗為免疫球蛋白G2-λ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏圖木單抗之胺基酸序列闡述於表14中。烏圖木單抗包含位於Asn59及Asn292之醣基化位點；位於位置22-96(V_H-V_L)、143-199(C_H1-CL)、256-316(C_H2)及362-420(C_H3)之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置22'-87'(V_H-V_L)及136'-195'(C_H1-CL)之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於IgG2A異型體位置218-218、219-219、222-222及225-225、位於IgG2A/B異型體位置218-130、219-219、222-222及225-225及位於IgG2B異型體位置219-130(2)、222-222及225-225之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；以及位於IgG2A異型體位置130-213'(2)、IgG2A/B異型體位置218-213'及130-213'及位於IgG2B異型體位置218-213'(2)之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏圖木單抗及其變異體及片段之製備及性質描述於美國專利案第8,821,867、8,337,850及9,468,678號及國際專利申請公開案第WO 2012/032433 A1號中，其中每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。烏圖木單抗之臨床前特徵描述於Fisher等人，《癌症免疫學及免疫治療(*Cancer Immunolog. & Immunother.*)》 **2012,** *61,* 1721-33中。目前烏圖木單抗

在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院(U.S. National Institutes of Health)clinicaltrials.gov識別號NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066及NCT02554812。

【1799】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含SEQ ID NO:42所提供之重鏈及SEQ ID NO:43所提供之輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1800】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含烏圖木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:44所示之序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:45所

示之序列，及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少99%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少98%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少97%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少96%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少95%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含有包含V_H及V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示序列至少99%一致。

【1801】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47及SEQ ID NO:48中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50及SEQ ID NO:51中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1802】在一些實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏圖木單抗批准之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含4-1BB抗體，該4-1BB抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺

基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其與該參考藥品或參考生物產品相比包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中所包含之賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏圖木單抗。

表 14. 與烏圖木單抗相關之 4-1BB 促效劑抗體的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:42 烏圖木單抗之重鏈	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G	60 120 180 240 300 360 420 441
SEQ ID NO:43 烏圖木單抗之輕鏈	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS	60 120 180 214
SEQ ID NO:44 烏圖木單抗之重鏈可變區	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:45 烏圖木單抗之輕鏈可變區	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL	60 108
SEQ ID NO:46 烏圖木單抗之重鏈 CDR1	STYWIS	6
SEQ ID NO:47 烏圖木單抗之重鏈 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG	17
SEQ ID NO:48 烏圖木單抗之重鏈 CDR3	RGYGIFDY	8
SEQ ID NO:49 烏圖木單抗之輕鏈 CDR1	SGDNIGDQYA H	11
SEQ ID NO:50 烏圖木單抗之輕鏈 CDR2	QDKNRPS	7
SEQ ID NO:51 烏圖木單抗之輕鏈 CDR3	ATYTGFGSLA V	11

【1803】在一些實施例中，4-1BB促效劑為單株抗體烏瑞魯單抗(亦稱為BMS-663513及20H4.9.h4a)或其片段、衍生物、變異體或生物類似物。烏瑞魯單抗可購自百時美施貴寶公司及Creative Biolabs, Inc.。烏瑞魯單抗為免疫球蛋白G4-κ抗[*智人*TNFRSF9(腫瘤壞死因子受體超家族成員

9，4-1BB，T細胞抗原ILA，CD137)]*智人*(完全人類)單株抗體。烏瑞魯單抗之胺基酸序列闡述於表15中。烏瑞魯單抗包含位於位置298(及298'')之N-醣基化位點；位於位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-CL)、262-322(C_H2)及368-426(C_H3)(及位於位置22''-95''、148''-204''、262''-322''及368''-426'')之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置23'-88'(V_H-V_L)及136'-196'(C_H1-CL)(及位於位置23'''-88'''及136'''-196''')之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置227-227''及230-230''之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於135-216'及135''-216'''之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏瑞魯單抗及其變異體及片段之製備及性質描述於美國專利案第7,288,638及8,962,804號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。烏瑞魯單抗之臨床前及臨床特徵描述於Segal等人，《臨床癌症研究(*Clin. Cancer Res.*)》 **2016**, 請訪問http:/dx.doi.org/ 10.1158/ 1078-0432.CCR-16-1272。目前烏瑞魯單抗在多種血液及實體腫瘤適應症之臨床試驗包括美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別號NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992及NCT01471210。

【1804】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含SEQ ID NO:52所提供之重鏈及SEQ ID NO:53所提供之輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID

NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:53所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1805】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含烏瑞魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:54所示之序列，且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:55所示之序列，及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少99%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少98%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少97%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少96%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含V_H及V_L區，其各

自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少95%一致。在一些實施例中，4-1BB促效劑包含有包含V_H及V_L區之scFv抗體，該等區各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示序列至少99%一致。

【1806】在一些實施例中，4-1BB促效劑包含分別具有SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57及SEQ ID NO:58中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60及SEQ ID NO:61中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1807】在一些實施例中，4-1BB促效劑為藥物管理機構參考烏瑞魯單抗核準之4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含4-1BB抗體，該4-1BB抗體包含與參考藥品或參考生物學產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中4-1BB促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如

美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為烏瑞魯單抗。

表 15. 與烏瑞魯單抗相關之 4-1BB 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:52 烏瑞魯單抗之重鏈	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:53 烏瑞魯單抗之輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
SEQ ID NO:54 烏瑞魯單抗之可變重鏈	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
SEQ ID NO:55 烏瑞魯單抗之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
SEQ ID NO:56 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR1	GYYWS	5
SEQ ID NO:57 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR2	EINHGGYVTY NPSLES	16
SEQ ID NO:58 烏瑞魯單抗之重鏈 CDR3	DYGPGNYDWY FDL	13

SEQ ID NO:59 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:60 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:61 烏瑞魯單抗之輕鏈 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【1808】在一些實施例中，4-1BB促效劑係選自由以下組成之群：1D8、3Elor、4B4 (BioLegend 309809)、H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532)、BBK2 (賽默飛世爾(Thermo Fisher) MS621PABX)、145501 (Leinco Technologies B591)、藉由寄存為ATCC第HB-11248號之細胞株產生且美國專利案第6,974,863號中揭示之抗體、5F4 (BioLegend 31 1503)、C65-485 (BD Pharmingen 559446)、美國專利申請公開案第US 2005/0095244號中揭示之抗體、美國專利案第7,288,638號中揭示之抗體(諸如20H4.9-IgG1 (BMS-663031))、美國專利案第6,887,673號中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利案第7,214,493號中揭示之抗體、美國專利案第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利案第6,569,997號中揭示之抗體、美國專利案第6,905,685號中揭示之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、美國專利案第6,362,325號中揭示之抗體(諸如1D8或BMS-469492；3H3或BMS-469497；或3E1)、美國專利案第6,974,863號中揭示之抗體(諸如53A2)；美國專利案第6,210,669號中揭示之抗體(諸如1D8、3B8或3E1)、美國專

利案第5,928,893號中描述之抗體、美國專利案第6,303,121號中揭示之抗體、美國專利案第6,569,997號中揭示之抗體、國際專利申請公開案第WO 2012/177788、WO 2015/119923及WO 2010/042433號中揭示之抗體，及其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物，其中前述專利或專利申請公開案中之每一者之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1809】在一些實施例中，4-1BB促效劑為以下中描述之4-1BB促效融合蛋白質：國際專利申請公開案第WO 2008/025516 A1號、第WO 2009/007120 A1號、第WO 2010/003766 A1號、第WO 2010/010051 A1號及第WO 2010/078966 A1號；美國專利申請公開案第US 2011/0027218 A1號、第US 2015/0126709 A1號、第US 2011/0111494 A1號、第US 2015/0110734 A1號及第US 2015/0126710 A1號；及美國專利案第9,359,420號、第9,340,599, 8,921,519號及第8,450,460號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1810】在一些實施例中，4-1BB促效劑為如結構I-A(C端Fc抗體片段融合蛋白質)或結構I-B(N端Fc抗體片段融合蛋白質)中所描繪之4-1BB促效融合蛋白質，或其片段、衍生物、結合物、變體或生物類似物(參見圖18)。在結構I-A及I-B中，圓柱係指個別多肽結合域。結構I-A及I-B包含三個線性連接的TNFRSF結合域，該等TNFRSF結合域衍生自例如4-1BBL (4-1BB配位體、CD137配位體(CD137L)或腫瘤壞死因子超家族成員9 (TNFSF9)或結合4-1BB之抗

體，該等TNFRSF結合域摺疊以形成三價蛋白質，接著該三價蛋白質經由IgG1-Fc(包括C_H3及C_H2域)與第二三價蛋白質連接，隨後該IgG1-Fc用於經由二硫鍵(細長小橢圓)將兩個三價蛋白質連接在一起，從而使結構穩定且提供能夠將六個受體之細胞內信號傳導域放在一起且信號傳導蛋白質以形成信號傳導複合物的促效劑。表示為圓柱體之TNFRSF結合域可為包含例如由連接子連接之V_H及V_L鏈的scFv域，該連接子可包含親水性殘基及提供柔性的Gly與Ser序列以及提供溶解性的Glu與Lys。可使用任何scFv域設計，諸如以下中描述之彼等scFv域：de Marco, 《微生物細胞工廠(Microbial Cell Factories)》, 2011, 10, 44；Ahmad等人, 《臨床及發育免疫學(Clin.& Dev.Immunol.)》2012, 980250；Monnier等人, 《抗體(Antibodies)》, 2013, 2, 193-208；或本文中別處併入之參考文獻。此形式之融合蛋白質結構描述於美國專利案第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1811】圖18中所提供之結構I-A之其他多肽域之胺基酸序列可見於表16中。Fc域較佳包含完整恆定域(SEQ ID NO:62之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:62之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:62之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc抗體之較佳連接子可選自SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:72中所提供之實施例，包括適合於融合其他多肽之連接子。

表16. 具有C端Fc-抗體片段融合蛋白質設計(結構I-A)之TNFRSF促效劑融合蛋白質(包含4-1BB促效劑融合蛋白質)之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:62 Fc域	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
SEQ ID NO:63 連接子	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:64 連接子	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
SEQ ID NO:65 連接子	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:66 連接子	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
SEQ ID NO:67 連接子	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:68 連接子	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
SEQ ID NO:69 連接子	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
SEQ ID NO:70 連接子	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
SEQ ID NO:71 連接子	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
SEQ ID NO:72 連接子	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

【1812】圖18中所提供之結構I-B之其他多肽域之胺基酸序列可見於表17中。若Fc抗體片段如在結構I-B中與TNRFSF融合蛋白質之N端融合，則Fc模組之序列較佳為SEQ ID NO:73中所示之序列，且連接子序列較佳係選自SED ID NO:74至SEQ ID NO:76中所闡述之實施例。

表17.具有N端Fc-抗體片段融合蛋白質設計(結構I-B)之TNFRSF促效劑融合蛋白質(包含4-1BB促效劑融合蛋白質)之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:73 Fc域	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
SEQ ID NO:74 連接子	SGSGSGSGSG S	11
SEQ ID NO:75 連接子	SSSSSSGSGS GS	12
SEQ ID NO:76 連接子	SSSSSSGSGS GSGSGS	16

【1813】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個選自由以下組成之群之4-1BB結合域：烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏瑞魯單抗之可變重鏈及可變輕鏈、烏圖木單抗之可變重鏈及可變輕鏈、選自表18中所描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述可變重鏈及可變輕鏈之任何組合，以及其片段、衍生物、結合物、變異體及生物類似物。

【1814】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個含有4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個包含根據SEQ ID NO:77之序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個含有可溶性4-1BBL序列的4-1BB結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個包含根據

SEQ ID NO:78之序列的4-1BB結合域。

【1815】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合域，該一或多個結合域為包含各自分別與SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包括一或多個4-1BB結合域，該一或多個結合域為包含各自分別與SEQ ID NO:54及SEQ ID NO:55中所示之序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之4-1BB促效劑融合蛋白質包含一或多個4-1BB結合域，該一或多個結合域為包含各自與表18中所提供之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區的scFv域，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表18. 適用作融合蛋白質中之4-1BB結合域或適用作scFv 4-1BB促效劑抗體之其他多肽域。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:77 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
SEQ ID NO:78 4-1BBL 可溶性域	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE	60 120 168
SEQ ID NO:79 4B4-1-1 型式1之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
SEQ ID NO:80 4B4-1-1 型式1之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107

SEQ ID NO:81 4B4-1-1 型式 2 之可變重鏈	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
SEQ ID NO:82 4B4-1-1 型式 2 之可變輕鏈	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:83 H39E3-2 之可變重鏈	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
SEQ ID NO:84 H39E3-2 之可變輕鏈	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

【1816】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性4-1BB結合域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包含在N端及/或C端之另外域，且其中該另外域為Fab或Fc片段域。在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性4-1BB結合域，(iv)第二肽連接子，及(v)第三可溶性4-1BB結合域，進一步包含在N端及/或C端之額外域，且其中該額外域為Fab或Fc片段域，其中各可溶性4-1BB域不具有莖區(其促進三聚作用且提供距離細胞膜的某一距離，但不為4-1BB結合域之一部分)且第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1817】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域，(ii)第一肽連接子，(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域，(iv)第二肽連接子，及(v)第

三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中各TNF超家族細胞介素域為4-1BB結合域。

【1818】在一些實施例中，4-1BB促效劑為4-1BB促效scFv抗體，其包含與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1819】在一些實施例中，4-1BB促效劑為BPS Bioscience 4-1BB促效劑抗體，目錄號79097-2，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BPS Bioscience (BPS Bioscience, San Diego, CA, USA)。在一些實施例中，4-1BB促效劑為Creative Biolabs 4-1BB促效劑抗體，目錄號MOM-18179，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs (Creative Biolabs, Shirley, NY, USA)。

3. OX40(CD134)促效劑

【1820】在一些實施例中，TNFRSF促效劑為OX40(CD134)促效劑。OX40促效劑可為本領域已知的任何OX40結合分子。OX40結合分子可以為能夠與人類或哺乳動物OX40結合之單株抗體或融合蛋白質。OX40促效劑或OX40結合分子可包含免疫球蛋白分子之任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類之免疫球蛋白重鏈。OX40促效劑或OX40結合分子可具有重鏈及輕鏈。如

本文所用，術語結合分子亦包括抗體(包括全長抗體)、單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、人類抗體、人類化或嵌合抗體及抗體片段，例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現文庫產生之片段、任一上述者之抗原決定基-結合片段及與OX40結合之抗體之經工程改造形式，例如scFv分子。在一些實施例中，OX40促效劑為一種完全人類抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，OX40促效劑為一種人類化抗體之抗原結合蛋白。在一些實施例中，用於本揭示方法及組合物中之OX40促效劑包括抗OX40抗體、人類抗OX40抗體、小鼠抗OX40抗體、哺乳動物抗OX40抗體、單株抗OX40抗體、多株抗OX40抗體、嵌合抗OX40抗體、抗OX40阿德奈汀(adnectin)、抗OX40域抗體、單鏈抗OX40片段、重鏈抗OX40片段、輕鏈抗OX40片段、抗OX40融合蛋白質，及其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。在一些實施例中，OX40促效劑為促效性抗OX40人類化或完全人類單株抗體(亦即，源自單個細胞株的抗體)。

【1821】在一些實施例中，OX40促效劑或OX40結合分子亦可為融合蛋白質。包含與OX40L融合之Fc域之OX40融合蛋白質描述於例如Sadun等人，《免疫療法雜誌》2009, 182, 1481-89。在一些實施例中，相較於通常具有兩個配位體結合域之促效性單株抗體，多聚OX40促效劑，諸如三聚或六聚OX40促效劑(具有三個或六個配位體結合域)可誘導優良受體(OX40L)聚類及內部細胞信號傳導

複合物形成。包含三個TNFRSF結合域及IgG1-Fc且視情況進一步連接兩個或更多個此等融合蛋白質之三聚(三價)或六聚(或六價)或更大融合蛋白質描述於例如Gieffers等人,《分子癌症治療學》 2013, 12, 2735-47中。

【1822】已知促效性OX40抗體及融合蛋白質可誘導強烈免疫反應。Curti等人, 《癌症研究》 2013, 73, 7189-98。在一些實施例中，OX40促效劑為以足夠減少毒性之方式與OX40抗原特異性結合之單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)，例如NK細胞毒性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，OX40促效劑為消除抗體依賴性細胞吞噬作用(ADCP)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，OX40促效劑為消除補體依賴性細胞毒性(CDC)之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，OX40促效劑為消除Fc區功能之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。

【1823】在一些實施例中，OX40促效劑之特徵在於以高親和力及促效活性與人類OX40(SEQ ID NO:85)結合。在一些實施例中，OX40促效劑為與人類OX40(SEQ ID NO:85)結合之結合分子。在一些實施例中，OX40促效劑為與鼠類OX40(SEQ ID NO:86)結合之結合分子。表19中概述與OX40促效劑或結合分子結合之OX40抗原之胺基酸序列。

表19. OX40抗原之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:85 人類OX40 (智人)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	60 120 180 240 277
SEQ ID NO:86 鼠類OX40 (家鼷鼠)	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI	60 120 180 240 272

【1824】在一些實施例中，所描述組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約100 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約90 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約80 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約70 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約60 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約50 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40、以約40 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40或以約30 pM或更低之K_D結合人類或鼠類OX40。

【1825】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1826】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及

方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}與人類或鼠類OX40結合。

【1827】在一些實施例中，所描述之組合物、過程及方法包括如下OX40促效劑，該OX40促效劑以約10 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約9 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約8 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約7 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約6 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約5 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約4 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約3 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合、以約2 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合或以約1 nM或更低之IC_{50}與人類或鼠類OX40結合。

【1828】在一些實施例中，OX40促效劑為塔沃西單

抗，亦稱為MEDI0562或MEDI-0562。塔沃西單抗可獲自阿斯利康公司(AstraZeneca，Inc.)之醫學免疫子公司(MedImmune subsidiary)。塔沃西單抗為免疫球蛋白G1-κ抗[智人TNFRSF4(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員4，OX40，CD134)]人類化及嵌合單株抗體。塔沃西單抗之胺基酸序列闡述於表20中。塔沃西單抗包含在位置301及301''處之N-醣基化位點，具有岩藻醣基化複合物二觸角CHO型聚醣；在位置22-95(V_H-V_L)、148-204((C_H1-C_L)、265-325(C_H2)及371-429(C_H3)處(及在位置22''-95''、148''-204''、265''-325''及371''-429''處)之重鏈鏈內雙硫鍵；在位置23'-88'(V_H-V_L)及134'-194'(C_H1-C_L)處(及在位置23'''-88'''及134'''-194'''處)之輕鏈鏈內雙硫鍵；在位置230-230''及233-233''處之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及在224-214'及224''-214'''處之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。塔沃西單抗在各種實體腫瘤適應症中之當前臨床試驗包括美國國家衛生研究院clinicaltrials.gov識別號NCT02318394及NCT02705482。

【1829】在一些實施例中，OX40促效劑包含SEQ ID NO:87所提供之重鏈及SEQ ID NO:88所提供之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ

ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:87及SEQ ID NO:88中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1830】在一些實施例中，OX40促效劑包含塔沃西單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:89中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:90中所示序列，及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自

分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少99%一致的V_H及V_L區。

【1831】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:95及SEQ ID NO:96中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1832】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考塔沃西單抗核準之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一

或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為塔沃西單抗。

表 20. 與塔沃西單抗相關之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:87 塔沃西單抗之重鏈	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:88 塔沃西單抗之輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:89 塔沃西單抗之重鏈可變區	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT	60 118
SEQ ID NO:90 塔沃西單抗之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:91 塔沃西單抗之重鏈 CDR1	GSFSSGYWN	9
SEQ ID NO:92 塔沃西單抗之重鏈 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
SEQ ID NO:93 塔沃西單抗之重鏈 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
SEQ ID NO:94 塔沃西單抗的輕鏈 CDR1	QDISNYLN	8
SEQ ID NO:95 塔沃西單抗的輕鏈 CDR2	LLIYYTSKLH S	11
SEQ ID NO:96 塔沃西單抗的輕鏈 CDR3	QQGSALPW	8

【1833】在一些實施例中，OX40促效劑為11D4，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。11D4之製備及特性描述於美國專利案第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。11D4之胺基酸序列闡述於表21中。

【1834】在一些實施例中，OX40促效劑包含SEQ ID NO:97所提供之重鏈及SEQ ID NO:98所提供之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:97及SEQ ID NO:98中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1835】在一些實施例中，OX40促效劑包含11D4之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:99中所示序列，且

OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:100中所示序列，及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1836】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:102及SEQ ID NO:103中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105及SEQ ID NO:106中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1837】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考11D4核準之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或

100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為11D4。

表21. 與11D4相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:97 11D4之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	60 120 180 240 300 360 420 444
SEQ ID NO:98 11D4之輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214

SEQ ID NO:99 11D4之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	60 118
SEQ ID NO:100 11D4之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:101 11D4的重鏈CDR1	SYSMN	5
SEQ ID NO:102 11D4的重鏈CDR2	YISSSSSTID YADSVKG	17
SEQ ID NO:103 11D4的重鏈CDR3	ESGWYLFDY	9
SEQ ID NO:104 11D4的輕鏈CDR1	RASQGISSWL A	11
SEQ ID NO:105 11D4的輕鏈CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO:106 11D4的輕鏈CDR3	QQYNSYPPT	9

【1838】在一些實施例中，OX40促效劑為18D8，其為可獲自輝瑞公司之完全人類抗體。18D8之製備及特性描述於美國專利案第7,960,515號、第8,236,930號及第9,028,824號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。18D8之胺基酸序列闡述於表22中。

【1839】在一些實施例中，OX40促效劑包含SEQ ID NO:107所提供之重鏈及SEQ ID NO:108所提供之輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列之重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ

ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少99%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少98%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少97%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少96%一致之重鏈及輕鏈。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:107及SEQ ID NO:108中所示序列至少95%一致之重鏈及輕鏈。

【1840】在一些實施例中，OX40促效劑包含18D8之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:109中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:110中所示序列，及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID

NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1841】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:111、SEQ ID NO:112及SEQ ID NO:113中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:114、SEQ ID NO:115及SEQ ID NO:116中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1842】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考18D8核准之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與

參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為18D8。

表22. 與18D8相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:107 18D8之重鏈	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:108 18D8之輕鏈	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
SEQ ID NO:109 18D8之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
SEQ ID NO:110 18D8之輕鏈可變區	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
SEQ ID NO:111 18D8的重鏈CDR1	DYAMH	5
SEQ ID NO:112 18D8的重鏈CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
SEQ ID NO:113 18D8的重鏈CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
SEQ ID NO:114 18D8的輕鏈CDR1	RASQSVSSYL A	11
SEQ ID NO:115 18D8的輕鏈CDR2	DASNRAT	7
SEQ ID NO:116 18D8的輕鏈CDR3	QQRSNWPT	8

【1843】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu119-122，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司(GlaxoSmithKline plc)之人類化抗體。Hu119-122之製備及特性描述於美國專利案第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu119-122之胺基酸序列闡述於表23中。

【1844】在一些實施例中，OX40促效劑包含Hu119-122之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包括SEQ ID NO:117中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包括SEQ ID NO:118中所示序列及其保守胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:117及SEQ ID NO:118中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1845】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具

有SEQ ID NO:119、SEQ ID NO:120及SEQ ID NO:121中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:123及SEQ ID NO:124中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1846】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu119-122核準之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一

或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu119-122。

表23. 與Hu119-122相關之OX40促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:117 Hu119-122之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:118 Hu119-122之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:119 Hu119-122的重鏈CDR1	SHDMS	5
SEQ ID NO:120 Hu119-122的重鏈CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
SEQ ID NO:121 Hu119-122的重鏈CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
SEQ ID NO:122 Hu119-122的輕鏈CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
SEQ ID NO:123 Hu119-122的輕鏈CDR2	LASNLES	7
SEQ ID NO:124 Hu119-122的輕鏈CDR3	QHSRELPLT	9

【1847】在一些實施例中，OX40促效劑為Hu106-222，其為可獲自葛蘭素史克公共有限公司之人類化抗體。Hu106-222之製備及特性描述於美國專利案第9,006,399號及第9,163,085號以及國際專利公開案第WO 2012/027328號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。Hu106-222之胺基酸序列闡述於表24中。

【1848】在一些實施例中，OX40促效劑包含Hu106-

222之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:125中所示序列，且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:126中所示序列，及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少99%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少98%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少97%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少96%一致之V_H及V_L區。在一些實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區。

【1849】在一些實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:127、SEQ ID NO:128及SEQ ID NO:129中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；以及分別具有SEQ ID NO:130、SEQ ID NO:131及SEQ ID NO:132中所闡述之序列及保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。

【1850】在一些實施例中，OX40促效劑為藥物管理機構參考Hu106-222核準之OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物單株抗體包含OX40抗

體，該OX40抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中OX40促效劑抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。OX40促效劑抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為Hu106-222。

表 24. 與 Hu106-222 相關之 OX40 促效劑抗體之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:125 Hu106-222 之重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:126 Hu106-222 之輕鏈可變區	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:127 Hu106-222 的重鏈 CDR1	DYSMH	5
SEQ ID NO:128 Hu106-222 的重鏈 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
SEQ ID NO:129 Hu106-222 的重鏈 CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
SEQ ID NO:130 Hu106-222 的輕鏈 CDR1	KASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:131 Hu106-222 的輕鏈 CDR2	SASYLYT	7
SEQ ID NO:132 Hu106-222 的輕鏈 CDR3	QQHYSTPRT	9

【1851】在一些實施例中，OX40促效劑抗體為MEDI6469(亦稱為9B12)。MEDI6469為鼠類單株抗體。Weinberg等人,《免疫療法雜誌》2006, *29*, 575-585。在一些實施例中，OX40促效劑為由9B12雜交瘤產生，由Biovest Inc.(美國馬薩諸塞州馬爾文(Malvern, MA, USA))寄存的抗體，如Weinberg等人,《免疫療法雜誌》2006, 29, 575-585中所描述，其揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗體包含MEDI6469之CDR序列。在一些實施例中，抗體包含MEDI6469之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。

【1852】在一些實施例中，OX40促效劑為L106 BD(Pharmingen，產品號340420)。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體L106(BD Pharmingen，產品號340420)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一些實施例中，OX40促效劑為ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology，目錄號20073)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一些實施例中，OX40促效劑為鼠類單株抗體抗mCD134/mOX40(純系OX86)，可購自新罕布什爾州西黎巴嫩之BioXcell Inc之InVivoMAb。

【1853】在一些實施例中，OX40促效劑係選自以下中描述之OX40促效劑：國際專利申請公開案第WO 95/12673號、第WO 95/21925號、第WO 2006/121810號、第WO 2012/027328號、第WO 2013/028231號、第WO 2013/038191號及第WO 2014/148895號；歐洲專利申請案EP 0672141；美國專利申請公開案第US 2010/136030號、第US 2014/377284號、第US 2015/190506號及第US 2015/132288號(包括純系20E5及12H3)；及美國專利案第7,504,101號、第7,550,140號、第7,622,444號、第7,696,175號、第7,960,515號、第7,961,515號、第

8,133,983號、第9,006,399號及第9,163,085號，其揭示內容各自以全文引用之方式併入本文中。

【1854】在一些實施例中，OX40促效劑為如結構I-A(C端Fc-抗體片段融合蛋白質)或結構I-B(N端Fc-抗體片段融合蛋白質)中所描繪之OX40促效性融合蛋白質，或其片段、衍生物、結合物、變異體或生物類似物。結構I-A及I-B之特性已在上文及美國專利案第9,359,420號、第9,340,599號、第8,921,519號及第8,450,460號中描述，其揭示內容以引用之方式併入本文中。圖18中所提供之結構I-A之多肽域之胺基酸序列可見於表16中。Fc域較佳包含完整恆定域(SEQ ID NO:62之胺基酸17-230)、完整鉸鏈域(SEQ ID NO:62之胺基酸1-16)或鉸鏈域之一部分(例如SEQ ID NO:62之胺基酸4-16)。用於連接C端Fc抗體之較佳連接子可選自SEQ ID NO:63至SEQ ID NO:72中所提供之實施例，包括適合於融合其他多肽之連接子。類似地，圖18中所提供之結構I-B之多肽域之胺基酸序列可見於表17中。若Fc抗體片段如在結構I-B中與TNRFSF融合蛋白質之N端融合，則Fc模組之序列較佳為SEQ ID NO:73中所示之序列，且連接子序列較佳係選自SED ID NO:74至SEQ ID NO:76中所闡述之實施例。

【1855】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個選自由以下組成之群之OX40結合域：塔沃西單抗的可變重鏈及可變輕鏈、11D4的可變重鏈及可變輕鏈、18D8的可變重鏈及可變輕鏈、

Hu119-122的可變重鏈及可變輕鏈、Hu106-222的可變重鏈及可變輕鏈、選自表25中描述之可變重鏈及可變輕鏈的可變重鏈及可變輕鏈、前述之可變重鏈及可變輕鏈的任何組合，以及其片段、衍生物、結合物、變異體及生物類似物。

【1856】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個含有OX40L序列之OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個含有根據SEQ ID NO:133之序列的OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個含有可溶性OX40L序列之OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個含有根據SEQ ID NO:134之序列的OX40結合域。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個含有根據SEQ ID NO:135之序列的OX40結合域。

【1857】在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合域，該一或多個結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合域，該一或多個結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:99及SEQ ID NO:100中所示序列至

少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合域，該一或多個結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:109及SEQ ID NO:110中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合域，該一或多個結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合域，該一或多個結合域為scFv域，該scFv域包含各自分別與SEQ ID NO:125及SEQ ID NO:126中所示序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。在一些實施例中，根據結構I-A或I-B之OX40促效劑融合蛋白質包含一或多個OX40結合域，該一或多個結合域為scFv域，該scFv域包含各自與表25中所提供之V_H及V_L序列至少95%一致之V_H及V_L區，其中V_H及V_L域由連接子連接。

表 25. 適用作融合蛋白質(例如結構 I-A 及 I-B)中之 OX40 結合域或適用作 scFv OX40 促效劑抗體之其他多肽域。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:133 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
SEQ ID NO:134 OX40L 可溶性域	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
SEQ ID NO:135 OX40L 可溶性域(替代)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
SEQ ID NO:136 008 的可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO:137 008 的可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:138 011 的可變重鏈	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA	60 120
SEQ ID NO:139 011 的可變輕鏈	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:140 021 的可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS	60 120
SEQ ID NO:141 021 的可變輕鏈	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK	60 108
SEQ ID NO:142 023 的可變重鏈	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS	60 120
SEQ ID NO:143 023 的可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:144 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS	60 119
SEQ ID NO:145 輕鏈可變區	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:146 重鏈可變區	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P	60 120 121
SEQ ID NO:147 輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108
SEQ ID NO:148 人類化抗體之重鏈可變區	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
SEQ ID NO:149 人類化抗體之重鏈可變區	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV SS	60 120 122

SEQ ID NO:150 人類化抗體之輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:151 人類化抗體之輕鏈可變區	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
SEQ ID NO:152 人類化抗體之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
SEQ ID NO:153 人類化抗體之重鏈可變區	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS	60 120
SEQ ID NO:154 人類化抗體之輕鏈可變區	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
SEQ ID NO:155 人類化抗體之輕鏈可變區	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:156 重鏈可變區	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
SEQ ID NO:157 輕鏈可變區	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK	60 120 126

【1858】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包含：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包含在N端及/或C端處之額外域，且其中該額外域為Fab或Fc片段域。在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包含：(i)第一可溶性OX40結合域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性OX40結合域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性OX40結合域，其進一步包含在N端及/或C端處之另外域，其中該另外域為Fab或Fc片段域，其中可溶性OX40結合域中之各者缺乏莖區(其促成三聚作用且提供距離細胞膜之某一距離，但不為OX40結合域之

一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度。

【1859】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性單鏈融合多肽，其包含：(i)第一可溶性腫瘤壞死因子(TNF)超家族細胞介素域；(ii)第一肽連接子；(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素域；(iv)第二肽連接子；及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素域，其中可溶性TNF超家族細胞介素域中之各者缺乏莖區且該第一及第二肽連接子獨立地具有3-8個胺基酸的長度，且其中TNF超家族細胞介素域為OX40結合域。

【1860】在一些實施例中，OX40促效劑為MEDI6383。MEDI6383為OX40促效性融合蛋白質且可如美國專利案第6,312,700號中所描述來製備，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1861】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性scFv抗體，其包含與任一前述V_L域連接之任一前述V_H域。

【1862】在一些實施例中，OX40促效劑為Creative Biolabs OX40促效劑單株抗體MOM-18455，可購自美國紐約州雪利市之Creative Biolabs，Inc.。

【1863】在一些實施例中，OX40促效劑為OX40促效性抗體純系Ber-ACT35，可購自美國加利福尼亞州聖地亞哥之BioLegend, Inc.。

B. 視情況選用之細胞存活率分析

【1864】視情況，在啟始第一擴增(有時稱為初始主體擴增(initial bulk expansion))之後，可使用此項技術中已知之標準分析法進行細胞存活率分析法。因此，在某些實施例中，方法包含在啟始第一擴增之後進行細胞存活率分析法。舉例而言，可對主體TIL樣品進行台盼藍排除分析法，其選擇性標記死細胞且允許存活率評估。其他用於測試存活率之分析可包括(但不限於)阿爾瑪藍(Alamar blue)分析及MTT分析。

1. 細胞計數、存活率、流動式細胞測量術

【1865】在一些實施例中，量測細胞計數及/或存活率。標記物(諸如但不限於CD3、CD4、CD8及CD56以及本文所揭示或描述之任何其他標記物)之表現可藉由流動式細胞測量術，使用FACSCanto™流動式細胞儀(碧迪生物科學(BD Biosciences))，用抗體，例如(但不限於)可購自碧迪生物科學之彼等者(碧迪生物科學，加利福尼亞州聖荷西)量測。細胞可使用拋棄式c-晶片血球計(VWR，伊利諾伊州巴達維亞)手動計算，且存活率可使用此項技術中已知之任何方法，包括(但不限於)台盼藍染色評估。亦可基於以全文引用的方式併入本文中之美國專利申請公開案第2018/0282694號分析細胞存活率。亦可基於美國專利申請公開案第2018/0280436號或國際專利申請公開案第WO/2018/081473號分析細胞存活率，其皆以全文引用之方

式併入本文中以用於所有目的。

【1866】在一些情況下，主體TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。替代地，主體TIL群體可進行REP且接著如下文所論述冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的TIL將用於療法中之情況下，主體或REP TIL群體可進行基因修飾以用於合適治療。

2. 細胞培養

【1867】在一些實施例中，用於擴增TIL之方法(包含上文所論述以及圖1及圖8，尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D中例示之彼等方法)可包括使用約5,000 mL至約25,000 mL細胞培養基、約5,000 mL至約10,000 mL細胞培養基或約5,800 mL至約8,700 mL細胞培養基。在一些實施例中，培養基為不含血清培養基。在一些實施例中，啟始第一擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，第二擴增中之培養基不含血清。在一些實施例中，啟始第一擴增及第二擴增(亦稱為快速第二擴增)中之培養基皆不含血清。在一些實施例中，擴增TIL數目使用不超過一種類型之細胞培養基。可使用任何合適的細胞培養基，例如AIM-V細胞培養基(L-麩醯胺酸、50 μM鏈黴素硫酸鹽及10 μM建它黴素硫酸鹽)細胞培養基(英傑公司(Invitrogen)，加利福尼亞州喀斯巴德(Carlsbad CA))。就此而言，本發明方法有利地減少擴增TIL數目所需之培養基的量及培養基類型的數目。在一些實施例中，擴增TIL數目可包含頻繁

性不超過每三或四天一次地飼養細胞。在透氣容器中擴增細胞數目藉由減少擴增細胞所需之飼養頻率，簡化擴增細胞數目所需之程序。

【1868】在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基為未經過濾的。使用未經過濾之細胞培養基可簡化擴增細胞數目所需之程序。在一些實施例中，第一及/或第二透氣容器中之細胞培養基缺乏β-巰基乙醇(BME)。

【1869】在一些實施例中，方法期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣品；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣品持續約1至8天之時段，例如約7天作為啟始第一擴增，約8天作為啟始第一擴增，該第一透氣容器含有包括IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL之數目持續約7至9天(例如約7天、約8天或約9天)之時段，該第二透氣容器含有包括IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1870】在一些實施例中，方法期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣品；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣品持續約1至7天(例如約7天)之時段作為啟始第一擴增，該第一透氣容器含有包括IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL之數目持續約7至14天或約7至9天(例如約7天、約8天、約9天、約10天或約11天)之時段，

該第二透氣容器含有包括IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1871】在一些實施例中，方法期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣品；在第一透氣容器中培養腫瘤組織樣品持續約1至7天(例如約7天)之時段作為啟始第一擴增，該第一透氣容器含有包括IL-2、1X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基；將TIL轉移至第二透氣容器且在第二透氣容器中擴增TIL之數目持續約7至11天(例如約7天、約8天、約9天、約10天或約11天)之時段，該第二透氣容器含有包括IL-2、2X抗原呈現飼養細胞及OKT-3之細胞培養基。

【1872】在一些實施例中，TIL係在透氣容器中擴增。已使用透氣容器來擴增TIL，使用PBMC，使用此項技術中已知之方法、組合物及裝置，包括美國專利申請案公開案第2005/0106717 A1號中描述之彼等，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，TIL係在透氣袋中擴增。在一些實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如Xuri細胞擴增系統W25(GE Healthcare))擴增。在一些實施例中，TIL使用在透氣袋中擴增TIL之細胞擴增系統(諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5(GE Healthcare))擴增。在一些實施例中，細胞擴增系統包括透氣細胞袋，該透氣細胞袋之容積選自由以下組成之群：約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、

約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L及約10 L。

【1873】在一些實施例中，TIL可在G-REX瓶(可購自威爾遜狼製造公司)中擴增。此類實施例使細胞群體自約5×10^5個細胞/平方公分擴增至10×10^6至30×10^6個細胞/平方公分。在一些實施例中，此係未進行飼養。在一些實施例中，此係未進行飼養，只要G-REX瓶中之培養基位於約10 cm之高度即可。在一些實施例中，此係未進行飼養但添加一或多種細胞介素。在一些實施例中，細胞介素可作為推注添加，不需要將細胞介素與培養基混合。此類容器、裝置及方法為此項技術中已知的且已用於擴增TIL，且包括以下中描述之彼等者：美國專利申請公開案第US 2014/0377739A1號、國際公開案第WO 2014/210036 A1號、美國專利申請公開案第us 2013/0115617 A1號、國際公開案第WO 2013/188427 A1號、美國專利申請公開案第US 2011/0136228 A1號、美國專利案第US 8,809,050 B2號、國際公開案第WO 2011/072088 A2號、美國專利申請公開案第US 2016/0208216 A1號、美國專利申請公開案第US 2012/0244133 A1號、國際公開案第WO 2012/129201 A1號、美國專利申請公開案第US 2013/0102075 A1號、美國專利案第US 8,956,860 B2號、國際公開案第WO 2013/173835 A1號、美國專利申請公開案第US 2015/0175966 A1號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。此類過程亦描述於Jin等人，《免疫療法雜誌》，2012, 35:283-292中。

C. TIL中基因的視情況選用之基因減弱或基因剔除

【1874】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL在擴增步驟之前、期間或之後，包括在密閉無菌製造過程期間(各者如本文所提供)經進一步操作，以用暫時性方式改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時改變的蛋白質表現係因為暫時性基因編輯。在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL用轉錄因子(transcription factor；TF)及/或其他能夠暫時改變TIL中之蛋白質表現的分子處理。在一些實施例中，TF及/或其他能夠暫時改變蛋白質表現之分子提供TIL群體中改變的腫瘤抗原表現及/或改變腫瘤抗原特異性T細胞之數目。

【1875】在某些實施例中，方法包含基因編輯TIL群體。在某些實施例中，方法包含基因編輯第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1876】在一些實施例中，本發明包括經由核苷酸插入，諸如經由核糖核酸(RNA)插入，包括插入信使RNA(mRNA)、短髮夾RNA(shRNA)或小(或短)干擾RNA(siRNA)至TIL群體中進行基因編輯，以促進一或多種蛋白質之表現或抑制一或多種蛋白質之表現以及同時促進一組蛋白質與抑制另一組蛋白質之組合。

【1877】在一些實施例中，本發明之經擴增之TIL經歷暫時改變蛋白質表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現發生在第一擴增之前的主體TIL群體，包括例如獲自例如圖8(尤其圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所

指示之步驟A的TIL群體中。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現發生在第一擴增期間，包括例如獲自例如圖8(例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所指示之步驟B的TIL群體中。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現發生在第一擴增之後，包括例如在第一與第二擴增之間轉變的TIL群體(例如本文中所描述之第二TIL群體)、獲自例如圖8中所指示之步驟B且包括於步驟C中的TIL群體中。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現發生在第二擴增之前的主體TIL群體中，包括例如在獲自例如圖8中所指示之步驟C且在步驟D中其擴增之前的TIL群體中。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現發生在第二擴增期間，包括例如在例如圖8中所指示之步驟D中擴增之TIL群體(例如第三TIL群體)中。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現發生在第二擴增之後，包括例如在獲自例如圖8中所指示之步驟D中之擴增的TIL群體中。

【1878】在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括電致孔之步驟。電致孔方法為此項技術中已知的，且描述於例如以下中：Tsong,《生物物理學雜誌(Biophys. 雜誌》1991, 60, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面塗佈及內飲作用)為此項技術中已知的且描述於以下中：Graham及van der Eb,

《病毒學(Virology)》 1973, 52, 456-467；Wigler等人，《美國國家科學院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci.)》 1979, 76, 1373-1376；及Chen及Okayarea, 《分子細胞生物學(Mol. Cell.Biol.)》 1987, 7, 2745-2752；及美國專利案第5,593,875號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*, *n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1: 1(w/w)脂質體調配物之方法為此項技術中已知的且描述於Rose等人，《生物技術(Biotechniques)》 1991, 10, 520-525及Felgner等人，《美國國家科學院院刊》，1987, 84, 7413-7417以及美國專利案第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，暫時改變TIL群體中之蛋白質表現之方法包括使用以下中描述之方法之轉染步驟：美國專利案第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994 號及第7,189,705號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。

【1879】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起幹記憶T細胞(Stem Memory T cell；TSCM)增加。TSCM為抗原經歷中樞記憶T細胞之早期前驅細胞。TSCM一般呈現定義幹細胞之長期存活、自我更新及多效能能力，且一

般為產生有效TIL產物所需的。在授受性細胞轉移之小鼠模型中，已證實TSCM與其他T細胞子集相比增強的抗腫瘤活性。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起具有包含高比例之TSCM之組成的TIL群體。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TSCM百分比增加至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIL群體中之TSCM增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍或10倍。在一些實施例中，蛋白質表現之暫時改變引起具有至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之TIL群體。在一些實施例中，蛋白質表現之暫時改變引起具有至少5%、至少10%、至少10%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95% TSCM之治療性TIL群體。

【1880】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起抗原經歷T細胞回春(rejuvenation)。在一些實施例中，回春包括例如增加增殖、增加T細胞活化及/或增加抗原識

別。

【1881】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現改變一大部分T細胞之表現，以保留腫瘤衍生之TCR貯庫。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現不改變腫瘤衍生之TCR貯庫。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現維持腫瘤衍生之TCR貯庫。

【1882】在一些實施例中，暫時改變蛋白質引起改變特定基因之表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向包括(但不限於)以下之基因：PD-1(亦稱為PDCD1或CC279)、TGFBR2、CCR4/5、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(chimeric co-stimulatory receptor；CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選擇相關高遷移率群(HMG)匣(TOX)、錨蛋白重複域11(ANKRD11)、BCL6共抑制子(BCOR)及/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向選自由以下組成之群之基因：PD-1、TGFBR2、CCR4/5、CTLA-4、CBLB(CBL-B)、CISH、嵌合共刺激受體(CCR)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、

CXCR2、CSCR3、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選擇相關高遷移率群(HMG)匣(TOX)、錨蛋白重複域11(ANKRD11)、BCL6共抑制子(BCOR)及/或cAMP蛋白激酶A(PKA)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向PD-1。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向TGFBR2。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCR4/5。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CTLA-4。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CBLB。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CISH。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCR(嵌合共刺激受體)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向IL-2。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向IL-12。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向IL-15。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向IL-21。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向TIM3。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向LAG3。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向TIGIT。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向TET2。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向TGFβ。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCR1。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCR2。在一些實施例中，暫時

改變蛋白質表現靶向CCR4。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCR5。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CXCR1。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CXCR2。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CSCR3。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCL2(MCP-1)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCL3(MIP-1α)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCL4(MIP1-β)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCL5(RANTES)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CXCL1。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CXCL8。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCL22。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CCL17。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向VHL。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向CD44。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向PIK3CD。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向SOCS1。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向胸腺細胞選擇相關之高遷移率群(HMG)匣(TOX)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向錨蛋白重複域11(ANKRD11)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向BCL6輔抑制物(BCOR)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現靶向cAMP蛋白激酶A(PKA)。

【1883】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起趨化介素受體增加及/或過表現。在一些實施例中，因暫

時性蛋白質表現而過表現之趨化介素受體包括具有配位體之受體，該配位體包括(但不限於)CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1α)、CCL4(MIP1-β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22及/或CCL17。

【1884】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1、CTLA-4、CBLB、CISH、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TET2、TGFβR2及/或TGFβ之表現降低及/或減少(包括導致例如TGFβ路徑阻斷)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CBLB(CBL-B)之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM-3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起LAG-3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TGFβR2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TGFβ之表現降低及/或減少。

【1885】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起趨化介素受體增加及/或過表現，以例如改良TIL運輸或運動至腫瘤部位。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起嵌合共刺激受體(CCR)增加及/或過表現。在一些實施例

中，暫時改變蛋白質表現引起選自由以下組成之群之趨化介素受體增加及/或過表現：CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2及/或CSCR3。.

【1886】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起介白素增加及/或過表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起選自由以下組成之群之介白素增加及/或過表現：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及/或IL-21。

【1887】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起NOTCH 1/2 ICD增加及/或過表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起VHL增加及/或過表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CD44增加及/或過表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PIK3CD增加及/或過表現。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起SOCS1之增加及/或過表現。

【1888】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起cAMP蛋白激酶A(PKA)之表現降低及/或減少。

【1889】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起選自由以下組成之群之分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起選自由以下組成之群之兩種分子之表現降低及/或減少：PD-1、LAG3、TIM3、

CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及選自由以下組成之群之一種分子之表現降低及/或減少：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起以下之表現降低及/或減少：PD-1、CTLA-4、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT及其組合(例如，上述免疫檢查點中之兩種或更多種，諸如PD-1與TIGIT、PD-1與LAG3、PD-1與TIM3、TIM3與CTLA-4等)。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及以下中之一者之表現降低及/或減少：CTLA-4、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT、TET2及其組合。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及CTLA-4之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質

表現引起PD-1及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起PD-1及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CTLA-4及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CTLA-4及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CTLA-4及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CTLA-4及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CTLA-4及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CTLA-4及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起LAG3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起LAG3及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起LAG3及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起LAG3及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起LAG3及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CISH及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CISH及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CISH及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CISH及TET2之表現降低及/或減少。在一

些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CBLB及TIM3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CBLB及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起CBLB及TET2之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM3及PD-1之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM3及LAG3之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM3及CISH之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM3及CBLB之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM3及TIGIT之表現降低及/或減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起TIM3及TET2之表現降低及/或減少。

【1890】在一些實施例中，選自由CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合組成之群之黏著分子藉由γ反轉錄病毒或慢病毒方法插入第一TIL群體、第二TIL群體或所收集TIL群體中(例如黏著分子之表現增加)。

【1891】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起選自由PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合組成之群之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現引起選

自由PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、CISH、CBLB、TIGIT、TET2及其組合組成之群之分子的表現降低及/或減少，及CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1及其組合的表現增加及/或增強。

【1892】在一些實施例中，表現減少約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1893】在一些實施例中，表現增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例

中，表現增加至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現增加至少約80%。在一些實施例中，表現增加至少約85%。在一些實施例中，表現增加至少約90%。在一些實施例中，表現增加至少約95%。在一些實施例中，表現增加至少約99%。

【1894】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現係藉由用轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時改變TIL中之蛋白質表現之分子處理TIL來誘導。在一些實施例中，採用無SQZ載體之微流體平台進行轉錄因子(TF)及/或其他能夠暫時改變蛋白質表現之分子的細胞內遞送。此類方法證明將包括轉錄因子之蛋白質遞送至包括T細胞之多種初代人類細胞的能力，其已描述於美國專利申請公開案第US 2019/0093073 A1號、第US 2018/0201889 A1號及第US 2019/0017072 A1號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。此類方法可用於本發明中，以將TIL群體暴露於轉錄因子(TF)及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子，其中該等TF及/或其他能夠誘導暫時性蛋白質表現之分子提供TIL群體中之腫瘤抗原之表現增加及/或腫瘤抗原特異性T細胞之數目增加，從而導致TIL群體重新程式化及重新程式化TIL群體之治療功效相較於非重新程式化TIL群體增加。在一些實施例中，重新程式化導致相對於開始或先前TIL群體(亦即，在重新程式化之前)，效應T細胞及/或中樞記憶T細胞亞群增加，如本文所描述。

【1895】在一些實施例中，轉錄因子(TF)包括(但不限於)TCF-1、NOTCH 1/2 ICD及/或MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為TCF-1。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為NOTCH 1/2 ICD。在一些實施例中，轉錄因子(TF)為MYB。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與誘導性富潛能幹細胞培養物(iPSC)，諸如市售KNOCKOUT血清替代品(Gibco/賽默飛世爾)一起投與，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)與iPSC混合液一起投與，以誘導另外TIL重新程式化。在一些實施例中，轉錄因子(TF)不與iPSC混合液一起投與。在一些實施例中，重新程式化引起TSCM之百分比增加。在一些實施例中，重新程式化引起TSCM之百分比增加約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95% TSCM。

【1896】在一些實施例中，如上文所描述之暫時改變蛋白質表現之方法可與基因修飾TIL群體之方法組合，包括穩定併入用於產生一或多種蛋白質之基因之步驟。在某些實施例中，方法包含基因修飾TIL群體之步驟。在某些實施例中，方法包含基因修飾第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括反轉錄病毒轉導之步驟。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括慢病毒轉導之步驟。慢病毒轉導系統為此項技術中已知的且描述於例如以下中：Levine

等人，《美國國家科學院院刊》 2006, 103, 17372-77；Zufferey等人，《自然生物技術學》 1997, 15, 871-75；Dull等人，《病毒學雜誌》 1998, 72, 8463-71及美國專利案第6,627,442號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括γ-反轉錄病毒轉導之步驟。γ-反轉錄病毒轉導系統為此項技術中已知的且描述於例如Cepko及Pear, 《分子生物學中之當前方案(Cur.案》 1996, 9.9.1-9.9.16，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括轉位子介導之基因轉移之步驟。轉位子介導之基因轉移系統為此項技術中已知的，且包括其中轉位酶作為DNA表現載體或作為可表現的RNA或蛋白質提供，使得轉位酶之長期表現不發生在轉殖基因細胞中，例如提供為mRNA(例如包含帽及多腺苷酸尾之mRNA)的轉位酶。包括類鮭魚型Tel樣轉位酶(SB或睡美人轉位酶)，諸如SB10、SB11及SB100x；及酶活性增加之經工程改造酶之合適的轉位子介導之基因轉移系統描述於例如以下中：Hackett等人，《分子療法》 2010, 18, 674-83及美國專利案第6,489,458號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。

【1897】在一些實施例中，暫時改變TIL中之蛋白質表現係由小型干擾RNA(small interfering RNA；siRNA)誘導，該小型干擾RNA有時稱為短干擾RNA或緘默RNA，其為雙股RNA分子，長度一般為19-25個鹼基對。siRNA用於

RNA干擾(RNA interference；RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。

【1898】在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現為表現減少。在一些實施例中，暫時改變蛋白質表現係由自我遞送RNA干擾(self-delivering RNA interference；sdRNA)誘導，該自我遞送RNA干擾為具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH_3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包含20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。小型干擾RNA(siRNA)，有時稱為短干擾RNA或緘默RNA，為雙股RNA分子，長度一般為19-25個鹼基對。siRNA用於RNA干擾(RNAi)中，其中siRNA干擾具有互補核苷酸序列之特定基因之表現。sdRNA為進入細胞不需要遞送媒介之共價及疏水性修飾之RNAi化合物。sdRNA一般為具有極小雙股區之不對稱化學修飾核酸分子。sdRNA分子通常含有單股區及雙股區，且可在分子之單股及雙股區內含有各種化學修飾。另外，如本文中所描述，sdRNA分子可與疏水性結合物，諸如習知及高級固醇型分子連接。sdRNA及製備此類sdRNA之相關方法亦已廣泛描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2016/0304873 A1號、第US 2019/0211337 A1號、第US 2009/0131360 A1號及第US 2019/0048341 A1號，及美國專利案第10,633,654號及第10,913,948B2號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。為了最佳化sdRNA結構、化

學性質、靶向位置、序列偏好及其類似物，已開發一種演算法且將其用於sdRNA效能預測。基於此等分析，功能性sdRNA序列一般定義為在1 μM濃度下表現減少超過70%，其中機率超過40%。

【1899】雙股RNA(dsRNA)可通常用以定義包含一對互補RNA股，一般有義(乘客)及反義(嚮導)股之任何分子，且可包括單股懸垂組區。與siRNA不同，術語dsRNA一般係指包括siRNA分子之序列之前驅物分子，該siRNA分子藉由裂解酶系統(包括Dicer)之作用自較大dsRNA分子釋放。

【1900】在一些實施例中，方法包含暫時改變TIL群體(包括經修飾以表現CCR之TIL)中蛋白質表現，包含使用自我遞送RNA干擾(sdRNA)，其為例如具有高百分比之2'-OH取代(通常氟或-OCH3)之化學上合成的不對稱siRNA雙螺旋，其包含20個核苷酸之反義(引導)股及使用四乙基乙二醇(TEG)連接子在其3'端處與膽固醇結合之13至15個鹼基有義(乘客)股。使用siRNA及sdRNA之方法已描述於以下中：Khvorova及Watts,《自然生物技術學(Nat. Biotechnol.)》 2017, 35, 238-248；Byrne等人,《眼藥理學與治療學雜誌(J. Ocul. Pharmacol. Ther.)》 2013, 29, 855-864；及Ligtenberg等人,《分子療法》 2018, 26, 1482-93，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，siRNA之遞送係使用電致孔或細胞膜破壞(諸如擠壓或SQZ法)來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至

TIL群體不需要使用電致孔、SQZ或其他方法來完成，實際上使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為1 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA。在某些實施例中，方法包含遞送siRNA或sdRNA至TIL群體，其包含將TIL群體暴露於濃度為1 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA持續1至3天之間的時段。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為10 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為50 μM/10,000個TIL於培養基中之sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL於培養基中之間的sdRNA來完成。在一些實施例中，遞送sdRNA至TIL群體係使用1至3天時段使TIL群體暴露於濃度為介於0.1 μM/10,000個TIL與50 μM/10,000個TIL於培養基中之間的sdRNA來完成，其中暴露於sdRNA藉由添加新鮮sdRNA至培養基來進行兩次、三次、四次或五次。其他合適過程描述於例如以下中：美國專利申請公開案第US 2011/0039914 A1號、第US 2013/0131141 A1號及第US 2013/0131142 A1號，及美國專利案第9,080,171號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1901】在一些實施例中，在製造期間將siRNA或sdRNA插入TIL群體中。在一些實施例中，sdRNA編碼干

擾以下之RNA：NOTCH 1/2 ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFβ、TGFBR2、cAMP蛋白激酶A(PKA)、BAFF BR3、CISH及/或CBLB。在一些實施例中，表現減少係基於例如藉由流動式細胞測量術及/或qPCR評估之基因緘默之百分比而判定。在一些實施例中，表現減少約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約75%、約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%、約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約85%、約90%或約95%。在一些實施例中，表現減少至少約80%。在一些實施例中，表現減少至少約85%。在一些實施例中，表現減少至少約90%。在一些實施例中，表現減少至少約95%。在一些實施例中，表現減少至少約99%。

【1902】基於化學修飾siRNA之自我可遞送RNAi技術可用於本發明之方法中，以成功遞送sdRNAs至如本文中所描述之TIL。主鏈修飾與不對稱siRNA結構及疏水配位體的組合(參見例如，Ligtenberg等人，《分子療法》2018, *26*, 1482-93及美國專利申請公開案第2016/0304873 A1號，其揭示內容以引用的方式併入本文中)允許sdRNA藉由簡

單地添加至培養基中，利用核酸酶穩定性或sdRNA而無需額外的調配物及方法即可滲透經培養的哺乳動物細胞。此穩定性允許僅藉由維持sdRNA於培養基中之有效濃度，支持恆定含量之RNAi介導之目標基因活性減少。儘管不受理論束縛，但sdRNA之主鏈穩定化提供延長減少基因表現效應，其在非分裂細胞中可持續數月。

【1903】在一些實施例中，超過95%之TIL轉染效率及目標之表現減少藉由各種特定siRNA或sdRNA發生。在一些實施例中，含有若干未經修飾之核糖殘基之siRNA或sdRNA經完全修飾的序列置換，以增加RNAi效應之效能及/或壽命。在一些實施例中，表現減少效應維持12小時、24小時、36小時、48小時、5天、6天、7天或8天或更久。在一些實施例中，表現減少效應在siRNA或sdRNA處理TIL 10天或更久後降低。在一些實施例中，目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，TIL中之目標表現維持超過70%之表現減少。在一些實施例中，PD-1/PD-L1路徑中之表現減少允許TIL展現更強效的活體內效應，此在一些實施例中係因為避免PD-1/PD-L1路徑之抑制效應。在一些實施例中，因siRNA或sdRNA之PD-1之表現減少導致增加TIL增殖。

【1904】在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現70%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現75%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現80%之目

標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現85%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現90%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現95%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列展現99%之目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.25 μM至約4 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約0.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約1.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中

使用之sdRNA序列當以約2.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約2.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.25 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.5 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約3.75 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。在一些實施例中，本發明中使用之sdRNA序列當以約4.0 μM之濃度遞送時展現目標基因表現減少。

【1905】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸劑包含一或多種修飾以增加治療劑之穩定性及/或有效性及實現寡核苷酸至待治療之細胞或組織之有效遞送。此類修飾可包括2'-O-甲基修飾、2'-O-氟修飾、二硫代磷酸酯修飾、2' F修飾的核苷酸、2'-O-甲基修飾的及/或2'去氧核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸經修飾以包括一或多個疏水性修飾，包括例如固醇、膽固醇、維生素D、萘基、異丁基、苯甲基、吲哚、色胺酸及/或苯基。在一些實施例中，化學修飾的核苷酸為硫代磷酸酯、2'-O-甲基、2'去氧、疏水性修飾及硫代磷酸酯之組合。在一些實施例中，糖可經修飾且經修飾的糖可包括(但不限於)D-核糖、2'-O-烷基(包括2'-O-甲基及2'-0-乙基)，亦即2'-烷氧基、2'-胺

基、2'-S-烷基、2'-鹵基(包括2'-氟)、T-甲氧基乙氧基、2'-烯丙氧基(-$OCH_2CH=CH_2$)、2'-炔丙基、2'-丙基、乙炔基、乙烯基、丙烯基及氰基及其類似物。在一些實施例中，糖部分可為己醣且併入寡核苷酸中，如Augustyns等人，《核酸研究(*Nucl. Acids. Res.*)》 1992, 18, 4711，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1906】在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在其整個長度上為雙股，亦即在分子之任一端處無懸垂單股序列，亦即為鈍端。在一些實施例中，個別核酸分子可具有不同長度。換言之，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在其整個長度上不為雙股。舉例而言，當使用兩個分開的核酸分子時，分子中之一者，例如包含反義序列之第一分子可比與其雜交之第二分子更長(留下一部分之分子為單股)。在一些實施例中，當使用單核酸分子時，在任一端處之一部分之分子可保持單股。

【1907】在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸含有錯配及/或環或凸起，但在至少約70%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸在至少約80%之寡核苷酸長度上為雙股的。在其他實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在至少約90%-95%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股siRNA或sdRNA寡核苷酸在至少約96%-98%之寡核苷酸長度上為雙股的。在一些實施例中，本發明之雙股寡核苷酸含有至少或至多1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個錯配。

【1908】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸可例如藉由修飾3'或5'鍵聯而實質上保護其免受核酸酶的影響，如美國專利案第5,849,902號及WO 98/13526中所描述，其揭示內容以引用的方式併入本文中。舉例而言，寡核苷酸可藉由納入「阻斷基團」而具有抗性。如本文所用之術語「阻斷基團」係指可作為用於合成之保護基或偶合基團與寡核苷酸或核單體連接之取代基(例如除OH基團以外)(例如FITC、丙基(CH_2-CH_2-CH_3)、二醇(-0-CH_2-CH_2-O-)磷酸鹽($PO_3^{2"}$)、膦酸氫鹽或胺基亞磷酸酯)。「阻斷基團」亦可包括「末端阻斷基團」或「核酸外切酶阻斷基團」，其保護寡核苷酸之5'及3'端，其包括經修飾的核苷酸及非核苷酸核酸外切酶抗性結構。

【1909】在一些實施例中，siRNA或sdRNA內之至少一部分連續多核苷酸藉由取代基鍵聯，例如硫代磷酸酯鍵聯連接。

【1910】在一些實施例中，化學修飾可導致至少1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475或500%的細胞攝取siRNA或sdRNA增強。在一些實施例中，C或U殘基中之至少一者包括疏水性修

飾。在一些實施例中，複數個C及U含有疏水性修飾。在一些實施例中，至少10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%之C及U可含有疏水性修飾。在一些實施例中，所有C及U均含有疏水性修飾。

【1911】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子經由併入可質子化胺來呈現增強的胞內體釋放。在一些實施例中，將可質子化胺併入有義股中(在RISC裝載後被捨棄的分子部分中)。在一些實施例中，本發明之siRNA或sdRNA化合物包含不對稱化合物，該不對稱化合物包含雙螺旋區(有效RISC進入所需，10-15個鹼基長)及4-12個核苷酸長之單股區；具有13個核苷酸的雙螺旋。在一些實施例中，採用6個核苷酸的單股區。在一些實施例中，siRNA或sdRNA之單股區包含2-12個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯(稱為硫代磷酸酯修飾)。在一些實施例中，採用6-8個硫代磷酸酯核苷酸間鍵聯。在一些實施例中，本發明之siRNA或sdRNA化合物亦包括獨特的化學修飾模式，其提供穩定性且與RISC進入相容。舉例而言，嚮導股亦可藉由任何證實穩定性而不干擾RISC進入之化學修飾來修飾。在一些實施例中，嚮導股中之化學修飾模式包括大部分為2' F修飾且5'端經磷酸化之C及U核苷酸。

【1912】在一些實施例中，siRNA或sdRNA中至少30%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，siRNA或sdRNA中至少30%、31%、32%、33%、34%、35%、

36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之核苷酸為經修飾的。在一些實施例中，siRNA或sdRNA中100%之核苷酸為經修飾的。

【1913】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子具有極少雙股區。在一些實施例中，分子之雙股區介於8-15個核苷酸長範圍內。在一些實施例中，分子之雙股區為8、9、10、11、12、13、14或15個核苷酸長。在一些實施例中，雙股區為13個核苷酸長。嚮導股與乘客股之間可有100%互補性，或嚮導股與乘客股之間可存在一或多個錯配。在一些實施例中，在雙股分子之一端上，分子為鈍端或具有一個核苷酸之懸垂臂。分子之單股區在一些實施例中係介於4-12個核苷酸長。在一些實施例中，單股區可為4、5、6、7、8、9、10、11或12個核苷酸長。在一些實施例中，單鏈區亦可小於4個核苷酸或大於12個核苷酸長。在某些實施例中，單股區為6或7個核苷酸長。

【1914】在一些實施例中，siRNA或sdRNA分子具有增加的穩定性。在一些情況下，化學修飾的siRNA或sdRNA分子在培養基中之半衰期長於1、2、3、4、5、6、

7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或超過24小時，包括任何中間值。在一些實施例中，siRNA或sd-RNA在培養基中之半衰期超過12小時。

【1915】在一些實施例中，對siRNA或sdRNA進行最佳化以增加效能及/或減少毒性。在一些實施例中，嚮導股及/或乘客股之核苷酸長度及/或嚮導股及/或乘客股中硫代磷酸酯修飾之數目在一些態樣中可影響RNA分子之效能，而用2'-0-甲基(2'OMe)修飾置換2'-氟(2'F)修飾在一些態樣中可影響分子之毒性。在一些實施例中，預期減少分子之2'F含量將減少分子之毒性。在一些實施例中，RNA分子中硫代磷酸酯修飾之數目可影響攝取分子至細胞中，例如被動攝取分子至細胞中之效率。在一些實施例中，siRNA或sdRNA不具有2'F修飾，但其特徵在於細胞攝取與組織滲透方面之功效相等。

【1916】在一些實施例中，嚮導股之長度為大約18-19個核苷酸且具有大約2-14個磷酸酯修飾。舉例而言，嚮導股可含有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或超過14個經磷酸酯修飾之核苷酸。嚮導股可含有一或多個賦予增加的穩定性而不干擾RISC進入之修飾。磷酸酯修飾的核苷酸，諸如硫代磷酸酯修飾的核苷酸，可在3'端、5'端或遍佈於整個嚮導股中。在一些實施例中，嚮導股之3'端10個核苷酸含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個硫代磷酸酯修飾的核苷酸。嚮導股亦可含有2'F及/或

2'OMe修飾，其可位於整個分子中。在一些實施例中，鬱導股中位置一之核苷酸(鬱導股之最5'位置中之核苷酸)經2'OMe修飾及/或磷酸化。鬱導股內之C及U核苷酸可經2'F修飾。舉例而言，19個核苷酸之鬱導股之位置2-10(或不同長度之鬱導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'F修飾。鬱導股內之C及U核苷酸亦可經2'OMe修飾。舉例而言，19個核苷酸之鬱導股之位置11-18(或不同長度之鬱導股中之對應位置)中之C及U核苷酸可經2'OMe修飾。在一些實施例中，在鬱導股之最3'端處之核苷酸未經修飾。在某些實施例中，鬱導股內之大部分C及U經2'F修飾，且鬱導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，且鬱導股之5'端經磷酸化。在其他實施例中，位置1及位置11-18中之C或U經2'OMe修飾，鬱導股之5'端經磷酸化，且位置2-10中之C或U經2'F修飾。

【1917】自我可遞送RNAi技術提供一種直接用RNAi劑(無論是siRNA、sdRNA或是其他RNAi劑)轉染細胞而無需另外調配物或技術之方法。轉染難以轉染細胞株之能力、高活體內活性及使用簡單為該等組合物及方法之特徵，其相對於基於siRNA之傳統技術存在顯著的功能優勢，且因此在關於減少本發明之TIL中目標基因表現之方法之若干實施例中採用sdRNA方法。sdRNA方法允許直接遞送化學合成化合物至廣泛範圍之離體及活體內初代細胞及組織。在本文中本發明之一些實施例中描述之sdRNA可

購自美國馬薩諸塞州伍斯特之Advirna LLC。

【1918】siRNA及sdRNA可以疏水性修飾之siRNA-反義寡核苷酸雜交結構形式形成，且揭示於例如Byrne等人，《眼科藥理學治療雜誌(*J. Ocular Pharmacol. Therapeut.*)》，2013, *29*, 855-864中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1919】在一些實施例中，siRNA或sdRNA寡核苷酸可使用無菌電致孔遞送至本文所描述之TIL。在某些實施例中，方法包含無菌電致孔TIL群體以遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸。

【1920】在一些實施例中，寡核苷酸可與跨膜遞送系統組合遞送至細胞。在一些實施例中，此跨膜遞送系統包括脂質、病毒載體及其類似物。在一些實施例中，寡核苷酸劑為不需要任何遞送劑之自我遞送RNAi劑。在某些實施例中，方法包含使用跨膜遞送系統來遞送siRNA或sdRNA寡核苷酸至TIL群體。

【1921】使寡核苷酸及寡核苷酸組合物與本文所描述之TIL接觸(例如使其接觸，在本文中亦稱為投與或遞送至)且被攝入，包括經由TIL被動攝取。sdRNA可在以下時添加至如本文中所描述之TIL：在第一擴增期間(例如步驟B)、在第一擴增之後(例如在步驟C期間)、在第二擴增之前或期間(例如在步驟D之前或期間)、在步驟D之後且在步驟E中收集之前、在步驟F中收集期間或之後、在步驟F中最終調配及/或轉移至輸注袋之前或期間、以及在步驟F中

任何視情況選用之冷凍保存步驟之前。此外，siRNA或sdRNA可在自步驟F中任何冷凍保存步驟解凍之後添加。在一些實施例中，可將一或多個靶向如本文中所描述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及CBLB)之sdRNA，以選自由100 nM至20 mM、200 nM至10 mM、500 nm至1 mM、1 μM至100 μM及1 μM至100 μM組成之群之濃度，添加至包含TIL及其他藥劑之細胞培養基。在一些實施例中，可將一或多個靶向如本文中所描述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及CBLB)之sdRNA，以選自由以下組成之群之量添加至包含TIL及其他藥劑之細胞培養基：0.1 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、0.75 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.25 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、1.5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、2 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基、5 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基或10 μM siRNA或sdRNA/10,000個TIL/100 μL培養基。在一些實施例中，可將一或多個靶向如本文中所描述之基因(包括PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、CTLA-4、TIGIT、TET2及CBLB)之sdRNA，在預REP或REP階段期間一天兩次、一天一次、每兩天一次、每三天一次、每四天一次、每五天一次、每六天一次或每

七天一次添加至TIL培養物。

【1922】本發明之寡核苷酸組合物，包括sdRNA，可在擴增過程期間，例如藉由將高濃度sdRNA溶解於細胞培養基中及允許足夠時間發生被動攝取而與如本文中所描述之TIL接觸。在某些實施例中，本發明方法包含使TIL群體與如本文中所描述之寡核苷酸組合物接觸。在某些實施例中，方法包含將寡核苷酸，例如sdRNA，溶解於細胞培養基中，且使細胞培養基與TIL群體接觸。TIL可為如本文中所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

【1923】在一些實施例中，遞送寡核苷酸至細胞中可藉由合適的本領域公認方法增強，包括磷酸鈣、DMSO、甘油或聚葡萄糖、電致孔或藉由轉染，例如使用陽離子、陰離子或中性脂質組合物或脂質體，使用此項技術中已知的方法，諸如描述於以下之彼等方法：美國專利案第4,897,355號；第5,459,127號；第5,631,237號；第5,955,365號；第5,976,567號；第10,087,464號；及第10,155,945號；及Bergan等人，《核酸評述(*Nucl. Acids Res.*)》 1993, 21, 3567，其揭示內容各自以引用的方式併入本文中。

【1924】在一些實施例中，使用超過一種siRNA或sdRNA來減少目標基因表現。在一些實施例中，靶向siRNA或sdRNA之PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2及/或CISH中之一或多者一起使用。在一些實施例中，PD-1 siRNA或sdRNA與TIM-3、CBLB、

LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2及/或CISH中之一或多者一起使用，以減少超過一種基因目標之表現。在一些實施例中，LAG3 siRNA或sdRNA與靶向siRNA或sdRNA之CISH組合使用，以減少兩種目標之基因表現。在一些實施例中，本文中靶向PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2及/或CISH中之一或多者之siRNA或sdRNA可購自美國馬薩諸塞州伍斯特的Advirna LLC。

【1925】在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群之基因：PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且另一種siRNA或sdRNA靶向選自由以下組成之群之基因：LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFβR2、PKA、CBLB、BAFF(BR3)及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自以下之基因：PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2 及其組合。在一些實施例中，siRNA或sdRNA靶向選自PD-1及以下中之一者之基因：LAG3、CISH、CBLB、TIM3及其組合。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA

靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向PD-1，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向LAG3，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在

一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CISH，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向TIM3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CBLB，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向PD-1。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向LAG3。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CISH。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CBLB。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIM3，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4，且一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向CTLA-4，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。在一些實施例中，一種siRNA或sdRNA靶向TIGIT，且一種siRNA或sdRNA靶向TET2。

【1926】如上文所論述，本發明之實施例提供已經由基因編輯進行基因修飾以增強其治療作用之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。本發明之實施例涵蓋經由核苷酸插入(RNA或DNA)TIL群體中進行之基因編輯，以促進一或多種蛋白質之表現及抑制一或多種蛋白質之表現以及其組合本發明之實施例亦提供用於將TIL擴增為治療性群體之方法，其中該等方法包含基因編輯TIL。存在若干種可用於基因修飾TIL群體之基因編輯技術，該等基因編輯技術適合於根據本發明使用。此類方法包括下文所描述之方法以及本文別處所描述之病毒及轉座子方法。在一些實施例中，基因修飾TIL、MIL或PBL以表達CCR的方法亦可包括經由穩定基因剔除此類基因或暫時基因減弱此類基因來抑制基因表現的修飾。

【1927】在一些實施例中，方法包含基因修飾TIL群體之方法，該TIL群體未如本文中所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括穩定併入用於產生或抑制(例如緘默)一或多種蛋白質之基因之步驟。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括電致孔之步驟。電致孔方法為此項技術中已知的，且描述於例如以下中：Tsong, 《生物物理學雜誌》1991, *60*, 297-306及美國專利申請公開案第2014/0227237 A1號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。可使用此項技術中已知之其他電致孔方法，諸如以下中描述之彼等電致孔方法：美國專利案第5,019,034

號、第5,128,257號、第5,137,817號、第5,173,158號、第5,232,856號、第5,273,525號、第5,304,120號、第5,318,514號、第6,010,613號及第6,078,490號，其揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，電致孔方法為無菌電致孔方法。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列

至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以改變、操縱或引起TIL中之限定及受控制的永久性或暫時性變化之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個單一、操作者控制之獨立程式化的DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同。在一些實施例中，電致孔方法為脈衝電致孔方法，其包含用脈衝電場處理TIL以誘導TIL中孔形成之步驟，包含向TIL施加一系列至少三個DC電脈衝之步驟，場強度等於或大於100 V/cm，其中該一系列至少三個DC電脈衝具有一個、兩個或三個以下特徵：(1)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝振幅上彼此不同；(2)該至少三個脈衝中之至少兩者在脈衝寬度上彼此不同；及(3)第一組該至少三個脈衝中兩者的第一脈衝間隔與第二組該至少三個脈衝中兩者的第二脈衝間隔不同，使得所誘導的孔持續相對長的時段，及使得維持TIL之存活率。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括磷酸鈣轉染之步驟。磷酸鈣轉染方法(磷酸鈣DNA沈澱、細胞表面塗佈及內飲作用)為此項技術中已知的且描述於Graham及van der Eb,《病毒學》 1973, *52*, 456-467；Wigler等人,《美國國家科學院院刊》 1979, *76*, 1373-1376；及Chen及Okayarea,

《分子細胞生物學》1987, *7*, 2745-2752；及美國專利案第5,593,875號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括脂質體轉染之步驟。脂質體轉染方法，諸如採用陽離子脂質*N*-[1-(2,3-二油烯基氧基)丙基]-*n*,*n*,*n*-三甲基氯化銨(DOTMA)及二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)於過濾水中之1:1(w/w)脂質體調配物之方法為此項技術中已知的且描述於Rose等人，《生物技術》 1991, *10*, 520-525及Felgner等人，《美國國家科學院院刊》, 1987, *84*, 7413-7417以及美國專利案第5,279,833號、第5,908,635號、第6,056,938號、第6,110,490號、第6,534,484號及第7,687,070號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，基因修飾TIL群體之方法包括使用以下中描述之方法進行轉染之步驟：美國專利案第5,766,902號、第6,025,337號、第6,410,517號、第6,475,994號及第7,189,705號，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。TIL可為如本文中所描述之第一TIL群體、第二TIL群體及/或第三TIL群體。

【1928】根據一實施例，基因編輯方法可包含使用介導在一或多個免疫檢查點基因處產生雙股或單股斷裂之可程式化核酸酶。此類可程式化核酸酶藉由在特定基因體基因座處引入斷裂而能夠進行精確基因體編輯，亦即其依賴於識別基因體內之特定DNA序列以將核酸酶域靶向此位置且介導在目標序列處產生雙股斷裂。DNA中之雙股斷裂隨後將內源性修復機制募集至斷裂位點，以藉由非同源末端

連接(NHEJ)或同源定向修復(HDR)來介導基因體編輯。因此，斷裂之修復可導致引入擾亂(例如緘默、抑制或增強)目標基因產物之插入/缺失突變。

【1929】經開發而使得能夠進行位點特異性基因體編輯之核酸酶之主要類別包括鋅指核酸酶(zinc finger nuclease；ZFN)、轉錄活化因子樣核酸酶(transcription activator-like nucleases；TALEN)及CRISPR相關核酸酶(例如CRISPR/Cas9)。此等核酸酶系統可基於其DNA識別模式而大致分類為兩類：ZFN及TALEN經由蛋白質-DNA相互作用達成特定DNA結合，而CRISPR系統，諸如Cas9，藉由與目標DNA直接鹼基配對之短RNA引導分子及藉由蛋白質-DNA相互作用而靶向特定DNA序列。參見例如Cox等人，《自然醫學(*Nature Medicine*)》，2015，第21卷，第2期。

【1930】可根據本發明之TIL擴增方法使用之基因編輯方法之非限制性實例包括CRISPR方法、TALE方法及ZFN方法，該等方法在下文更詳細地描述。根據一個實施例，將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如，Gen 2)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利案第10,925,900號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由CRISPR方法、TALE方法或ZFN方法中之一或多者基因編輯至少一部分TIL，以產生可提供增強之治療作用的TIL。

根據一實施例，可藉由活體外比較基因編輯的TIL與未經修飾的TIL，例如藉由評估相較於未經修飾的TIL之活體外效應功能、細胞介素概況等，來評估基因編輯的TIL之改良的治療作用。在某些實施例中，方法包含使用CRISPR、TALE及/或ZFN方法來基因編輯TIL群體。

【1931】在本發明之一些實施例中，使用電致孔來遞送基因編輯系統，諸如CRISPR、TALEN及ZFN系統。在本發明之一些實施例中，電致孔系統為流式電致孔系統。適用於本發明之一些實施例之合適的流式電致孔系統之實例為市售MaxCyte STX系統。有若干種可能適用於本發明之替代性市售電致孔儀器，諸如可獲自BTX-Harvard Apparatus之AgilePulse系統或ECM 830、Cellaxess Elektra(Cellectricon)、Nucleofector(龍沙(Lonza)/Amaxa)、GenePulser MXcell(伯樂(BIORAD)、iPorator-96(Primax)或siPORTer96(Ambion)。在本發明之一些實施例中，電致孔系統與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。在本發明之一些實施例中，電致孔系統為如本文中所描述之脈衝電致孔系統，且與TIL擴增方法之其餘部分一起形成密閉無菌系統。

【1932】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如，Gen 2)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利案第10,925,900號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述進行，其中該

方法進一步包含藉由CRISPR方法(例如，CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1)基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現緘默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用CRISPR方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1933】CRISPR代表成簇規律間隔短回文重複序列。使用CRISPR系統進行基因編輯之方法在本文中亦稱為CRISPR方法。有三種類型之併入RNA及Cas蛋白且可根據本發明使用之CRISPR系統：I、II及III型。II型CRISPR(藉由Cas9例示)為最充分表徵之系統之一。

【1934】CRISPR技術係改編自細菌及古菌(單細胞微生物之域)之天然防禦機制。此等生物體使用CRISPR衍生之RNA及各種Cas蛋白(包括Cas9)，藉由切碎及破壞外來入侵者之DNA來阻止病毒及其他外來體的攻擊。CRISPR為具有兩個獨特特徵之DNA特化區：存在核苷酸重複序列及間隔子。核苷酸之重複序列分佈在整個CRISPR區中，其中短外來DNA區段(間隔子)穿插在重複序列中。在II型CRISPR/Cas系統中，間隔子整合於CRISPR基因體基因座內且轉錄並加工成短CRISPR RNA(crRNA)。此等crRNA退火成反式活化crRNA(tracrRNA)，且引導Cas蛋白進行序列特異性裂解及緘默病原性DNA。Cas9蛋白進行之目標識別需要crRNA內之「種子」序列及crRNA結合區上游之含有

二核苷酸的保守原間隔序列相鄰模體(PAM)序列。藉此CRISPR/Cas系統可藉由重新設計crRNA而重新靶向以裂解幾乎任何DNA序列。原生系統中之crRNA及tracrRNA可簡化為大約100個核苷酸之單引導RNA(sgRNA)以用於基因工程改造。CRISPR/Cas系統藉由共同遞送表現Cas9核酸內切酶及必需crRNA組分之質體可直接攜帶入人類細胞。可使用不同的Cas蛋白變異體來減少靶向限制(例如Cas9之異種同源物，諸如Cpf1)。

【1935】可藉由經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而緘默或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1936】可藉由經由CRISPR方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、IL-18及

IL-21。

【1937】用於藉由CRISPR方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利案第8,697,359號、第8,993,233號、第8,795,965號、第8,771,945號、第8,889,356號、第8,865,406號、第8,999,641號、第8,945,839號、第8,932,814號、第8,871,445號、第8,906,616號及第8,895,308號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。用於進行CRISPR方法之資源，諸如用於表現CRISPR/Cas9及CRISPR/Cpf1之質體，可購自公司，諸如金斯瑞(GenScript)。

【1938】在一些實施例中，基因修飾如本文中所描述之TIL群體可使用如美國專利案第US 9790490號中所描述之CRISPR/Cpf1系統進行，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1939】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法(例如，Gen 2)之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利案第10,925,900號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由TALE方法基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現緘默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用

TALE方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1940】TALE代表轉錄活化因子樣效應蛋白，其包括轉錄活化子樣效應核酸酶(TALEN)。使用TALE系統來基因編輯之方法在本文中亦稱為TALE方法。TALE為來自植物病原細菌黃單孢菌屬(*Xanthomonas*)之天然存在蛋白質，且含有由一系列各自識別單鹼基對之33-35個胺基酸之重複域構成之DNA結合域。TALE特異性係藉由被稱為重複可變二殘基(repeat-variable di-residue；RVD)之兩個高變胺基酸判定。模組化TALE重複序列連接在一起以識別連續DNA序列。DNA結合域中之特異性RVD識別目標基因座中之鹼基，從而提供結構特徵以組裝可預測的DNA結合域。將TALE之DNA結合域與IIS型FokI核酸內切酶之催化域融合，以製備可靶向的TALE核酸酶。為了誘導位點特異性突變，由14-20個鹼基對間隔區域分開之兩個個別TALEN臂將FokI單體拉近以二聚合及產生靶向的雙股斷裂。

【1941】若干個利用各種組裝方法之大的系統性研究指示，可併入TALE重複序列以識別幾乎任何使用者定義的序列。定製設計的TALE陣列亦由Cellectis Bioresearch(法國巴黎)、Transposagen Biopharmaceuticals(美國肯塔基州列克星敦(Lexington, KY, USA))及Life Technologies(美國紐約州格蘭德島(Grand Island, NY, USA))市售。適用於本發明之TALE及TALEN方法描述於

美國專利申請公開案第US 2011/0201118 A1號、第US 2013/0117869 A1號、第US 2013/0315884 A1號、第US 2015/0203871 A1號及第US 2016/0120906 A1號中，其揭示內容各自以引用之方式併入本文中。

【1942】可藉由經由TALE方法永久性基因編輯TIL而緘默或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1943】可藉由經由TALE方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、IL-18及IL-21。

【1944】用於藉由TALE方法來改變目標基因序列之表現及可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利案第8,586,526號中，其以引用之方

式併入本文中。

【1945】用於將TIL擴增成治療性群體之方法可根據本文中所描述之方法之任何實施例或如美國專利申請公開案第US 2020/0299644 A1號及第US 2020/0121719 A1號以及美國專利案第10,925,900號(其揭示內容以引用之方式併入本文中)中所描述進行，其中該方法進一步包含藉由鋅指或鋅指核酸酶方法基因編輯至少一部分TIL。根據特定實施例，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現緘默或減少。替代地，在TIL擴增過程期間使用鋅指方法引起至少一部分之治療性TIL群體中一或多種免疫檢查點基因之表現增強。

【1946】呈保守ββα組態之個別鋅指含有大約30個胺基酸。α-螺旋表面上之幾個胺基酸通常以不同的選擇性水準接觸DNA主溝槽中的3 bp。鋅指具有兩個蛋白域。第一域為DNA結合域，其包括真核轉錄因子且含有鋅指。第二域為核酸酶域，其包括FokI限制酶且負責催化裂解DNA。

【1947】個別ZFN之DNA結合域通常含有介於三個與六個之間的個別鋅指重複且各自可識別介於9個與18個之間的鹼基對。若鋅指域對其預期目標位點具有特異性，則甚至一對識別總共18個鹼基對之3指ZFN理論上可靶向哺乳動物基因體中之單個基因座。一個產生新的鋅指陣列之方法為組合具有已知特異性之較小鋅指「模組」。最常見的模組組裝過程涉及組合三個分開的可各自識別3個鹼基

對DNA序列之鋅指，以產生可識別9個鹼基對目標位點之3指陣列。替代地，可使用基於選擇之方法，諸如寡聚池工程改造(oligomerized pool engineering；OPEN)，來自隨機分組文庫選擇新的鋅指陣列，該等隨機分組文庫考慮介於鄰近指之間的上下文依賴性相互作用(context-dependent interaction)。工程改造之鋅指可從Sangamo Biosciences(美國加利福尼亞州裡奇蒙)及Sigma-Aldrich(美國密蘇裡州聖路易斯)購得。

【1948】可藉由經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而緘默或抑制之基因之非限制性實例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【1949】可藉由經由鋅指方法永久性基因編輯TIL而增強之基因之非限制性實例包括CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、IL-18及IL-21。

【1950】用於藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於美國專利案第6,534,261號、第6,607,882號、第6,746,838號、第6,794,136號、第6,824,978號、第6,866,997號、第6,933,113號、第6,979,539號、第7,013,219號、第7,030,215號、第7,220,719號、第7,241,573號、第7,241,574號、第7,585,849號、第7,595,376號、第6,903,185號及第6,479,626號中，其各自以引用之方式併入本文中。

【1951】用於藉由鋅指方法來改變目標基因序列之表現且可根據本發明之其他實施例使用之系統、方法及組合物之實例描述於Beane等人，《分子療法》，2015, *23*, 1380-1390中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【1952】在一些實施例中，TIL視情況經基因工程改造以包括其他功能性，該等功能性包括(但不限於)高親和力TCR，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(CAR)。在某些實施例中，方法包含基因工程改造TIL群體以包括高親和力TCR，例如靶向腫瘤相關抗原(諸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)處之TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子(例如間皮素)或譜系限制細胞表面分子(例如CD19)結合的嵌合抗原受體(CAR)。適當地，TIL群體可為如本文中所描述之第一群體、第二群體及/或第三群體。

D. 用於TIL製造之密閉系統

【1953】本發明提供在TIL培養過程期間使用密閉系統。此類密閉系統允許預防及/或減少微生物污染、允許使用較少培養瓶且允許成本降低。在一些實施例中，密閉系統使用兩個容器。

【1954】此類密閉系統為此項技術中熟知的且可見於例如http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm及https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm處。

【1955】無菌連接裝置(Sterile connecting device；STCD)在兩件相容性管之間產生無菌熔接部分(weld)。此程序允許無菌連接多個容器及管直徑。在一些實施例中，密閉系統包括如實例中所描述之魯爾鎖(luer lock)及熱封系統。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由注射器進入以維持系統之無菌性及密閉性質。在一些實施例中，採用如實例中所描述之密閉系統。在一些實施例中，根據本文實例中所描述之方法，將TIL調配至最終產物調配容器中。

【1956】在一些實施例中，自獲得腫瘤片段之時間至準備向患者投與TIL或冷凍保存為止，密閉系統使用一個容器。在一些實施例中，當使用兩個容器時，第一容器為密閉G容器，且在不開放第一密閉G容器之情況下離心TIL群體且將其轉移至輸注袋。在一些實施例中，當使用兩個

容器時，輸注袋為含有HypoThermosol之輸注袋。密閉系統或密閉TIL細胞培養系統之特徵在於，一旦已添加腫瘤樣品及/或腫瘤片段，則系統自外部緊密密封以形成密閉環境，不受細菌、真菌及/或任何其他微生物污染入侵。

【1957】在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約100%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約95%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約5%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約10%與約90%之間。在一些實施例中，微生物污染減少介於約15%與約85%之間。在一些實施例中，微生物污染減少為約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%或約100%。

【1958】密閉系統允許TIL在不存在微生物污染下及/或在微生物污染顯著減少下生長。

【1959】此外，TIL細胞培養環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓各自隨細胞培養而變化。因此，即使適合於細胞培養之培養基經循環，但密閉環境仍需要不斷地維持為TIL增殖之最佳環境。為了此目的，合乎需要的是，藉助於感測器監測密閉環境之培養液內之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之物理因素，其訊號用於控制安設在培養環境之入口處的氣體交換器，及根據培養液中之變化實時調整密閉環境之氣體分壓以便最佳化細胞培養環境。在一些實

施例中，本發明提供密閉細胞培養系統，其在至密閉環境之入口處併入配備有量測密閉環境之pH、二氧化碳分壓及氧氣分壓之監測裝置的氣體交換器，且藉由基於來自監測裝置之訊號自動調整氣體濃度來最佳化細胞培養環境。

【1960】在一些實施例中，連續地或間歇地控制密閉環境內之壓力。即，密閉環境中之壓力可藉助於例如壓力維持裝置來改變，從而確保空間在正壓力狀態下適合於TIL生長或促進在負壓力狀態下滲出流體且因此促進細胞增殖。此外，藉由間歇性地施加負壓力，有可能藉助於暫時性縮小密閉環境之容積而均勻且有效地置換密閉環境中之循環液體。

【1961】在一些實施例中，可替換或添加TIL增殖之最佳培養物組分，且可添加包括諸如IL-2及/或OKT3以及組合之因子。

E. 視情況選用之TIL之冷凍保存

【1962】可視情況將主體TIL群體(例如第二TIL群體)或經擴增之TIL群體(例如第三TIL群體)冷凍保存。在一些實施例中，對治療性TIL群體進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存發生於在第二擴增後收集之TIL。在一些實施例中，對圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之例示性步驟F中在TIL進行冷凍保存。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於輸注袋中。在一些實施例中，TIL係在置於輸注袋中之前冷凍保存。在一些實施例中，

冷凍保存TIL且不將其置於輸注袋中。在一些實施例中，使用冷凍保存培養基進行冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存培養基含有二甲亞碸(DMSO)。此一般藉由將TIL群體置放於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報(Acta Oncologica)》 2013, 52, 978-986。

【1963】在適當時，自冷凍器取出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如此項技術中已知的來評估存活率。

【1964】在一些實施例中，TIL群體係使用CS10冷凍保存培養基(CryoStor 10，BioLife Solutions)冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用含有二甲亞碸(DMSO)之冷凍保存培養基冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基冷凍保存。在一些實施例中，TIL群體係使用約1:1(vol:vol)比率之CS10與細胞培養基(進一步包含另外IL-2)冷凍保存。

【1965】如上文所論述且如圖1及/或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中提供之步驟A至E中所例示，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的多個點。在一些實施例中，在第一擴增之後(如例如根據步驟B所提供)經擴增之TIL群體或在根據圖1或圖8(尤其例如圖8A及/

或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D的一或多個第二擴增之後的經擴增之TIL群體可進行冷凍保存。冷凍保存一般可藉由將TIL群體置放於冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞碸(DMSO))中來完成。將溶液中之細胞置放於低溫小瓶中且儲存在-80℃ 24小時，其中視情況轉移至氣態氮冷凍器用於冷凍保存。參見Sadeghi等人，《腫瘤學報(*Acta Oncologica*)》 **2013**, *52*, 978-986。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係冷凍保存於細胞培養基加5% DMSO中。在一些實施例中，TIL係根據實例6中提供之方法冷凍保存。

【1966】在適當時，自冷凍器移出細胞且在37℃水浴中解凍直至大約4/5之溶液解凍。一般將細胞再懸浮於完全培養基中且視情況洗滌一或多次。在一些實施例中，可計算解凍的TIL且如此項技術中已知的來評估存活率。

【1967】在某些情況下，圖1或圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B的TIL群體可使用下文論述之方案立即冷凍保存。或者，主體TIL群體可經歷來自圖1或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟C及步驟D，且接著在圖1或圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D之後進行冷凍保存。類似地，在其中基因修飾TIL將用於療法中之情況下，來自圖1或圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B或步驟D的TIL群體可進行基因修飾以用於合適的治療。

F. 經擴增之TIL之表現型特徵

【1968】在一些實施例中，分析TIL在擴增後之多種表現型標記物之表現，該等標記物包括本文及實例中所描述之彼等者。在一些實施例中，檢查一或多種表現型標記物之表現。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟B中的第一擴增之後分析TIL的表現型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟C中的轉變期間分析TIL的表現型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟C中的轉變期間且在冷凍保存之後分析TIL的表現型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中的第二擴增之後分析TIL的表現型特徵。在一些實施例中，在來自圖1或圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)之步驟D中的兩次或更多次擴增之後分析TIL的表現型特徵。

【1969】在一些實施例中，標記物係選自由CD8及CD28組成之群。在一些實施例中，檢查CD8之表現。在一些實施例中，檢查CD28之表現。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8及/或CD28的

表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(尤其例如圖8B)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD8的表現更高。在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(尤其例如圖8A)中提供之2A過程，根據本發明過程產生之TIL上之CD28的表現更高。在一些實施例中，高CD28表現指示較年輕更持久的TIL表現型。在一些實施例中，量測一或多種調節標記物之表現。

【1970】在一些實施例中，在用於擴增本文所描述之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之方法之任一步驟期間，未基於CD8及/或CD28表現選擇第一TIL群體、第二TIL群體、第三TIL群體或所收集TIL群體。

【1971】在一些實施例中，相較於其他過程(例如如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中提供之Gen 3過程)，相較於如例如圖8(尤其例如圖8A)中提供之2A過程，根據本發明之方法產生之TIL之中樞記憶細胞的百分比更高。在一些實施例中，中樞記憶細胞之記憶標記物係選自由CCR7及CD62L組成之群。

【1972】在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL記憶子集可分為不同記憶子集。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含初始(CD45RA+CD62L+)TIL。在一些實施例

中，CD4+及/或CD8+ TIL包含中樞記憶(central memory，CM；CD45RA-CD62L+)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含效應記憶(effector memory，EM；CD45RA-CD62L-)TIL。在一些實施例中，CD4+及/或CD8+ TIL包含RA+效應記憶/效應(TEMRA/TEFF；CD45RA+CD62L+)TIL。

【1973】在一些實施例中，TIL表現一或多種選自由以下組成之群之標記物：顆粒酶B、穿孔蛋白及顆粒溶解素。在一些實施例中，TIL表現顆粒酶B。在一些實施例中，TIL表現穿孔蛋白。在一些實施例中，TIL表現顆粒溶解素。

【1974】在一些實施例中，亦可使用細胞介素釋放分析，評估再刺激的TIL之細胞介素釋放。在一些實施例中，可評估TIL之干擾素-γ(IFN-γ)分泌。在一些實施例中，IFN-γ分泌係藉由ELISA分析量測。在一些實施例中，在快速第二擴增步驟之後，在如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之步驟D之後，藉由ELISA分析法量測IFN-γ分泌。在一些實施例中，TIL健康係藉由IFN-γ(IFN-γ)分泌量測。在一些實施例中，IFN-γ分泌指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。IFN-γ產生可藉由測定經抗CD3、CD28及CD137/4-1BB之抗體刺激之TIL培養基中之細胞介素IFN-γ之含量量測。來自此等受刺激TIL之培養基中之IFN-γ含量可藉由量測IFN-

γ釋放測定。在一些實施例中，例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所提供之Gen 3過程中之步驟D相較於例如圖8(尤其例如圖8A)中所提供之2A過程中之步驟D之IFN-γ產生增加，指示步驟D TIL之細胞毒性潛力增加。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，IFN-γ之分泌增加三倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測離體TIL中之IFN-γ，包括藉由本發明之方法(包括例如圖8B方法)產生之TIL。

【1975】在一些實施例中，能夠分泌至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於一倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於兩倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於三倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些

實施例中，能夠分泌至少多於四倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少多於五倍之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1976】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/mL至約1000 pg/mL或更多之IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，在能夠分泌至少200 pg/mL、至少250 pg/mL、至少300 pg/mL、至少350 pg/mL、至少400 pg/mL、至少450 pg/mL、至少500 pg/mL、至少550 pg/mL、至少600 pg/mL、至少650 pg/mL、至少700 pg/mL、至少750 pg/mL、至少800 pg/mL、至少850 pg/mL、至少900 pg/mL、至少950 pg/mL或至少1000 pg/mL或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能

夠分泌至少400 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少800 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法

(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D

方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/mL IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1977】在一些實施例中，能夠分泌至少100 pg/mL/5e5個細胞至約1000 pg/mL/5e5個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞、至少250 pg/mL/5e5個細胞、至少300 pg/mL/5e5個細胞、至少350 pg/mL/5e5個細胞、至少400 pg/mL/5e5個細胞、至少450 pg/mL/5e5個細胞、至少500 pg/mL/5e5個細胞、至少550 pg/mL/5e5個細胞、至少600 pg/mL/5e5個細胞、至少650 pg/mL/5e5個細胞、至少700 pg/mL/5e5個細胞、至少750 pg/mL/5e5

個細胞、至少800 pg/mL/5e5個細胞、至少850 pg/mL/5e5個細胞、至少900 pg/mL/5e5個細胞、至少950 pg/mL/5e5個細胞或至少1000 pg/mL/5e5個細胞或更多IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少300 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少400 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少600 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少700 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施

例中，能夠分泌至少800 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少900 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖

8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少10,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少15,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少20,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少25,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少30,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少35,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少40,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之

TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少45,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少50,000 pg/mL/5e5個細胞IFN-γ之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1978】T及B淋巴球之多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段之體細胞重組產生。此等基因區段：V(可變區)、D(多樣區)、J(聯結區)及C(恆定區)決定免疫球蛋白及T細胞受體(TCR)之結合特異性及下游應用。本發明提供一種用於產生展現且增加T細胞貯庫多樣性之TIL的方法。在一些實施例中，藉由本發明方法獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用除本文中提供之方法以外之其他方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性，該等其他方法包括例如除圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中實施之方法以外的方法。在一些實施例中，相較於新鮮收集的TIL及/或使用如圖8(尤其例如圖8A)中例示之稱為Gen 2之方法製備的TIL，藉由本發明方法獲得的TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，在第一擴增中獲得之TIL展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，增加多樣性係增加免疫

球蛋白多樣性及/或T細胞受體多樣性。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於免疫球蛋白中，存在於免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在於T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在於選自由α、β、γ及δ受體組成之群的T細胞受體中之一者中。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α及/或β之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)α之表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR)β之表現增加。在一些實施例中，TCRαβ(即，TCRα/β)之表現增加。在一些實施例中，如本文中所描述之過程(例如Gen 3過程)相較於其他過程(例如稱為Gen 2之過程)，基於樣品內獨特肽CDR之數目，展示更高的純系多樣性。

【1979】在一些實施例中，TIL之活化及耗減可藉由檢查一或多種標記物判定。在一些實施例中，活化及耗減可使用多色流動式細胞測量術判定。在一些實施例中，標記物之活化及耗減包括(但不限於)一或多種選自由以下組成之群之標記物：CD3、PD-1、2B4/CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194/CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103及/或LAG-3)。在一些實施例中，標記物之活化及耗減包括(但不限於)一或多種選自由以下組成之群之標記物：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、PD-1、TIGIT及/或TIM-3。在一些實施例中，標記物之活化及耗減包括(但不限

於)一或多種選自由以下組成之群之標記物：BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+/CD69+、CD103+/CD69-、PD-1、TIGIT及/或TIM-3。在一些實施例中，可判定及/或分析T細胞標記物(包括活化及耗減標記物)以檢查T細胞活化、抑制或功能。在一些實施例中，T細胞標記物可包括(但不限於)一或多種選自由以下組成之群之標記物：TIGIT、CD3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4及/或CD59。

【1980】在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL

或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL

顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL

顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL至300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL、高於5000 pg/10^6個TIL、高於7000 pg/10^6個TIL、高於9000 pg/10^6個TIL、高於11000 pg/10^6個TIL、高於13000 pg/10^6個TIL、

高於15000 pg/10^6個TIL、高於17000 pg/10^6個TIL、高於19000 pg/10^6個TIL、高於20000 pg/10^6個TIL、高於40000 pg/10^6個TIL、高於60000 pg/10^6個TIL、高於80000 pg/10^6個TIL、高於100000 pg/10^6個TIL、高於120000 pg/10^6個TIL、高於140000 pg/10^6個TIL、高於160000 pg/10^6個TIL、高於180000 pg/10^6個TIL、高於200000 pg/10^6個TIL、高於220000 pg/10^6個TIL、高於240000 pg/10^6個TIL、高於260000 pg/10^6個TIL、高於280000 pg/10^6個TIL、高於300000 pg/10^6個TIL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於3000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於5000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於7000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於9000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於11000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高

於13000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於15000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於17000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於19000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於20000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於40000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於60000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於80000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於100000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於

120000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於200000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於

300000 pg/10^6個TIL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。

【1981】在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/mL至300000 pg/mL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於1000 pg/mL、高於2000 pg/mL、高於3000 pg/mL、高於4000 pg/mL、高於5000 pg/mL、高於6000 pg/mL、高於7000 pg/mL、高於8000 pg/mL、高於9000 pg/mL、高於10000 pg/mL、高於20000 pg/mL、高於30000 pg/mL、高於40000 pg/mL、高於50000 pg/mL、高於60000 pg/mL、高於70000 pg/mL、高於80000 pg/mL、高於90000 pg/mL、高於100000 pg/mL或更多顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於1000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於2000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於3000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於4000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/

或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於5000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於6000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於7000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於8000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於9000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於10000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於20000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於30000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於40000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於50000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包

括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於60000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於70000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於80000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於90000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現高於100000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於120000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於140000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於160000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於180000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分

泌高於200000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於220000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於240000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於260000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於280000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。在一些實施例中，展現分泌高於300000 pg/mL顆粒酶B之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)產生之TIL。

【1982】在一些實施例中，本發明之擴增方法產生展現相較於非擴增TIL群體增加的活體外顆粒酶B分泌的擴增TIL群體，包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D中提供的TIL。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍至五十倍或更多。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，IFN-γ分泌增加至少一倍、至少兩倍、至少三倍、至少四倍、至少五倍、至少六倍、至少七倍、至少八倍、至少九倍、至少十倍、至少二十倍、至少三十倍、至少四十倍、至少五

十倍或更多。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少一倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少兩倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少六倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少七倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少八倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少九倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少二十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少三十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少四十倍。在一些實施例中，相較於非擴增TIL群體，本發明之擴增TIL群體之顆粒酶B分泌增加至少五十

倍。

【1983】在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌而分泌低至少一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多含量之TNF-α (亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌而分泌低至少一倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌而分泌低至少兩倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌而分泌低至少三倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌而分泌低至少四倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠相較於IFN-γ分泌而分泌低至少五倍含量之TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1984】在一些實施例中，能夠分泌至少200 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α(亦即，TNF-alpha)之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括

例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少500 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少1000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少2000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少3000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少4000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少5000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少6000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或

圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少7000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少8000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。在一些實施例中，能夠分泌至少9000 pg/mL/5e5個細胞至約10,000 pg/mL/5e5個細胞或更多TNF-α之TIL為藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL。

【1985】在一些實施例中，量測IFN-γ及顆粒酶B含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表現型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表現型特徵。在一些實施例中，量測顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表現型特徵。在一些實施例中，量測IFN-γ、顆粒酶B及TNF-α含量以判定藉由本發明之擴增方法(包括例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D方法)產生之TIL的表現型特徵。

【1986】在一些實施例中，表現型特徵係在冷凍保存之後檢查。

G. 另外過程實施例

【1987】在一些實施例中，本發明提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：(a)藉由將自個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得來源於自個體切除之腫瘤之第一TIL群體；(b)藉由在包含IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，其中啟始第一擴增進行約1至7天或約1至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約1至11天或約1至10天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；(d)收集自步驟(c)獲得之治療性TIL群體，及(e)在步驟(d)之前或之後的任何時間基因編輯至少一部分TIL細胞以在TIL細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天或約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-

500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天或約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天或約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(1)藉由在第一

容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天之時段。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【1988】在一些實施例中，本發明提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：(a)藉由將自個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得來源於自個體切除之腫瘤之第一TIL群體；(b)藉由在包含IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，其中啟始第一擴增進行約1至8天以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約1至8天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；(d)收集自步驟(c)獲得之治療性TIL群體，及(e)在步驟(d)之前或

之後的任何時間基因編輯至少一部分TIL細胞以在TIL細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至8天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小規模培養中培養約4至6天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、

5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至6天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至5天之時段。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【1989】在一些實施例中，本發明提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：(a)藉由將自個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得來源於自個體切除之腫瘤之第一TIL群體；(b)藉由在包含IL-2及OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，其中啟始第一擴增進行約1至7天以獲得第二

TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；(c)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及外源性抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約1至11天以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體；(d)收集自步驟(c)獲得之治療性TIL群體，及(e)在步驟(d)之前或之後的任何時間基因編輯至少一部分TIL細胞以在TIL細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養之規模縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自小規模培養之第二TIL群體轉移至比第一容器大的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，其中在第二容器中，來自小規模培養之第二TIL群體係在較大規模培養中培養約4至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養之第二TIL群體部分係在第二小

規模培養中培養約4至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天之時段。在一些實施例中，快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(1)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第二TIL群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(2)實現將來自第一小規模培養之第二TIL群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-g500MCS容器)中，其中在各第二容器中，自小規模培養轉移至此類第二容器之第二TIL群體部分係在較大規模培養中培養約5天之時段。在一些實施例中，至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【1990】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由使第一TIL群體與進一步包含外源性抗原呈現細胞(APC)之培養基接觸來進行，其中步驟(c)中培養基中之APC數目大於步驟(b)中培養基中之APC數目。

【1991】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，培養基補充有另外外源性APC。

【1992】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約20:1的範圍。

【1993】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約10:1的範圍。

【1994】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約9:1的範圍。

【1995】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約8:1的範圍。

【1996】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約7:1的範圍。

【1997】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約6:1的範圍。

【1998】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約5:1之範圍。

【1999】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約4:1的範圍。

【2000】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約3:1的範圍。

【2001】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【2002】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【2003】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【2004】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【2005】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【2006】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【2007】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【2008】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【2009】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【2010】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約1.1:1至剛好或大約2:1的範圍。

【2011】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約10:1的範圍。

【2012】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約5:1的範圍。

【2013】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約4:1的範圍。

【2014】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約3:1的範圍。

【2015】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.9:1的範圍。

【2016】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.8:1的範圍。

【2017】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.7:1的範圍。

【2018】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.6:1的範圍。

【2019】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.5:1的範圍。

【2020】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.4:1的範圍。

【2021】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.3:1的範圍。

【2022】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.2:1的範圍。

【2023】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率係選自剛好或大約2:1至剛好或大約2.1:1的範圍。

【2024】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約2:1。

【2025】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增中添加之APC數目與步驟(b)中添加之APC數目的比率為剛好或大約1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、

1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1或5:1。

【2026】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中啟始第一擴增中添加之APC數目為剛好或大約1×10^8、1.1×10^8、1.2×10^8、1.3×10^8、1.4×10^8、1.5×10^8、1.6×10^8、1.7×10^8、1.8×10^8、1.9×10^8、2×10^8、2.1×10^8、2.2×10^8、2.3×10^8、2.4×10^8、2.5×10^8、2.6×10^8、2.7×10^8、2.8×10^8、2.9×10^8、3×10^8、3.1×10^8、3.2×10^8、3.3×10^8、3.4×10^8或3.5×10^8個APC，且其中快速第二擴增中添加之APC數目為剛好或大約3.5×10^8、3.6×10^8、3.7×10^8、3.8×10^8、3.9×10^8、4×10^8、4.1×10^8、4.2×10^8、4.3×10^8、4.4×10^8、4.5×10^8、4.6×10^8、4.7×10^8、4.8×10^8、4.9×10^8、5×10^8、5.1×10^8、5.2×10^8、5.3×10^8、5.4×10^8、5.5×10^8、5.6×10^8、5.7×10^8、5.8×10^8、5.9×10^8、6×10^8、6.1×10^8、6.2×10^8、6.3×10^8、6.4×10^8、6.5×10^8、6.6×10^8、6.7×10^8、6.8×10^8、6.9×10^8、7×10^8、7.1×10^8、7.2×10^8、7.3×10^8、7.4×10^8、7.5×10^8、7.6×10^8、7.7×10^8、7.8×10^8、7.9×10^8、8×10^8、8.1×10^8、8.2×10^8、8.3×10^8、8.4×10^8、8.5×10^8、8.6×10^8、8.7×10^8、8.8×10^8、8.9×10^8、9×10^8、9.1×10^8、9.2×10^8、9.3×10^8、9.4×10^8、

9.5×10^8、9.6×10^8、9.7×10^8、9.8×10^8、9.9×10^8或1×10^9個APC。

【2027】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中啟始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約1×10^8個APC至剛好或大約3.5×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約3.5×10^8個APC至剛好或大約1×10^9個APC的範圍。

【2028】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中啟始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約1.5×10^8個APC至剛好或大約3×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約4×10^8個APC至剛好或大約7.5×10^8個APC的範圍。

【2029】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中啟始第一擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約2×10^8個APC至剛好或大約2.5×10^8個APC的範圍，且其中快速第二擴增中添加之APC數目係選自剛好或大約4.5×10^8個APC至剛好或大約5.5×10^8個APC的範圍。

【2030】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中剛好或大約2.5×10^8個APC係添加至啟始第一擴增，且剛好或大約5×10^8個APC係添加至快速第二擴增。

【2031】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【2032】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤片段係分佈至複數個分開的容器中，在各分開的容器中，第一TIL群體係在步驟(a)中獲得，第二TIL群體該步驟(b)中獲得，且第三TIL群體係在步驟(c)中獲得，且將來自步驟(c)中複數個容器之治療性TIL群體合併以產生來自步驟(d)之經收集的TIL群體。

【2033】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤均勻分佈至複數個分開的容器中。

【2034】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含至少兩個分開的容器。

【2035】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至二十個分開的容器。

【2036】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至十五個分開的容器。

【2037】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容

器包含兩個至十個分開的容器。

【2038】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含兩個至五個分開的容器。

【2039】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中複數個分開的容器包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個分開的容器。

【2040】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在各容器中對步驟(b)中之第一TIL群體進行啟始第一擴增，在同一容器中對由此類第一TIL群體產生之第二TIL群體進行步驟(c)中的快速第二擴增。

【2041】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中分開的容器中之各者包含第一透氣表面區域。

【2042】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個腫瘤片段分佈於單一容器中。

【2043】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中單一容器包含第一透氣表面區域。

【2044】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，

啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2045】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2046】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2047】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【2048】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2049】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2050】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2051】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【2052】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域的第二容器中進行。

【2053】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二容器大於第一容器。

【2054】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2055】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2056】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2057】在其他實施例中，本發明提供經修改之如適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【2058】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【2059】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【2060】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上。

【2061】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第二透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【2062】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域的第一容器中進行，且在步驟(c)中，快速第二擴增係在第一容器中進行。

【2063】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中在步驟(c)中添加之

APC數目大於在步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中，APC以剛好或大約一個細胞層至剛好或大約三個細胞層的平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2064】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約1.5個細胞層至剛好或大約2.5個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2065】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約2個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2066】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3個細胞層。

【2067】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3個細胞層至剛好或大約10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2068】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約4個細胞層至剛好或大約8個細胞層之平

均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2069】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約3、4、5、6、7、8、9或10個細胞層之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上。

【2070】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中，APC以剛好或大約以下之平均厚度層疊至第一透氣表面區域上：4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8個細胞層。

【2071】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:10的範圍。

【2072】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC

數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:9的範圍。

【2073】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:8的範圍。

【2074】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:7的範圍。

【2075】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:6的範圍。

【2076】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:5的範圍。

【2077】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:4的範圍。

【2078】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:3的範圍。

【2079】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第

一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1至剛好或大約1:2的範圍。

【2080】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.2至剛好或大約1:8的範圍。

【2081】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.3至剛好或大約1:7的範圍。

【2082】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的

比率係選自剛好或大約1:1.4至剛好或大約1:6的範圍。

【2083】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.5至剛好或大約1:5的範圍。

【2084】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.6至剛好或大約1:4的範圍。

【2085】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.7至剛好或大約1:3.5的範圍。

【2086】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，

啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.8至剛好或大約1:3的範圍。

【2087】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.9至剛好或大約1:2.5的範圍。

【2088】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:2的範圍。

【2089】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，啟始第一擴增係藉由用另外的抗原呈現細胞(APC)補充第一TIL群體之細胞培養基進行，其中步驟(c)中添加之APC數目大於步驟(b)中添加之APC數目，且其中步驟(b)中層

疊的APC之平均層數與步驟(c)中層疊的APC之平均層數的比率係選自剛好或大約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9或1:10。

【2090】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約1.5:1至剛好或大約100:1。

【2091】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約50:1。

【2092】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大

約25:1。

【2093】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約20:1。

【2094】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體中之TIL數目與第一TIL群體中之TIL數目的比率為剛好或大約10:1。

【2095】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體高至少剛好或大約50倍。

【2096】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第二TIL群體在數目上比第一TIL群體高至少剛好或大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50倍。

【2097】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中之第二時段開始後剛好或大約2天或剛好或大約3天，對細胞培養基補充另外的IL-2。

【2098】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，進一步包含使用冷凍保存過程冷凍保存步驟(d)中之經收集的TIL群體的步驟。

【2099】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包含在步驟(d)後進行將來自步驟(d)之經收集的TIL群體轉移至視情況含有HypoThermosol之輸注袋的另外步驟(e)。

【2100】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，包含使用冷凍保存過程冷凍保存包含步驟(e)中之經收集之TIL群體的輸注袋的步驟。

【2101】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用1:1比率之經收集之TIL群體與冷凍保存培養基來進行冷凍保存過程。

【2102】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【2103】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經照射且同種異體的。

【2104】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中添加至細胞培養物之APC總數為2.5×10^{8}個。

【2105】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(c)中添加至細胞培養物之APC總數為5×10^8個。

【2106】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中APC為PBMC。

【2107】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中PBMC為經照射且同種異體的。

【2108】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中抗原呈現細胞為人工抗原呈現細胞。

【2109】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用基於膜之細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【2110】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中使用LOVO細胞處理系統來進行步驟(d)中之收集。

【2111】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約5至剛好或大約60個片段。

【2112】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約10至剛好或大約60個片段。

【2113】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在

步驟(b)中每容器剛好或大約15至剛好或大約60個片段。

【2114】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約20至剛好或大約60個片段。

【2115】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約25至剛好或大約60個片段。

【2116】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約30至剛好或大約60個片段。

【2117】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約35至剛好或大約60個片段。

【2118】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約40至剛好或大約60個片段。

【2119】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約45至剛好或大約60個片段。

【2120】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在步驟(b)中每容器剛好或大約50至剛好或大約60個片段。

【2121】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含在

步驟(b)中每容器剛好或大約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60個片段。

【2122】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約27 mm^3之體積。

【2123】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約20 mm^3至剛好或大約50 mm^3之體積。

【2124】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約21 mm^3至剛好或大約30 mm^3之體積。

【2125】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約22 mm^3至剛好或大約29.5 mm^3之體積。

【2126】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約23 mm^3至剛好或大約29 mm^3之體積。

【2127】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約24 mm^3至剛好或大約28.5 mm^3之體積。

【2128】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約25 mm^3至剛好或大約28 mm^3之體積。

【2129】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約26.5 mm^3至剛好或大約27.5 mm^3之體積。

【2130】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中各片段具有剛好或大約以下之體積：21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50 mm^3。

【2131】在其他實施例中，本發明提供經修飾之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含剛好或約30至剛好或約60個片段，其中總體積係剛好或約1300 mm^3至剛好或約1500 mm^3。

【2132】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含剛好或大約50個片段，其中總體積為剛好或大約1350 mm^3。

【2133】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中多個片段包含剛好或大約50個片段，其中總質量為剛好或大約1公克至剛好或大約1.5公克。

【2134】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基係提

供於呈G容器或Xuri細胞袋之容器中。

【2135】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基中之IL-2濃度為約10,000 IU/mL至約5,000 IU/mL。

【2136】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中細胞培養基中之IL-2濃度為約6,000 IU/mL。

【2137】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包含二甲亞碸(DMSO)。

【2138】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中冷凍保存培養基包含7%至10% DMSO。

【2139】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【2140】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第二時段係於剛好或大約1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天或11天之時段內進行。

【2141】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約1

天、2天、3天、4天、5天、6天或7天之時段內進行。

【2142】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約5天、6天或7天之時段內進行。

【2143】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(b)中之第一時段及步驟(c)中之第二時段各自分別係於剛好或大約7天之時段內進行。

【2144】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約18天中進行。

【2145】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約18天中進行。

【2146】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約18天中進行。

【2147】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天至剛好或大約18天中進行。

【2148】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約17天中進行。

【2149】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約17天中進行。

【2150】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天至剛好或大約17天中進行。

【2151】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天至剛好或大約16天中進行。

【2152】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天至剛好或大約16天中進行。

【2153】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天中進行。

【2154】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天中進行。

【2155】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天中進行。

【2156】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約17天中進行。

【2157】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天中進行。

【2158】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約14天或更短中進行。

【2159】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約15天或更短中進行。

【2160】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約16天或更短中進行。

【2161】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)至(d)係於總共剛好或大約18天或更短中進行。

【2162】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(d)中收集之治療性TIL群體包含足以用於TIL之治療有效劑量的TIL。

【2163】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中足以用於治療有效劑量之TIL數為剛好或大約2.3×10^{10}個至剛好或大約13.7×10^{10}個。

【2164】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(c)中之第三TIL群體提供增加的功效、增加的干擾素-γ產生及/或增加的多株性。

【2165】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於16天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【2166】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於17天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【2167】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相較於藉由長於18天之過程來製備的TIL，步驟(c)中之第三TIL群體提供至少一倍至五倍或更多的干擾素-γ產生。

【2168】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中相對於獲自步驟(b)第二細胞群體之效應T細胞及/或中樞記憶T細胞，獲自步驟(c)第三TIL群體之效應T細胞及/或中樞記憶T細胞展現增加的CD8及CD28表現。

【2169】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為密閉容器。

【2170】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為G容器。

【2171】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-10。

【2172】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-100。

【2173】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中引述之各容器為GREX-500。

【2174】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中至少一種免疫調節組合物包含與選自由以下組成之群的免疫調節劑融合之膜錨：IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IL-4、IL-1α、IL-1β、IL-5、IFNγ、TNFα(TNFa)、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)及其生物活性變異體。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑。在一些

實施例中，免疫調節劑為IL-12。在一些實施例中，免疫調節劑為IL-15。在一些實施例中，免疫調節劑為IL-18。在一些實施例中，免疫調節劑為IL-21。在一些實施例中，免疫調節劑為CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【2175】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中基因編輯器為暫時基因編輯器，其中暫時基因編輯TIL以暫時表現至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，免疫調節組合物包含免疫調節融合蛋白質。在一些實施例中，免疫調節融合蛋白質包含與免疫調節劑融合之膜錨。在一些實施例中，免疫調節劑為細胞介素。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。在一些實施例中，細胞介素為IL-12。在一些實施例中，細胞介素為IL-15。在一些實施例中，細胞介素為IL-18。在一些實施例中，細胞介素為IL-21。在一些實施例中，免疫調節劑為CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【2176】在其他實施例中，本發明提供藉由如上適用之任何前述段落中描述之方法製備的治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體。

【2177】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由在不添加任何抗原呈現細胞(APC)或OKT3之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2178】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由在不添加任何抗原呈現細胞(APC)之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2179】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由在不添加任何OKT3之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2180】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由在不添加抗原呈現細胞(APC)且不添加

OKT3之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2181】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由過程長度超過16天之過程製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2182】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由過程長度超過17天之過程製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2183】在其他實施例中，本發明提供由患者之腫瘤組織製備之治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中治療性TIL群體與藉由過程長度超過18天之過程製備之TIL相比提供增加之功效、增加之干擾素-γ產生及/或增加之多株性，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。

【2184】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提

供增加的干擾素-γ產生。

【2185】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的多株性。

【2186】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，該治療性TIL群體提供增加的功效。

【2187】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【2188】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠

產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【2189】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於16天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於17天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之治療性TIL群體，其中相較於藉由長於18天之過程製備的TIL，該治療性TIL群體能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)

中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【2190】在其他實施例中，本發明提供治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其與藉由在不添加任何抗原呈現細胞(APC)之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【2191】在其他實施例中，本發明提供治療性腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其與藉由在不添加任何OKT3之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【2192】在其他實施例中，本發明提供治療性TIL群體，其與藉由在不添加任何APC之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，由於本

文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【2193】在其他實施例中，本發明提供治療性TIL群體，其與藉由在不添加任何OKT3之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於兩倍的干擾素-γ。

【2194】在其他實施例中，本發明提供治療性TIL群體，其與藉由在不添加任何APC之情況下進行TIL之第一擴增之方法製備之TIL相比能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8 (尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於一倍的干擾素-γ。

【2195】在其他實施例中，本發明提供治療性TIL群體，其與藉由在不添加任何OKT3之情況下進行TIL之第一

擴增之方法製備之TIL相比能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ，且其中治療性TIL群體中之複數個細胞在細胞表面包括至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，由於本文中所描述，例如以上步驟A至F中或根據以上步驟A至F描述之擴增過程(亦如例如圖8(尤其例如圖8A及/或圖8B及/或圖8C及/或圖8D)中所示)，使得TIL能夠產生至少多於三倍的干擾素-γ。

【2196】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤片段為小型生檢(包括例如穿孔生檢)、粗針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2197】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤片段為粗針生檢。

【2198】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤片段為細針抽吸物。

【2199】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤片段為小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2200】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中腫瘤片段為芯針刺生檢。

【2201】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自一或多個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)、芯針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行啟始第一擴增步驟之前進行在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段之步驟；(iii)該方法包含進行啟始第一擴增約8天之時段；及(iv)該方法包含進行快速第二擴增約11天之時段。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【2202】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，使得(i)該方法包含自一或多個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)、芯針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行啟始第一擴增步驟之前進行在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段之步驟；(iii)該方法包含進行啟始第一擴增約8天之時段；及(iv)該方法包含藉由以下方式進行快速第二擴增：培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，及培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【2203】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)、芯針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2204】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)、芯針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2205】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)、芯針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2206】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)、芯針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2207】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢。

【2208】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢。

【2209】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢。

【2210】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢。

【2211】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織之細針抽吸物。

【2212】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織之細針抽吸物。

【2213】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織之細針抽吸物。

【2214】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織之細針抽吸物。

【2215】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織之芯針刺生檢。

【2216】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織之芯針刺生檢。

【2217】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織之芯針刺生檢。

【2218】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織之芯針刺生檢。

【2219】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約20個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2220】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1至約10個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2221】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2222】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得第一TIL群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自個體之腫瘤組織之小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2223】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自1至約10個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行啟始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行啟始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包含藉由在包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基中培養第二TIL群體約11天之時段來進行快速第二擴增步驟。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【2224】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，以使得(i)該方法包含自1至約10個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行啟始第一擴增步驟之前進行

以下步驟：在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體約8天之時段來進行啟始第一擴增步驟，以獲得第二TIL群體；且(iv)該方法包含藉由以下方式進行快速第二擴增：在包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基中培養第二TIL群體之培養物約5天，將培養物分成至多5個繼代培養物，以及在包含IL-2之細胞培養基中培養該等繼代培養物中之每一者約6天。在一些前述實施例中，在與在快速第二擴增中開始培養第二TIL群體的容器相同大小或更大的容器中，分別培養至多5個繼代培養物。在一些前述實施例中，第二TIL群體之培養物平均分在至多5個繼代培養物中。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【2225】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中(i)該方法包含自1至約10個來自個體之腫瘤組織之芯針生檢獲得第一TIL群體；(ii)該方法包含在進行啟始第一擴增步驟之前進行以下步驟：在G-REX-100M培養瓶中在包含6000 IU IL-2/mL之0.5 L CM1培養基的細胞培養基中培養第一TIL群體約3天之時段；(iii)該方法包含藉由以下方式進行啟始第一擴增：添加含有6000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及約10^8個飼養細胞之0.5 L CM1培養基，且培養約8天之時段；且(iv)該方法包含藉由以下方式進行快速第二擴增：(a)將第

二TIL群體轉移至含有具有3000 IU/mL IL-2、30 ng/mL OKT-3及5×10^{9}個飼養細胞之5 L CM2培養基的G-REX-500MCS培養瓶中，且培養約5天；(b)藉由將10^{9}個TIL轉移至含有具有3000 IU/mL IL-2之5 L AIM-V培養基的至多5個G-REX-500MCS培養瓶中之每一者中而將培養物分成至多5個繼代培養物，且培養該等繼代培養物約6天。在一些前述實施例中，方法之該等步驟在約22天內完成。

【2226】在其他實施例中，本發明提供擴增T細胞之方法，其包含：(a)藉由培養第一T細胞群體以實現生長及啟始第一T細胞群體之活化來進行自供體獲得之第一T細胞群體之啟始第一擴增；(b)在步驟(a)中啟始之第一T細胞群體之活化開始衰減之後，藉由培養第一T細胞群體以實現生長及增強第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之快速第二擴增，以獲得第二T細胞群體；(c)收集第二T細胞群體；及(d)在步驟(c)之前或之後的任何時間基因編輯一部分T細胞以在T細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。在其他實施例中，快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至大於第一容器的第二容器(例如G-REX-500MCS容器)，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約4至7天之時段。在其他實施例中，快速擴增步

驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之第一小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約4至7天的時段。在其他實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約4至7天的時段。在其他實施例中，快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3或4個

大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【2227】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中至少一種免疫調節組合物包含與膜錨融合之免疫調節劑(例如，本文中所描述之膜錨定之免疫調節融合蛋白質)。在一些實施例中，免疫調節劑係選自由以下組成之群：IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21及CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【2228】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速第二擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移至大於第一容器之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，及在第二容器中之較大規模培養中培養來自小規模培養的第一T細胞群體約5至7天之時段。

【2229】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之第

一小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自第一小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個與第一容器大小相等之第二容器之中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自第一小規模培養的第一T細胞群體部分係在第二小規模培養中培養約5至7天之時段。

【2230】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX 100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約2至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至7天的時段。

【2231】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中快速擴增之步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容

器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5至6天之時段。

【2232】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約5天的時段。

【2233】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各

第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約6天的時段。

【2234】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中快速擴增步驟分為複數個步驟以藉由以下方式達成培養規模之橫向擴大及縱向擴大：(a)藉由在第一容器(例如G-REX100MCS容器)中之小規模培養中培養第一T細胞群體約3至4天之時段進行快速第二擴增；且接著(b)實現將來自小規模培養之第一T細胞群體轉移且分配至至少2、3或4個大小比第一容器大之第二容器(例如G-REX-500MCS容器)中，其中在各第二容器中，轉移至此類第二容器之來自小規模培養的第一T細胞群體部分係在較大規模培養中培養約7天的時段。

【2235】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(a)之啟始第一擴增係在至多7天之時段內進行。

【2236】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【2237】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【2238】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【2239】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中步驟(b)之快速第二擴增係在至多11天之時段內進行。

【2240】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之啟始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【2241】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之啟始第一擴增係在7天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【2242】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之啟始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【2243】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之啟始第一擴增係在7天或8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多10天之時段內進行。

【2244】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之啟始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多9天之時段內進行。

【2245】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中步驟(a)中之啟始第一擴增係在8天之時段內進行，且步驟(b)之快速第二擴增係在至多8天之時段內進行。

【2246】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含OKT-3及IL-2之第一培養基中培養。

【2247】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3及IL-2。

【2248】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包含OKT-3、IL-2及抗原呈遞細胞(APC)。

【2249】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈遞細胞(APC)。

【2250】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在包含OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)之第二培養基中培養。

【2251】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及抗原呈現細胞(APC)。

【2252】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含OKT-3、IL-2及第一抗原呈遞細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【2253】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈遞細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【2254】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第

一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含OKT-3、IL-2及第一抗原呈遞細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【2255】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一T細胞群體係在包含第一透氣表面之容器中於第一培養基中培養，其中第一培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第一抗原呈遞細胞(APC)群體，其中第一APC群體對於第一T細胞群體供體為外源性的，且第一APC群體層疊至第一透氣表面上，其中在步驟(b)中，第一T細胞群體係在容器中於第二培養基中培養，其中第二培養基包含4-1BB促效劑、OKT-3、IL-2及第二APC群體，其中第二APC群體對於第一T細胞群體之供體為外源性的，且第二APC群體層疊至第一透氣表面上，且其中第二APC群體比第一APC群體大。

【2256】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第二APC群體中

之APC之數目與第一APC群體中之APC之數目的比率為約2:1。

【2257】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一APC群體中之APC之數目為約2.5×10^8，且第二APC群體中之APC之數目為約5×10^8。

【2258】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以2個APC層之平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【2259】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自4至8個APC層之範圍內的平均厚度層疊至第一透氣表面上。

【2260】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目與在步驟(a)中層疊至第一透氣表面上之APC層的平均數目的比率為2:1。

【2261】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自在或約1.0×10^6個APC/cm^2至在或約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2262】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2263】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自在或約2.0×10^6個APC/cm^2至在或約3.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2264】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【2265】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2266】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2267】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約5.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2268】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^6個APC/cm^2之密度接種在第一透氣表面上。

【2269】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.0×10^6個APC/cm^2至剛好或大約4.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約2.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約7.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2270】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以選自剛好或大約1.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約3.5×10^6個APC/cm^2至剛好或大約6.0×10^6個APC/cm^2之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2271】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第

一APC群體以選自剛好或大約2.0×10^{6}個APC/cm^{2}至剛好或大約3.0×10^{6}個APC/cm^{2}之範圍內的密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以選自剛好或大約4.0×10^{6}個APC/cm^{2}至剛好或大約5.5×10^{6}個APC/cm^{2}之範圍內的密度接種在第一透氣表面上。

【2272】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(a)中，第一APC群體以剛好或大約2.0×10^{6}個APC/cm^{2}之密度接種在第一透氣表面上，且在步驟(b)中，第二APC群體以剛好或大約4.0×10^{6}個APC/cm^{2}之密度接種在第一透氣表面上。

【2273】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中APC為周邊血液單核細胞(PBMC)。

【2274】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中PBMC經照射且對於第一T細胞群體之供體為外源性的。

【2275】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)。

【2276】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為骨髓浸潤性淋巴球(MIL)。

【2277】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞為周邊血

液淋巴球(PBL)。

【2278】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之全血分離而獲得。

【2279】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由自供體之血球分離術產物分離而獲得。

【2280】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中第一T細胞群體係藉由T細胞表現型之正向或負向選擇自供體之全血或血球分離術產物分離。

【2281】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中T細胞表現型為CD3+及CD45+。

【2282】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在進行第一T細胞群體之啟始第一擴增之前，自NK細胞分離T細胞。在其他實施例中，藉由自第一T細胞群體移除CD3-CD56+細胞來將第一T細胞群體中之T細胞與NK細胞分離。在其他實施例中，藉由使用移除CD3-CD56+細胞級份且回收陰性級份之圈選策略對第一T細胞群體進行細胞分選，自第一T細胞群體移除CD3-CD56+細胞。在其他實施例中，前述方法係用於以高百分比之NK細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以高百分

比之CD3-CD56+細胞為特徵的第一T細胞群體中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以存在大量NK細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於以大量CD3-CD56+細胞為特徵的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量NK細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有以存在大量CD3-CD56+細胞為特徵之腫瘤的患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。在其他實施例中，前述方法係用於自患有卵巢癌之患者獲得的腫瘤組織中之T細胞擴增。

【2283】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將剛好或大約1×10^7個來自第一T細胞群體之T細胞接種於容器中，以起始此類容器中之啟始第一擴增培養。

【2284】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中將第一T細胞群體分佈至複數個容器中，且在各容器中接種剛好或大約1×10^7個來自第一T細胞群體之T細胞，以起始此類容器中之啟始第一擴增培養。

【2285】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的方法，其中在步驟(c)中收集之第二T細胞群體為治療性TIL群體。

【2286】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)、粗針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2287】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)、粗針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2288】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)、粗針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2289】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)、粗針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2290】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)、粗針生檢、芯針刺生檢或細針抽吸物。

【2291】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織粗針生檢。

【2292】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織粗針生檢。

【2293】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織粗針生檢。

【2294】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織粗針生檢。

【2295】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織粗針生檢。

【2296】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【2297】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【2298】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【2299】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【2300】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織細針抽吸物。

【2301】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2302】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2303】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2304】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體

係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2305】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫瘤組織小型生檢(包括例如穿孔生檢)。

【2306】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自一或多個來自供體之腫瘤組織芯針刺生檢。

【2307】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至20個來自供體之腫瘤組織芯針刺生檢。

【2308】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1至10個來自供體之腫瘤組織芯針刺生檢。

【2309】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個來自供體之腫瘤組織芯針刺生檢。

【2310】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中第一T細胞群體係獲自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個來自供體之腫

瘤組織芯針刺生檢。

【2311】在其他實施例中，本發明提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：i)藉由在包含IL-2之第一細胞培養基中培養腫瘤樣品約3天來獲得及/或接受來源於自個體中之腫瘤之一或多個小型生檢、芯針生檢或針刺生檢獲得之腫瘤樣品之第一TIL群體；(ii)藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中在包含第一透氣表面區域之容器中進行啟始第一擴增，其中啟始第一擴增進行約7或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；(iii)藉由用額外的IL-2、OKT-3及APC補充第二TIL群體之第二細胞培養基來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中在快速第二擴增中添加之APC之數目為在步驟(ii)中添加之APC之數目之至少兩倍，其中快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包含第二透氣表面區域之容器中進行快速第二擴增；(iv)收集自步驟(iii)獲得之治療性TIL群體；(v)將來自步驟(iv)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋；及(vi)在步驟(iv)之前或之後的任何時間基因編輯至少一部分TIL細胞以在TIL細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。

【2312】在其他實施例中，本發明提供用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，其包含：

i)藉由在包含IL-2之第一細胞培養基中培養腫瘤樣品約3天來獲得及/或接受來源於自個體中之腫瘤之一或多個小型生檢、芯針生檢或針刺生檢獲得之腫瘤樣品之第一TIL群體；(ii)藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中啟始第一擴增進行約7或8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中第二TIL群體之數目大於第一TIL群體；(iii)藉由使第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中第三TIL群體為治療性TIL群體，其中在包含第二透氣表面區域之容器中進行快速第二擴增；(iv)收集自步驟(iii)獲得之治療性TIL群體；及(v)在步驟(iv)之前或之後的任何時間基因編輯至少一部分TIL細胞以在TIL細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。

【2313】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充另外數量的第三培養基並且培養約6天。

【2314】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成2個或更多個繼代培養物，且向各繼代培養物補充包含IL-2之第四培養基並且培養約6天。

【2315】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中在第二時段之第5天後，將培養物分成至多5個繼代培養物。

【2316】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中方法中之所有步驟係在約22天內完成。

【2317】在其他實施例中，本發明提供擴增T細胞之方法，其包含：(i)藉由培養第一T細胞群體以實現生長及啟始第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之啟始第一擴增，該第一T細胞群體係來源於自供體中之腫瘤之一或多個小型生檢、芯針生檢或針刺生檢獲得之腫瘤樣品；(ii)在步驟(a)中啟始之第一T細胞群體之活化開始衰減之後，藉由培養第一T細胞群體以實現生長及增強第一T細胞群體之活化來進行第一T細胞群體之快速第二擴增，以獲得第二T細胞群體；(iv)收集第二T細胞群體；及(v)在步驟(iv)之前或之後的任何時間基因編輯至少一部分T細胞以在T細胞之表面上表現至少一種免疫調節組合物。在一些實施例中，腫瘤樣品係自複數個粗針生檢獲得。在一些實施例中，複數個粗針生檢係選自由以下組成之群：2、3、4、5、6、7、8、9及10個粗針生檢。

【2318】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之方法，其中至少一種免疫調節組合物包含與選自由以下組成之群的免疫調節劑融合之膜錨：IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-

23、IL-27、IL-4、IL-1α、IL-1β、IL-5、IFNγ、TNFα(TNFa)、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF、CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)及其生物活性變異體。在一些實施例中，細胞介素係選自由以下組成之群：IL-12、IL-15、IL-18及IL-21。在一些實施例中，細胞介素為IL-12。在一些實施例中，細胞介素為IL-15。在一些實施例中，細胞介素為IL-18。在一些實施例中，細胞介素為IL-21。在一些實施例中，免疫調節劑為CD40促效劑(例如，CD40L或促效性CD40結合域)。

【2319】在一些實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述之方法，其中T細胞或TIL自腫瘤消化物中獲得。在一些實施例中，藉由在酶培養基(例如(但不限於) RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30 U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原蛋白酶)培育腫瘤，隨後進行機械解離(加利福尼亞州奧本美天旎生物技術有限公司的GentleMACS)來產生腫瘤消化物。在一些實施例中，將腫瘤置放於腫瘤解離酶混合物中，該腫瘤解離酶混合物包括一或多種解離(消化)酶，諸如(但不限於)膠原蛋白酶(包括任何摻合物或類型之膠原蛋白酶)、Accutase™、Accumax™、玻尿酸酶(hyaluronidase)、中性蛋白酶(分散酶)、胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)、木瓜凝乳蛋白酶(chymopapain)、胰蛋白酶(trypsin)、酪蛋白酶(caseinase)、彈性蛋白酶(elastase)、木瓜酶(papain)、蛋白酶型XIV(鏈蛋白酶(pronase))、去氧核糖核酸酶I (DNA

酶)、胰蛋白酶抑制劑、任何其他解離或蛋白分解酶，及其任何組合。在其他實施例中，將腫瘤置放於腫瘤解離酶混合物中，該腫瘤解離酶混合物包括膠原蛋白酶(包括任何摻合物或類型之膠原蛋白酶)、中性蛋白酶(分散酶)及去氧核糖核酸酶I(DNA酶)。

IX. 醫藥組合物、劑量及給藥方案

【2320】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增及/或基因修飾的TIL、MIL或PBL (包括基因修飾以表現CCR之TIL、MIL或PBL)作為醫藥組合物投與患者。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投與。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

【2321】可投與任何適合劑量之TIL。在一些實施例中，投與約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，尤其在癌症為NSCLC或黑色素瘤之情況下。在一些實施例中，投與約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約

7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，尤其在癌症為黑色素瘤。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，尤其在癌症為NSCLC。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【2322】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，提供於本發

明之醫藥組合物中的TIL之數目在1×10^6至5×10^6、5×10^6至1×10^7、1×10^7至5×10^7、5×10^7至1×10^8、1×10^8至5×10^8、5×10^8至1×10^9、1×10^9至5×10^9、5×10^9至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【2323】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度小於例如醫藥組合物之100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【2324】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度大於醫藥組合物之90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、

11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【2325】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【2326】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物之約0.001%至約10%、約0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約

0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【2327】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【2328】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7

g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【2329】提供於本發明之醫藥組合物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投與途徑、化合物投與形式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投與之醫藥組合物的量，諸如TIL之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投與速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判斷而定。

【2330】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投與。此類投與可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投與。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投與可視需要而繼續。

【2331】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×10^8、5×10^8、6×10^8、7×10^8、8×10^8、9×10^8、1×10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、9×10^9、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、

6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，TIL之有效劑量在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【2332】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約

2.95 mg/kg之範圍內。

【2333】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【2334】有效量之TIL可藉由投與具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包括鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投與。

【2335】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包含如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體。

【2336】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包含如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及醫藥學上可接受之載劑。

【2337】在其他實施例中，本發明提供一種輸注袋，其包含如上在任何前述段落中描述的TIL組合物。

【2338】在其他實施例中，本發明提供一種如上在任

何前述段落中描述的治療性TIL群體的冷凍保存製劑。

【2339】在其他實施例中，本發明提供一種腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)組合物，其包含如上在任何前述段落中描述的治療性TIL群體及冷凍保存培養基。

【2340】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的TIL組合物，其中冷凍保存培養基含有DMSO。

【2341】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上任何前述段落中描述的TIL組合物，其中冷凍保存培養基含有7%至10% DMSO。

【2342】在其他實施例中，本發明提供一種如上在任何前述段落中描述的TIL組合物的冷凍保存製劑。

【2343】在一些實施例中，使用本揭示案之方法擴增之TIL係以醫藥組合物之形式向患者投與。在一些實施例中，醫藥組合物為TIL於無菌緩衝液中之懸浮液。使用本揭示案之PBMC擴增的TIL可藉由此項技術中已知的任何適合途徑投與。在一些實施例中，T細胞係以單一動脈內或靜脈內輸注之形式投與，其較佳持續大約30至60分鐘。其他適合之投與途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴管內投與。

【2344】可投與任何適合劑量之TIL。在一些實施例中，投與約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL，平均約7.8×10^{10}個TIL，尤其在癌症為NSCLC之情況下。在一些實施例中，投與約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，

投與約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，投與約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個。在一些實施例中，治療有效劑量為約7.8×10^{10}個TIL，尤其癌症為NSCLC。在一些實施例中，治療有效劑量為約1.2×10^{10}至約4.3×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約3×10^{10}至約12×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約4×10^{10}至約10×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約5×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約6×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。在一些實施例中，治療有效劑量為約7×10^{10}至約8×10^{10}個TIL。

【2345】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目為約1×10^{6}、2×10^{6}、3×10^{6}、4×10^{6}、5×10^{6}、6×10^{6}、7×10^{6}、8×10^{6}、9×10^{6}、1×10^{7}、2×10^{7}、3×10^{7}、4×10^{7}、5×10^{7}、6×10^{7}、7×10^{7}、8×10^{7}、9×10^{7}、1×10^{8}、2×10^{8}、3×10^{8}、4×10^{8}、5×10^{8}、6×10^{8}、7×10^{8}、8×10^{8}、9×10^{8}、1×10^{9}、2×10^{9}、3×10^{9}、4×10^{9}、5×10^{9}、6×10^{9}、7×10^{9}、8×10^{9}、9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、

1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之數目在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【2346】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度小於例如醫藥組合物之100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【2347】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度大於醫藥組合物之90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、

13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v。

【2348】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物的約0.0001%至約50%、約0.001%至約40%、約0.01%至約30%、約0.02%至約29%、約0.03%至約28%、約0.04%至約27%、約0.05%至約26%、約0.06%至約25%、約0.07%至約24%、約0.08%至約23%、約0.09%至約22%、約0.1%至約21%、約0.2%至約20%、約0.3%至約19%、約0.4%至約18%、約0.5%至約17%、約0.6%至約16%、約0.7%至約15%、約0.8%至約14%、約0.9%至約12%或約1%至約10% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【2349】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之濃度在醫藥組合物之約0.001%至約10%、約

0.01%至約5%、約0.02%至約4.5%、約0.03%至約4%、約0.04%至約3.5%、約0.05%至約3%、約0.06%至約2.5%、約0.07%至約2%、約0.08%至約1.5%、約0.09%至約1%、約0.1%至約0.9% w/w、w/v或v/v之範圍內。

【2350】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量等於或小於10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g、5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g或0.0001 g。

【2351】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組合物中的TIL之量大於0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、

0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g或10 g。

【2352】提供於本發明之醫藥組合物中的TIL在廣泛劑量範圍內有效。準確劑量將視投與途徑、化合物投與形式、待治療個體之性別及年齡、待治療個體之體重及主治醫師之偏好及經驗而定。適當時亦可使用TIL之臨床確定劑量。使用本文之方法投與之醫藥組合物的量，諸如TIL之劑量將視所治療之人類或哺乳動物、病症或病狀之嚴重程度、投與速率、活性醫藥成分之配置及開處方醫師之判斷而定。

【2353】在一些實施例中，TIL可以單次劑量投與。此類投與可藉由例如靜脈內注射之注射進行。在一些實施例中，TIL可以多次劑量投與。給藥可為每年一次、兩次、三次、四次、五次、六次或超過六次。給藥可為每月一次、每兩週一次、一週一次或每隔一天一次。TIL之投與可視需要而繼續。

【2354】在一些實施例中，TIL之有效劑量為約1×10^6、2×10^6、3×10^6、4×10^6、5×10^6、6×10^6、7×10^6、8×10^6、9×10^6、1×10^7、2×10^7、3×10^7、4×10^7、5×10^7、6×10^7、7×10^7、8×10^7、9×10^7、1×10^8、2×10^8、3×10^8、4×10^8、5×10^8、6×10^8、7×10^8、8×10^8、9×10^8、1×10^9、2×10^9、3×10^9、4×10^9、5×10^9、6×10^9、7×10^9、8×10^9、

9×10^{9}、1×10^{10}、2×10^{10}、3×10^{10}、4×10^{10}、5×10^{10}、6×10^{10}、7×10^{10}、8×10^{10}、9×10^{10}、1×10^{11}、2×10^{11}、3×10^{11}、4×10^{11}、5×10^{11}、6×10^{11}、7×10^{11}、8×10^{11}、9×10^{11}、1×10^{12}、2×10^{12}、3×10^{12}、4×10^{12}、5×10^{12}、6×10^{12}、7×10^{12}、8×10^{12}、9×10^{12}、1×10^{13}、2×10^{13}、3×10^{13}、4×10^{13}、5×10^{13}、6×10^{13}、7×10^{13}、8×10^{13}及9×10^{13}。在一些實施例中，TIL之有效劑量在1×10^{6}至5×10^{6}、5×10^{6}至1×10^{7}、1×10^{7}至5×10^{7}、5×10^{7}至1×10^{8}、1×10^{8}至5×10^{8}、5×10^{8}至1×10^{9}、1×10^{9}至5×10^{9}、5×10^{9}至1×10^{10}、1×10^{10}至5×10^{10}、5×10^{10}至1×10^{11}、5×10^{11}至1×10^{12}、1×10^{12}至5×10^{12}及5×10^{12}至1×10^{13}之範圍內。

【2355】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約0.01 mg/kg至約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg至約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg至約2.85 mg/kg、約0.3 mg至約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg至約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg至約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg至約1 mg/kg、約0.55 mg/kg至約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg至約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg至約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg至約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg至約2 mg/kg、約1 mg/kg至約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg至約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg mg至約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg至約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg至約3.6 mg/kg、約2.3 mg/kg至約3.4 mg/kg、約2.4 mg/kg至約3.3 mg/kg、約2.6 mg/kg至約3.15 mg/kg、約2.7 mg/kg至

約3 mg/kg、約2.8 mg/kg至約3 mg/kg或約2.85 mg/kg至約2.95 mg/kg之範圍內。

【2356】在一些實施例中，TIL之有效劑量在約1 mg至約500 mg、約10 mg至約300 mg、約20 mg至約250 mg、約25 mg至約200 mg、約1 mg至約50 mg、約5 mg至約45 mg、約10 mg至約40 mg、約15 mg至約35 mg、約20 mg至約30 mg、約23 mg至約28 mg、約50 mg至約150 mg、約60 mg至約140 mg、約70 mg至約130 mg、約80 mg至約120 mg、約90 mg至約110 mg、或約95 mg至約105 mg、約98 mg至約102 mg、約150 mg至約250 mg、約160 mg至約240 mg、約170 mg至約230 mg、約180 mg至約220 mg、約190 mg至約210 mg、約195 mg至約205 mg或約198至約207 mg之範圍內。

【2357】有效量之TIL可藉由投與具有類似效用之試劑的任一種公認模式，包括鼻內及經皮途徑、藉由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、非經腸、肌肉內、皮下、局部、藉由移植或藉由吸入，以單次或多次劑量投與。

X. 治療患者之方法

【2358】治療方法始於原始TIL收集及TIL培養。此類方法均已描述於例如以全文引用之方式併入本文中的Jin等人，《免疫療法雜誌》，**2012**, 35(3):283-292之領域中。下文貫穿各個部分，包括實例，描述了治療方法之實施例。

【2359】發現根據本文中所描述之方法，包括例如上文步驟A至F中所描述或根據上文步驟A至F(亦如例如圖1及/或圖8中所示)而產生的擴增TIL在治療癌症患者方面的特殊用途(例如，如以全文引用之方式併入本文中的Goff等人，《臨床腫瘤學雜誌》，**2016**, 34(20):2389-239以及補充內容中所描述)。在一些實施例中，如先前描述自經切除轉移性黑色素瘤寄存物生長TIL(參見以全文引用之方式併入本文中的Dudley等人，《免疫療法雜誌》，**2003**, 26:332-342)。可在無菌條件下分割新鮮腫瘤。可收集代表樣品以用於正式病理分析。可使用2 mm^3至3 mm^3之單個片段。在一些實施例中，自每位患者獲得5、10、15、20、25或30個樣品。在一些實施例中，自每位患者獲得20、25或30個樣品。在一些實施例中，自每位患者獲得20、22、24、26或28個樣品。在一些實施例中，自每位患者獲得24個樣品。可將樣品置於24孔盤之個別孔中，維持於含高劑量IL-2 (6,000 IU/mL)之生長培養基中，並監測腫瘤破壞及/或TIL增殖。如本文所描述，可將在處理後剩餘活細胞之任何腫瘤酶消化成單細胞懸浮液並冷凍保存。

【2360】在一些實施例中，可對成功生長之TIL進行取樣以用於表現型分析(CD3、CD4、CD8及CD56)，並在可用時針對自體腫瘤進行測試。若隔夜共培養產生之干擾素-γ(IFN-γ)含量> 200 pg/mL且為背景之兩倍，則可認為TIL具反應性。(Goff等人，《免疫療法雜誌》，**2010**, 33:840-847；其以全文引用之方式併入本文中)。在一些實

施例中，可選擇已證明具有自體反應性或充足生長模式的培養物用於第二擴增(例如根據圖1及/或圖8之步驟D中所提供之第二擴增)，包括有時稱為快速擴增(REP)之第二擴增。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如在第二擴增期間高度增殖)的經擴增TIL用於另外的第二擴增。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如，在如圖1及/或圖8之步驟D中所提供之第二擴增期間之高增殖)之TIL用於根據圖1及/或Figure 8之步驟D之額外第二擴增。

【2361】可藉由針對表面標記物CD3、CD4、CD8、CCR7及CD45RA之流動式細胞測量術(例如FlowJo)(碧迪生物科學)以及藉由本文所描述之任一種方法分析輸注袋TIL之冷凍保存樣品之細胞表現型。藉由使用標準酶聯免疫吸附分析技術量測血清細胞介素。血清IFN-g之升高定義為>100 pg/mL及大於43之基線水準。

【2362】在一些實施例中，藉由本文所提供之方法，例如圖1及/或圖8中例示之方法產生的TIL實現TIL之臨床功效的驚人改良。在一些實施例中，與藉由除本文所描述之方法以外之方法(包括例如除圖1中及/或圖8中例示之方法以外的方法)產生的TIL相比，藉由本文所提供之方法，例如圖1及/或圖8中例示之方法產生的TIL呈現提高之臨床功效。在一些實施例中，除本文所描述之方法外的方法包括稱為過程1C及/或第1代(Gen 1)之方法。在一些實施例中，藉由DCR、ORR及/或其他臨床反應量測增加之功效。在一些實施例中，與藉由除本文所描述之方法以外之方法

(包括例如除圖1中及/或圖8中例示之方法以外的方法)產生的TIL相比，藉由本文所提供之方法，例如圖1中例示之方法產生之TIL呈現類似的反應時間及安全性概況。

【2363】在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本發明方法製備之TIL治療的個體之血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1

及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ分泌增加五倍。在一些實施例中，使用Quantikine ELISA套組量測IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法製備的TIL治療的個體之離體TIL中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法製備的TIL治療的個體之血液中之IFN-γ。在一些實施例中，量測用藉由本發明方法，包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法製備的TIL治療的個體之TIL血清中之IFN-γ。在一些實施例中，IFN-γ(IFN-gamma)指示在治療腫瘤中的治療功效及/或增加之臨床功效。

【2364】在一些實施例中，藉由本發明之方法製備之TIL，包括如例如圖1中所描述之彼等TIL。在一些實施例中，IFN-γ指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，用TIL治療的個體之血液中之IFN-γ指示活性TIL。在一些實施例中，採用針對IFN-γ產生之效力分析。IFN-γ產生為細胞毒性潛力的另一種量度。藉由測定由本

發明方法製備之TIL治療的個體之血液、血清或離體TIL中之細胞介素IFN-γ含量，可量測IFN-γ產生，該等方法包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法。在一些實施例中，IFN-γ增加指示對用藉由本發明方法產生之TIL治療的患者之治療功效。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用不同於本文所提供方法的方法(包括例如除體現於圖1及/或圖8中之方法外的方法)製備之TIL治療的患者，IFN-γ增加一倍、兩倍、三倍、四倍或五倍或更多IFN-γ。

【2365】在一些實施例中，藉由本發明之方法(包括如例如圖1及/或圖8中所描述之方法)製備之TIL，相較於藉由其他方法(包括未在圖1及/或圖8中例示之方法，諸如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL展現增加的多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投與藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未

治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1及/或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加1000倍。

【2366】功效之量度可包括疾病控制率(DCR)以及總反應率(ORR)，如本領域已知以及本文所描述。

A. 治療癌症之方法

【2367】本文所描述之組合物及方法可用於一種治療疾病之方法中。在一些實施例中，其用於治療成人患者或兒科患者中之過度增殖性病症，諸如癌症。其亦可用於治療如本文及以下段落中所描述之其他病症。

【2368】在一些實施例中，過度增生病症為癌症。在一些實施例中，過度增生病症為實體腫瘤癌症。在一些實施例中，實體腫瘤癌症係選自由以下組成之群：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒(HPV)引起的癌症、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌)、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨骼及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。

【2369】在一些實施例中，過度增生病症為血液惡性病。在一些實施例中，血液惡性病係選自由以下組成之群：慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞性白血病、彌漫性大B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤、套細胞淋

巴瘤及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，本發明包括治療患有癌症之患者之方法，其中該癌症為血液惡性病。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症係血液惡性病。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症係血液惡性病。

【2370】在一些實施例中，癌症為前述癌症中之一者，包括實體腫瘤癌症及血液惡性病，其對於用至少一種先前療法(包括化學療法、放射療法或免疫療法)治療為復發性或難治性的。在一些實施例中，癌症對用至少兩種先前療法(包括化學療法、放射療法及/或免疫療法)治療為復發性或難治性的前述癌症之一。在一些實施例中，癌症對用至少三種先前療法(包括化學療法、放射療法及/或免疫療法)治療為復發性或難治性的前述癌症之一。

【2371】在一些實施例中，癌症為高微隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷型癌症。MSI-H及dMMR癌症及其檢測已描述於Kawakami等人，《當前腫瘤學之治療選擇(*Curr. Treat. Options Oncol.*)》**2015,** *16,* 30中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

【2372】在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該患者係人類。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療

患有癌症之患者的方法，其中該患者係非人類。在一些實施例中，本發明包括使用經修飾以表現一或多種CCR之TIL、MIL或PBL治療患有癌症之患者的方法，其中該患者係伴侶動物。

【2373】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用BRAF抑制劑及/或MEK抑制劑治療。在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用選自由以下組成之群的BRAF抑制劑治療：維羅非尼(vemurafenib)、達拉非尼(dabrafenib)、恩拉非尼(encorafenib)、索拉非尼(sorafenib)及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用選自由以下組成之群的MEK抑制劑治療：曲美替尼(trametinib)、考比替尼(cobimetinib)、貝美替尼(binimetinib)、司美替尼(selumetinib)、匹馬色替尼(pimasertinib)、瑞法替尼(refametinib)及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症難以用選自由以下組成之群的BRAF抑制劑治療：維羅非尼、達拉非尼、恩拉非尼、索拉非尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物；且難以用選自由以下組成之群的MEK抑制劑治療：曲美替尼、考比替尼、貝美替尼、司美替尼、匹馬色替尼、瑞法替尼及其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

【2374】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有

癌症之患者的方法，其中該癌症係兒科癌症。

【2375】在一些實施例中，本發明一種包括治療患有癌症之患者的方法，其中該癌症係葡萄膜黑色素瘤。

【2376】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該葡萄膜黑色素瘤係脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤。

【2377】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該兒科癌症係神經母細胞瘤。

【2378】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該兒科癌症係肉瘤。

【2379】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該肉瘤係骨肉瘤。

【2380】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該肉瘤係軟組織肉瘤。

【2381】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者之方法，其中該軟組織肉瘤係橫紋肌肉瘤、尤文氏肉瘤或原始神經外胚層腫瘤(PNET)。

【2382】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有癌症之患者的方法，其中該兒科癌症係中樞神經系統(CNS)相關癌症。在一些實施例中，兒科癌症難以用化學療法治療。在一些實施例中，兒科癌症難以用放射療法治療。在一些實施例中，兒科癌症難以用地努圖希單抗(dinutuximab)治療。

【2383】在一些實施例中，本發明包括一種治療患有

癌症之患者之方法，其中該CNS相關癌症為神經管胚細胞瘤、松果體母細胞瘤、神經膠質瘤、室管膜瘤或神經膠母細胞瘤。

【2384】本文中所描述之組合物及方法可用於治療癌症之方法，其中癌症難以用抗PD-1或抗PD-L1抗體治療或對先前治療具有抗性。在一些實施例中，患者係抗PD-1或抗PD-L1抗體的原發性難治性患者。在一些實施例中，患者未展示出對抗PD-1或抗PD-L1抗體的先前反應。在一些實施例中，患者展示出對抗PD-1或抗PD-L1抗體的先前反應，隨後患者之癌症進展。在一些實施例中，癌症難以用抗CTLA-4抗體及/或抗PD-1或抗PD-L1抗體與至少一種化學治療劑之組合治療。在一些實施例中，先前化學治療劑為卡鉑、太平洋紫杉醇、培美曲塞(pemetrexed)及/或順鉑。在一些先前實施例中，化學治療劑係鉑雙重化學治療劑。在一些實施例中，鉑雙重療法包含選自由順鉑及卡鉑組成之群之第一化學治療劑，及選自由長春瑞濱(vinorelbine)、吉西他濱(gemcitabine)及紫杉烷(包括例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西他賽(docetaxel)或白蛋白結合型太平洋紫杉醇(nab-paclitaxel))組成之群之第二化學治療劑。在一些實施例中，鉑雙重化學治療劑與培美曲塞(pemetrexed)組合。

【2385】在一些實施例中，NSCLC為PD-L1陰性及/或來自患有表現PD-L1且腫瘤比例評分(TPS)<1%之癌症的患者，如本文別處所描述。

【2386】在一些實施例中，NSCLC難以用包含抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體及鉑雙重療法之組合療法治療，其中該鉑雙重療法包含：

i) 第一化學治療劑，其選自由順鉑及卡鉑組成之群，

ii) 及第二化學治療劑，其選自由以下組成之群：長春瑞濱、吉西他濱及紫杉烷(包括例如太平洋紫杉醇、多西他賽或白蛋白結合型太平洋紫杉醇)。

【2387】在一些實施例中，NSCLC難以用包含抗PD-1抗體或抗PD-L1抗體、培美曲塞及鉑雙重療法之組合療法治療，其中該鉑雙重療法包含：

i) 第一化學治療劑，其選自由順鉑及卡鉑組成之群，

ii) 及第二化學治療劑，其選自由以下組成之群：長春瑞濱、吉西他濱及紫杉烷(包括例如太平洋紫杉醇、多西他賽或白蛋白結合型太平洋紫杉醇)。

【2388】在一些實施例中，NSCLC已用抗PD-1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC已用抗PD-L1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC患者尚未接受治療。在一些實施例中，NSCLC尚未用抗PD-1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC尚未用抗PD-L1抗體治療。在一些實施例中，NSCLC先前已用化學治療劑治療。在一些實施例中，NSCLC先前已用化學治療劑治療，但目前不再用該化學治療劑治療。在一些實施例中，NSCLC患者未經抗PD-1/PD-

L1治療。在一些實施例中，NSCLC患者具有低PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者未經NSCLC治療或已接受化學治療劑治療，但未經PD-1/PD-L1治療。在一些實施例中，NSCLC患者未經治療或已接受化學治療劑治療，但未經抗PD-1/PD-L1治療且具有低PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者在基線時患有大塊疾病。在一些實施例中，個體在基線時患有大塊疾病且具有低PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者不具有可偵測之PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者未經治療或已接受化學治療劑治療，但未經抗PD-1/PD-L1治療且不具有可偵測之PD-L1表現。在一些實施例中，患者在基線時患有大塊基線且不具有可偵測之PD-L1表現。在一些實施例中，NSCLC患者具有未經治療的NSCLC或已接受化學療法(例如，已接受化學治療劑)，但未經抗PD-1/PD-L1治療，且該患者具有低PD-L1表現及/或在基線時具有大塊疾病。在一些實施例中，當在橫向或冠狀面中量測的最大腫瘤直徑大於7 cm時指示為大塊疾病。在一些實施例中，當存在具有20 mm或更大的短軸直徑的腫脹淋巴結時指示為大塊疾病。在一些實施例中，化學治療劑包括NSCLC的標準護理治療劑。

【2389】在一些實施例中，藉由腫瘤比例評分確定PD-L1表現。在一些實施例中，患有難治性NSCLC腫瘤之個體具有<1%的腫瘤比例評分(TPS)。在一些實施例中，患有難治性NSCLC腫瘤之個體具有≥1%的TPS。在一些實施例中，患有難治性NSCLC之個體先前已用抗PD-1及/或

抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有難治性NSCLC之個體先前已用抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。

【2390】在一些實施例中，藉由本發明之方法(包括如例如圖1或圖8中所描述之彼等方法)製備之TIL，相較於藉由其他方法(包括未在圖1或圖8中例示之彼等方法，包括諸如稱為過程1C方法之方法)產生之TIL展現增加的多株性。在一些實施例中，顯著提高之多株性及/或增加之多株性指示對癌症治療之治療功效及/或增加之臨床功效。在一些實施例中，多株性係指T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，多株性增加可指示關於投與藉由本發明方法產生之TIL的治療功效。在一些實施例中，相較於使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL，多株性增加一倍、兩倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加兩倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施

之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加100倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療患者及/或相較於用使用除本文中提供之方法以外之方法(包括例如除圖1或圖8中實施之方法以外之方法)製備之TIL治療之患者，多株性增加1000倍。

【2391】在一些實施例中，使用如本文中所描述之一或多種測試方法藉由腫瘤比例評分確定PD-L1表現。在一些實施例中，患有NSCLC腫瘤之個體或患者具有<1%的腫瘤比例評分(TPS)。在一些實施例中，NSCLC腫瘤具有≥1%的TPS。在一些實施例中，患有NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療且在抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC腫瘤之個體或患者具有<1%的腫瘤比例評分(TPS)。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC腫瘤之個體或患者具有≥1%的TPS。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC之個

體或患者先前已用抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療且在抗PD-1及/或抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。在一些實施例中，患有難治性或耐藥性NSCLC之個體或患者先前已用抗PD-L1抗體治療且在該抗PD-L1抗體治療之前已確定腫瘤比例評分。

【2392】在一些實施例中，NSCLC係呈現腫瘤比例評分(TPS)之NSCLC，或在抗PD-1或抗PD-L1療法之前自患者獲取的活腫瘤細胞的百分比，在任何強度下展示部分或完全膜染色的PD-L1蛋白的百分比低於1% (TPS<1%)。在一些實施例中，NSCLC為呈現選自由以下組成之群的TPS之NSCLC：<50%、<45%、<40%、<35%、<30%、<25%、<20%、<15%、<10%、<9%、<8%、<7%、<6%、<5%、<4%、<3%、<2%、<1%、<0.9%、<0.8%、<0.7%、<0.6%、<0.5%、<0.4%、<0.3%、<0.2%、<0.1%、<0.09%、<0.08%、<0.07%、<0.06%、<0.05%、<0.04%、<0.03%、<0.02%及<0.01%。在一些實施例中，NSCLC為呈現選自由以下組成之群的TPS之NSCLC：約50%、約45%、約40%、約35%、約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%、約0.9%、約0.8%、約0.7%、約0.6%、約0.5%、約0.4%、約0.3%、約0.2%、約0.1%、約0.09%、約0.08%、約0.07%、約0.06%、約0.05%、約0.04%、約0.03%、約0.02%及約0.01%。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與1%之間的TPS的NSCLC。在一些

實施例中，NSCLC係呈現0%與0.9%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.8%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.7%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.6%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.5%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.4%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.3%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.2%之間的TPS的NSCLC。在一些實施例中，NSCLC係呈現0%與0.1%之間的TPS的NSCLC。TPS可藉由此項技術中已知之方法量測，諸如描述於Hirsch等人，《胸腫瘤學期刊(*J. Thorac. Oncol.*)》**2017**, *12*, 208-222中之方法或用於在使用帕博利珠單抗(pembrolizumab)或其他抗PD-1或抗PD-L1療法治療之前測定TPS之方法。亦可使用經美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)批准之用於量測TPS的方法。在一些實施例中，PD-L1係外泌體PD-L1。在一些實施例中，在循環腫瘤細胞上發現PD-L1。

【2393】在一些實施例中，部分膜染色包括1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或更多。在一些實施例中，完整膜染色包括約100%膜染色。

【2394】在一些實施例中，測試PD-L1可涉及量測患

者血清中之PD-L1之含量。在此等實施例中，患者血清中之PD-L1之量測移除腫瘤異質性之不確定性及患者進行連續生檢之不適。

【2395】在一些實施例中，相較於基線或標準水準升高之可溶性PD-L1與NSCLC之惡化的預後相關。參見例如Okuma等人，《臨床肺癌(*Clinical Lung Cancer*)》, **2018**, *19*, 410-417；Vecchiarelli等人，《腫瘤標靶(*Oncotarget*)》, **2018**, *9*, 17554-17563。在一些實施例中，PD-L1係外泌體PD-L1。在一些實施例中，PD-L1在循環腫瘤細胞上表現。

【2396】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之個體或患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該個體或患者具有以下中之至少一者：

i. PD-L1之預定腫瘤比例評分(TPS)<1%，

ii. PD-L1之TPS分數為1%-49%，或

iii. 一或多個驅動突變之預定缺失，

其中該驅動突變選自由以下組成之群：EGFR突變、EGFR插入、EGFR外顯子20突變、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變、RET融合、ERBB2突變、ERBB2擴增、BRCA突變、MAP2K1突變、PIK3CA、CDKN2A、PTEN突變、UMD突變、NRAS突變、KRAS突變、NF1突變、MET突變、MET剪接及/或改變之MET信號、TP53突變、CREBBP

突變、KMT2C突變、KMT2D突變、ARID1A突變、RB1突變、ATM突變、SETD2突變、FLT3突變、PTPN11突變、FGFR1突變、EP300突變、MYC突變、EZH2突變、JAK2突變、FBXW7突變、CCND3突變及GNA11突變，且其中該方法包含：

(a) 藉由將自該個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自該個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

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

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

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

及

(f) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

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

(h) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【2397】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅動突變選自由以下組成之群：EGFR突變、EGFR插入、EGFR外顯子20突變、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變、RET融合、ERBB2突變、ERBB2擴增、BRCA突變、MAP2K1突變、PIK3CA、CDKN2A、PTEN突變、UMD突變、NRAS突變、KRAS突變、NF1突變、MET突變、MET剪接及/或改變之MET信號、TP53突變、CREBBP突變、KMT2C突變、KMT2D突變、ARID1A突變、RB1突變、ATM突變、SETD2突變、FLT3突變、PTPN11突變、FGFR1突變、EP300突變、MYC突變、EZH2突變、JAK2

突變、FBXW7突變、CCND3突變及GNA11突變，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分為約1%至約49%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將自該個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自該個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3-14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注

袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

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

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【2398】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅動突變選自由以下組成之群：EGFR突變、EGFR插入、EGFR外顯子20突變、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變、RET融合、ERBB2突變、ERBB2擴增、BRCA突變、MAP2K1突變、PIK3CA、CDKN2A、PTEN突變、UMD突變、NRAS突變、KRAS突變、NF1突變、MET突變、MET剪接及/或改變之MET信號、TP53突變、CREBBP突變、KMT2C突變、KMT2D突變、ARID1A突變、RB1突變、ATM突變、SETD2突變、FLT3突變、PTPN11突變、FGFR1突變、EP300突變、MYC突變、EZH2突變、JAK2突變、FBXW7突變、CCND3突變及GNA11突變，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分小於約1%且確定

該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將自該個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自該個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3-14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

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

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【2399】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅動突變選自由以下組成之群：EGFR突變、EGFR插入、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變或RET融合，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分為約1%至約49%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將自該個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自該個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3-14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不開放該系統之情況下進

行；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

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

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【2400】在一些實施例中，本發明提供一種治療非小細胞肺癌(NSCLC)之方法，其藉由向有需要之患者投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，其中該方法包含：

(a) 測試該患者腫瘤之PD-L1表現及PD-L1之腫瘤比例評分(TPS)，

(b) 測試該患者不存在一或多個驅動突變，其中該驅

動突變選自由以下組成之群：EGFR突變、EGFR插入、KRAS突變、BRAF突變、ALK突變、c-ROS突變(ROS1突變)、ROS1融合、RET突變或RET融合，

(c) 確定該患者之PD-L1之TPS評分小於約1%且確定該患者亦無驅動突變，

(d) 藉由將自該個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自該個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(e) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(f) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3-14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(e)至步驟(f)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 藉由用額外IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之該細胞培養基來進行第二擴增從而產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(f)至步驟(g)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(h) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

及

(i) 將來自步驟(e)之所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

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

(k) 向該個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋的該第三TIL群體。

【2401】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之本文中所描述之治療性TIL群體。

【2402】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之本文中所描述之TIL組合物。

【2403】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中在分別投與治療有效劑量之本文中所描述之治療性TIL群體及TIL組合物之前，已向個體投與非清髓性淋巴球耗減方案。

【2404】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，接著以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱(fludarabine)持續五天。

【2405】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於

治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，該方法進一步包含在向個體投與TIL細胞之後當天開始用高劑量IL-2方案治療個體的步驟。

【2406】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注型靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2407】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為實體腫瘤。

【2408】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【2409】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【2410】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤。

【2411】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於

治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為HNSCC。

【2412】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為子宮頸癌。

【2413】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為NSCLC。

【2414】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包括GBM)。

【2415】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為胃腸癌。

【2416】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為高突變癌症。

【2417】在其他實施例中，本發明提供經修改之用於治療患有本文中所描述之癌症之個體的方法，其中癌症為兒科高突變癌症。

【2418】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法中的本文中所描述之治療性TIL群體，其包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【2419】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體之方法中的本文中所描述之TIL組合物，其包含向該個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【2420】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或本文中所描述之TIL組合物，其中在向個體投與治療有效劑量之本文中所描述之治療性TIL群體或本文中所描述之TIL組合物之前，已向個體投與非清髓性淋巴球耗減方案。

【2421】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60 mg/m^2/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，接著以25 mg/m^2/天之劑量投與氟達拉濱持續五天。

【2422】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其進一步包含在向患者投與TIL細胞之後當天開始用高劑量IL-2方案治療患者的步驟。

【2423】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2424】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為實體腫瘤。

【2425】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【2426】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【2427】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤。

【2428】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為HNSCC。

【2429】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為子宮頸癌。

【2430】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為NSCLC。

【2431】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為神經

膠母細胞瘤。

【2432】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為胃腸癌。

【2433】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為高突變癌症。

【2434】在其他實施例中，本發明提供經修改之本文中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為兒科高突變癌症。

【2435】在其他實施例中，本發明提供本文中所描述之治療性TIL群體在治療個體之癌症之方法中的用途，其包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【2436】在其他實施例中，本發明提供任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向該個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【2437】在其他實施例中，本發明提供本文中所描述之治療性TIL群體或本文中所描述之TIL組合物在治療患者之癌症之方法中的用途，該方法包含向患者投與非清髓性淋巴球耗減方案，且隨後向個體投與治療有效劑量之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量之本文中所描述之TIL組合物。

1. 與PD-1及PD-L1抑制劑之組合

【2438】在一些實施例中，向癌症患者提供之TIL療法可包括單獨用治療性TIL群體治療，或可包括組合治療，該組合治療包括TIL及一或多種PD-1及/或PD-L1抑制劑。

【2439】計劃性死亡1 (PD-1)為由T細胞、B細胞、自然殺手(NK)T細胞、活化單核球及樹突狀細胞表現之288胺基酸跨膜免疫檢查點受體蛋白。PD-1，亦稱為CD279，屬於CD28家族，且在人類中係由2號染色體上之Pdcd1基因編碼。PD-1由一個免疫球蛋白(Ig)超家族域、跨膜區及細胞內域組成，該細胞內域含有免疫受體酪胺酸抑制模體(ITIM)及免疫受體酪胺酸切換模體(ITSM)。已知PD-1及其配位體(PD-L1及PD-L2)在免疫耐受性中起重要作用，如Keir等人，《免疫學年度評論》**2008**, *26*, 677-704中所描述。PD-1提供負向調節T細胞免疫反應的抑制信號。PD-L1 (亦稱為B7-H1或CD274)及PD-L2 (亦稱為B7-DC或CD273)表現於腫瘤細胞及基質細胞上，其可能遇到表現PD-1之活化T細胞，導致對T細胞之免疫抑制。PD-L1為由人類9號染色體上之Cd274基因編碼的290胺基酸跨膜蛋白。使用PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑及/或PD-L2抑制劑阻斷PD-1與其配位體PD-L1及PD-L2之間的相互作用，可克服免疫抗性，如近期臨床研究，諸如Topalian等人，《新英格蘭醫學雜誌(*N. Eng. J. Med.*)》 **2012**, *366*, 2443-54中所描述之研究所顯示。PD-L1表現於許多腫瘤細胞株上，而PD-L2表現於主要地表現於樹突狀細胞及一些腫瘤株

上。除T細胞(其在活化後誘導性表現PD-1)以外，PD-1亦表現於B細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、活化單核球及樹突狀細胞上。

【2440】在一些實施例中，TIL及PD-1抑制劑係作為用於治療NSCLC之組合療法或協同療法投與。

【2441】在一些實施例中，NSCLC尚未經歷先前療法。在一些實施例中，將PD-1抑制劑作為一線療法或初始療法投與。在一些實施例中，將PD-1抑制劑作為一線療法或初始療法與如本文中所描述之TIL組合投與。

【2442】在一些實施例中，PD-1抑制劑可為本領域已知的任何PD-1抑制劑或PD-1阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-1抑制劑或阻斷劑之一。關於PD-1抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-1抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變異體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-1抑制劑時亦可指代小分子化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【2443】在一些實施例中，PD-1抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包括其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-1抑制劑為多株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑競爭結合PD-1，及/或結合至PD-1上之抗原決定基。在一些實施例中，抗體競爭結合PD-1，及/或結合

至PD-1上之抗原決定基。

【2444】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約30 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約20 pM或更低之KD結合人類PD-1、以約10 pM或更低之KD結合人類PD-1，或以約1 pM或更低之KD結合人類PD-1。

【2445】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1、以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1，或以約1×10^6 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-1。

【2446】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更

慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1，或以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.8×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.9×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1。

【2447】在一些實施例中，PD-1抑制劑為如下PD-1抑制劑，該PD-1抑制劑以約10 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【2448】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗(可自百時美施貴寶公司以OPDIVO商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變異體。納武單抗為阻斷

PD-1受體之完全人類IgG4抗體。在一些實施例中，抗PD-1抗體為免疫球蛋白G4κ抗(人類CD274)抗體。納武單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號946414-94-4且亦稱為5C4、BMS-936558、MDX-1106及ONO-4538。納武單抗之製備及特性描述於美國專利案第8,008,449號及國際專利公開案第WO 2006/121168號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效已描述於Wang等人，《癌症免疫學研究(*Cancer Immunol Res.*)》**2014,** *2,* 846-56；Page等人，《醫學年評(*Ann. Rev. Med.*)》，**2014,** *65,* 185-202；及Weber等人，《臨床腫瘤學雜誌》，**2013,** *31,* 4311-4318中，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。納武單抗之胺基酸序列闡述於表26中。納武單抗在22-96、140-196、254-314、360-418、22''-96''、140''-196''、254''-314''及360''-418''處具有重鏈內雙硫鍵；在23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處具有輕鏈內雙硫鍵；在127-214'、127''-214'''處具有重鏈-輕鏈間雙硫鍵；在219-219''及222-222''處具有重鏈-重鏈間雙硫鍵；且在290、290''處具有N-醣基化位點(H CH2 84.4)。

【2449】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含SEQ ID NO:158所提供之重鏈及SEQ ID NO:159所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合

物。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:158及SEQ ID NO:159中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2450】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含納武單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:160中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:161中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少96%一

致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:161中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2451】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:162、SEQ ID NO:163及SEQ ID NO:164中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:165、SEQ ID NO:166及SEQ ID NO:167中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2452】在一些實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構參考納武單抗核準之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管

理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為納武單抗。

表26. 參考納武單抗之PD-1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:158 納武單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 440
SEQ ID NO:159 納武單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:160 納武單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSS	60 113
SEQ ID NO:161 納武單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK	60 107
SEQ ID NO:162 納武單抗重鏈 CDR1	NSGMH	5
SEQ ID NO:163 納武單抗重鏈 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17
SEQ ID NO:164 納武單抗重鏈 CDR3	NDDY	4

識別號	序列(單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:165 納武單抗輕鏈 CDR1	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:166 納武單抗輕鏈 CDR2	DASNRAT 7
SEQ ID NO:167 納武單抗輕鏈 CDR3	QQSSNWPRT 9

【2453】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2454】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或

其生物類似物，且納武單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2455】在一些實施例中，PD-1抑制劑為納武單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與納武單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2456】在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每2週以約240

mg進行投與。在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每4週以約480 mg進行投與。在一些實施例中，投與納武單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤，且每3週於同一天投與約1 mg/kg納武單抗，接著投與3 mg/kg伊匹木單抗，持續4次劑量，隨後每2週投與240 mg或每4週投與480 mg納武單抗。

【2457】在一些實施例中，投與納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2458】在一些實施例中，投與納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投與納武單抗且每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每3週以約360 mg投與納武單抗，加上每6週1 mg/kg伊匹木單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg或每4週以480 mg投與納武單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2

投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2459】在一些實施例中，投與納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療小細胞肺癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2460】在一些實施例中，每3週以約360 mg投與納武單抗且每6週投與1 mg/kg伊匹木單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2461】在一些實施例中，投與納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，接著每3週在同一天以約1 mg/kg投與伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與240 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，接著每3週在同一天以約1 mg/kg投與伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與240 mg、每4週投與480 mg納武單抗，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2462】在一些實施例中，投與納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在

切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2463】在一些實施例中，投與納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療復發性或轉移性頭頸鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2464】在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療局部晚期或轉移性尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之

前)1、2或3週投與納武單抗。

【2465】在一些實施例中，投與納武單抗以治療高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，投與納武單抗以治療成人及兒科患者中之高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2466】在一些實施例中，每2週以約3 mg/kg投與納武單抗以治療<40 kg之小兒患者之高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，接著每3週在同一天投與1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與240 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高小

形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，以約3 mg/kg投與納武單抗，接著每3週在同一天投與1 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投與480 mg納武單抗，以治療≥40 kg之成人及小兒患者之高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2467】在一些實施例中，投與納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投與納武單抗，接著每3週在同一天投與3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每2週投與納武單抗240 mg，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，以約1 mg/kg投與納武單抗，接著每3週在同一天投與3 mg/kg伊匹木單抗達4次劑量，隨後每4週投與480 mg納武單抗，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前

(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2468】在一些實施例中，投與納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每2週以約240 mg投與納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，每4週以約480 mg投與納武單抗以治療食道鱗狀細胞癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始納武單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始納武單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與納武單抗。

【2469】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含帕博利珠單抗(可自美國新澤西州凱尼爾沃思之默克公司以KEYTRUDA商購)或抗原結合片段、結合物或變異體。帕博利珠單抗經指派CAS登記號1374853-91-4且亦稱為蘭立珠單抗、MK-3475及SCH-900475。帕博利珠單抗具有免疫球蛋白G4抗(人類蛋白PDCD1 (計劃性細胞死亡1))抗體，含(人類家鼷鼠單株重鏈)雙硫鍵與人類家鼷鼠單株輕鏈二聚體結構。帕博利珠單抗之結構亦可描述為免疫球蛋白G4抗(人類計劃性細胞死亡1)抗體；含人類化小鼠單株[228-L-脯胺酸(H10-S>P)]γ4重鏈(134-218')雙硫鍵與人類化小鼠

單株κ輕鏈二聚體(226-226'':229-229'')雙二硫鍵。帕博利珠單抗之特性、用途及製備描述於國際專利公開案第WO 2008/156712 A1號、美國專利案第8,354,509號以及美國專利申請公開案第US 2010/0266617 A1號、第US 2013/0108651 A1號及第US 2013/0109843 A2號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。帕博利珠單抗在各種形式之癌症中的臨床安全性及功效描述於Fuerst,《腫瘤學時報(*Oncology Times*)》, **2014**, *36*, 35-36；Robert等人,《柳葉刀(*Lancet*)》, **2014**, 384, 1109-17；及Thomas等人,《生物治療專家意見(*Exp. Opin. Biol. Ther.*)》, **2014**, *14*, 1061-1064中。帕博利珠單抗之胺基酸序列闡述於表27中。帕博利珠單抗包括以下雙硫鍵：22-96、22''-96''、23'-92'、23'''-92'''、134-218'、134''-218'''、138'-198'、138'''-198'''、147-203、147''-203''、226-226''、229-229''、261-321、261''-321''、367-425及367''-425''；以及以下醣基化位點(N)：Asn-297及Asn-297''。帕博利珠單抗為在Fc區中含穩定化S228P突變的IgG4/κ同型；IgG4鉸鏈區中此突變之插入防止形成IgG4抗體通常觀測到之半分子。帕博利珠單抗在各重鏈之Fc域內於Asn297處異質醣基化，使得完整抗體之分子量為大約149 kDa。帕博利珠單抗之主要糖型為岩藻醣基化去半乳糖基雙線聚糖形式(G0F)。

【2470】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含SEQ ID NO:168所提供之重鏈及SEQ ID NO:169所載之輕鏈。在一

些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:168及SEQ ID NO:169中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2471】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含帕博利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:170中所示之序列，且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:171中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID

NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:170及SEQ ID NO:171中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2472】在一些實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:172、SEQ ID NO:173及SEQ ID NO:174中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:175、SEQ ID NO:176及SEQ ID NO:177中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2473】在一些實施例中，PD-1抑制劑為藥物管理機構參考帕博利珠單抗核準之抗PD-1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-1抗體，該抗PD-1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申

請授權之抗PD-1抗體，其中該抗PD-1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為帕博利珠單抗。

表27. 參考帕博利珠單抗之PD-1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:168 帕博利珠單抗重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 447
SEQ ID NO:169 帕博利珠單抗輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC	60 120 180 218
SEQ ID NO:170 帕博利珠單抗可變重鏈	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS	60 120
SEQ ID NO:171 帕博利珠單抗可變輕鏈	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K	60 111
SEQ ID NO:172 帕博利珠單抗重鏈CDR1	NYYMY	5

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:173 帕博利珠單抗重鏈 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK	16
SEQ ID NO:174 帕博利珠單抗重鏈 CDR3	RDYRFDMGFD Y	11
SEQ ID NO:175 帕博利珠單抗輕鏈 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH	15
SEQ ID NO:176 帕博利珠單抗輕鏈 CDR2	LASYLES	7
SEQ ID NO:177 帕博利珠單抗輕鏈 CDR3	QHSRDLPLT	9

【2474】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且帕博利珠單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之

前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2475】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中帕博利珠單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，且納武單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2476】在一些實施例中，PD-1抑制劑為帕博利珠單抗或其生物類似物，其中每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。

在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2477】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療黑色素瘤。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2478】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療NSCLC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2479】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療小細胞肺癌(SCLC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療SCLC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2480】在一些實施例中，投與帕博利珠單抗以治療頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)。在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療HNSCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2481】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱

隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg (至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療典型霍奇金氏淋巴瘤(cHL)或原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBCL)。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前) 1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2482】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療尿道上皮癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前) 1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2483】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修

復缺陷(dMMR)癌。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg (至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2484】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷大腸直腸癌(dMMR CRC。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療MSI-H或dMMR CRC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦

可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2485】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療胃癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2486】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療食道癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2487】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療子宮頸癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2488】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療肝細胞癌(HCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療HCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2489】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療默克氏細胞癌(Merkel cell carcinoma；MCC)。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，小

兒每3週以約2 mg/kg (至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療MCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2490】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療腎細胞癌(RCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗且每天兩次經口投與阿西替尼5 mg以治療RCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫

瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2491】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗且每天一次經口投與用於非MSI-H或dMMR腫瘤之樂伐替尼(lenvatinib)20 mg以治療子宮內膜癌。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2492】在一些實施例中，成人每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療高腫瘤突變負荷(TMB-H)癌症。在一些實施例中，成人每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，小兒每3週以約2 mg/kg (至多200 mg)投與帕博利珠單抗以治療TMB-H癌症。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2493】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療皮膚鱗狀細胞癌(cSCC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療cSCC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2494】在一些實施例中，每3週以約200 mg投與帕博利珠單抗以治療三陰性乳癌(TNBC)。在一些實施例中，每6週以約400 mg投與帕博利珠單抗以治療TNBC。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2495】在一些實施例中，若患者或個體為成人，亦即治療成人適應症，則可採用另外的每6週400 mg之給藥方案。在一些實施例中，在IL-2投與後1、2、3、4或5天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，在IL-2投與後

1、2或3天開始帕博利珠單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週投與帕博利珠單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週投與帕博利珠單抗。

【2496】在一些實施例中，PD-1抑制劑為可商購抗PD-1單株抗體，諸如抗m-PD-1純系J43 (目錄號BE0033-2)及RMP1-14 (目錄號BE0146)(美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.)。多種可商購抗PD-1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【2497】在一些實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利案第8,354,509號或美國專利申請公開案第2010/0266617 A1號、第2013/0108651 A1號、第2013/0109843 A2號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑為描述於美國專利案第8,287,856號、第8,580,247號及第8,168,757號以及美國專利申請公開案第2009/0028857 A1號、第2010/0285013 A1號、第2013/0022600 A1號及第2011/0008369 A1號中之抗PD-1抗體，該等專利之教示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，PD-1抑制劑為揭示於美國專利案第8,735,553 B1號中之抗PD-1抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑為皮立珠單抗，亦稱為CT-011，其描述於美國專利案第8,686,119號中，該專利之揭示內容以

引用之方式併入本文中。

【2498】在一些實施例中，PD-1抑制劑可為小分子或肽或肽衍生物，諸如美國專利案第8,907,053號、第9,096,642號及第9,044,442號以及美國專利申請公開案第US 2015/0087581號中所描述之小分子或肽或肽衍生物；1,2,4-惡二唑化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第2015/0073024號中所描述之1,2,4-惡二唑化合物及衍生物；環狀肽模擬化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0073042號中所描述之環狀肽模擬化合物及衍生物；環狀化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2015/0125491中所描述之環狀化合物及衍生物；1,3,4-惡二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/033301號中所描述之1,3,4-惡二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物；基於肽之化合物及衍生物，諸如國際專利申請公開案第WO 2015/036927號及第WO 2015/04490號中所描述之基於肽之化合物及衍生物；或基於肽之巨環化合物及衍生物，諸如美國專利申請公開案第US 2014/0294898號中所描述之基於肽之巨環化合物及衍生物；該等專利中之每一者之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-1抑制劑係西米普利單抗(cemiplimab)，其可商購自再生元公司(Regeneron, Inc.)。

【2499】在一些實施例中，TIL及PD-L1抑制劑或PD-L2抑制劑係以用於治療NSCLC之組合療法或協同療法投

與。

【2500】在一些實施例中，NSCLC尚未經歷先前療法。在一些實施例中，將PD-L1抑制劑或PD-L2抑制劑作為一線療法或初始療法投與。在一些實施例中，將PD-L1抑制劑或PD-L2抑制劑作為一線療法或初始療法與如本文中所描述之TIL組合投與。

【2501】在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑可為本領域已知的任何PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑之一。關於PD-L1及PD-L2抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之PD-L1或PD-L2抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變異體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及PD-L1或PD-L2抑制劑時亦可指代化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【2502】在一些實施例中，本文所描述之組合物、過程及方法包括PD-L1或PD-L2抑制劑。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為小分子。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為抗體(亦即抗PD-1抗體)、其片段，包括其Fab片段或單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為多株抗體。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑為單株抗體。在一些實施例中，PD-L1或

PD-L2抑制劑競爭結合PD-L1或PD-L2及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。在一些實施例中，抗體競爭結合PD-L1或PD-L2，及/或結合至PD-L1或PD-L2上之抗原決定基。

【2503】在一些實施例中，本文提供之PD-L1抑制劑對PD-L1具選擇性，因為化合物與PD-L1結合或相互作用之濃度相比其與包括PD-L2受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L1受體，該結合常數為相比結合至PD-L2受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【2504】在一些實施例中，本文提供之PD-L2抑制劑對PD-L2具選擇性，因為化合物與PD-L2結合或相互作用之濃度相比其與包括PD-L1受體之其他受體結合或相互作用之濃度低得多。在某些實施例中，化合物以如下結合常數結合至PD-L2受體，該結合常數為相比結合至PD-L1受體之濃度高至少約2倍之濃度、高約3倍之濃度、高約5倍之濃度、高約10倍之濃度、高約20倍之濃度、高約30倍之濃度、高約50倍之濃度、高約100倍之濃度、高約200倍之濃度、高約300倍之濃度或高約500倍之濃度。

【2505】不受任何理論束縛，咸信腫瘤細胞表現PD-L1，且T細胞表現PD-1。然而，腫瘤細胞對PD-L1之表現

不為PD-1或PD-L1抑制劑或阻斷劑之功效所需。在一些實施例中，腫瘤細胞表現PD-L1。在其他實施例中，腫瘤細胞並不表現PD-L1。在一些實施例中，方法可包括PD-1及PD-L1抗體(諸如本文中所描述之PD-1及PD-L1抗體)與TIL之組合。可同時或依序投與PD-1及PD-L1抗體與TIL之組合。

【2506】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約100 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約90 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約80 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約70 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約60 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約50 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2、以約40 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2，或以約30 pM或更低之KD結合人類PD-L1及/或PD-L2。

【2507】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約7.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-L1及/或PD-L2、以約8×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-L1及/或PD-L2、以約8.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-L1及/或PD-L2、以約9×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-L1及/或PD-L2、以約9.5×10^5 1/M·s或更快之k_{assoc}結合於人類PD-L1及/或PD-L2，或以約1×10^6 1/M·s或

更快之k_{assoc}結合於人類PD-L1及/或PD-L2。

【2508】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-L1或PD-L2、以約2.1×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.2×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.4×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.5×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.6×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-1、以約2.7×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-L1或PD-L2，或以約3×10^{-5} 1/s或更慢之k_{dissoc}結合於人類PD-L1或PD-L2。

【2509】在一些實施例中，PD-L1及/或PD-L2抑制劑為如下PD-L1及/或PD-L2抑制劑，該PD-L1及/或PD-L2抑制劑以約10 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約9 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約8 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約7 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約6 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約5 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約4 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約3

nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合、以約2 nM或更低之IC50阻斷或抑制人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合，或以約1 nM或更低之IC50阻斷人類PD-1或阻斷人類PD-L1或人類PD-L2與人類PD-1之結合。

【2510】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為德瓦魯單抗，亦稱為MEDI4736(其可=自馬裡蘭州蓋瑟斯堡阿斯特捷利康製藥公司子公司Medimmune, LLC商購)或其抗原結合片段、結合物或變異體。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利案第8,779,108號或美國專利申請公開案第2013/0034559號中之抗體，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之臨床功效已描述於Page等人，《年度醫學評論》，2014, 65, 185-202；Brahmer等人，《臨床腫瘤學雜誌》2014, 32, 5s(增刊，摘要8021)；及McDermott等人，《癌症治療評論(Cancer Treatment Rev.)》，2014, 40, 1056-64中。德瓦魯單抗之製備及特性描述於美國專利案第8,779,108號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。德瓦魯單抗之胺基酸序列闡述於表28中。德瓦魯單抗單株抗體包括22-96、22''-96''、23'-89'、23'''-89'''、135'-195'、135'''-195'''、148-204、148''-204''、215'-224、215'''-224''、230-230''、233-233''、265-325、265''-325''、371-429及371''-429'處之雙硫鍵；及Asn-301及Asn-301''處之N-醣基化位點。

【2511】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含SEQ ID

NO:178所提供之重鏈及SEQ ID NO:179所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:178及SEQ ID NO:179中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2512】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含德瓦魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:180中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:181中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L

區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:180及SEQ ID NO:181中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2513】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括分別具有SEQ ID NO:182、SEQ ID NO:183及SEQ ID NO:184中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:185、SEQ ID NO:186及SEQ ID NO:187中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2514】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考德瓦魯單抗核準之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化，

氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為德瓦魯單抗。

表28. 參考德瓦魯單抗之PD-L1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:178 德瓦魯單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:179 德瓦魯單抗輕鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC	60 120 180 240 265
SEQ ID NO:180 德瓦魯單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGELAFDY WGQGTLVTVS S	60 120 121
SEQ ID NO:181 德瓦魯單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK	60 108

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:182 德瓦魯單抗 重鏈 CDR1	RYWMS	5
SEQ ID NO:183 德瓦魯單抗 重鏈 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG	17
SEQ ID NO:184 德瓦魯單抗 重鏈 CDR3	EGGWFGELAF DY	12
SEQ ID NO:185 德瓦魯單抗 輕鏈 CDR1	RASQRVSSSY LA	12
SEQ ID NO:186 德瓦魯單抗 輕鏈 CDR2	DASSRAT	7
SEQ ID NO:187 德瓦魯單抗 輕鏈 CDR3	QQYGSLPWT	9

【2515】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿維魯單抗，亦稱為MSB0010718C (可自默克集團/雪蘭諾商購)或其抗原結合片段、結合物或變異體。阿維魯單抗之製備及特性描述於美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿維魯單抗之胺基酸序列闡述於表29中。阿維魯單抗具有22-96、147-203、264-324、370-428、22''-96''、147''-203''、264''-324''及370''-428''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；22'-90'、138'-197'、22'''-90'''及138'''-197'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；223-215' 及223''-215'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；229-229''及232-232''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；300、300''處之N-醣基化位點(H CH2 N84.4)；岩藻醣基化複合物雙線CHO類聚糖；及

450及450'處之H CHS K2 C端離胺酸裁剪。

【2516】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含SEQ ID NO:188所提供之重鏈及SEQ ID NO:189所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:188及SEQ ID NO:189中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2517】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含阿維魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(VH)包含SEQ ID NO:190中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(VL)包含SEQ ID NO:191中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在

一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:190及SEQ ID NO:191中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2518】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:192、SEQ ID NO:193及SEQ ID NO:194中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:195、SEQ ID NO:196及SEQ ID NO:197中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2519】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為藥物管理機構參考阿維魯單抗核準之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥

品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿維魯單抗。

表29. 參考阿維魯單抗之PD-L1抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:188 阿維魯單抗 重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:189 阿維魯單抗 輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS	60 120 180 216
SEQ ID NO:190 阿維魯單抗 可變重鏈	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS	60 120

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:191 阿維魯單抗 可變輕鏈	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMI YDVSNRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL	60 110
SEQ ID NO:192 阿維魯單抗 重鏈 CDR1	SYIMM	5
SEQ ID NO:193 阿維魯單抗 重鏈 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG	17
SEQ ID NO:194 阿維魯單抗 重鏈 CDR3	IKLGTVTTVD Y	11
SEQ ID NO:195 阿維魯單抗 輕鏈 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
SEQ ID NO:196 阿維魯單抗 輕鏈 CDR2	DVSNRPS	7
SEQ ID NO:197 阿維魯單抗 輕鏈 CDR3	SSYTSSSTRV	10

【2520】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為阿特珠單抗，亦稱為MPDL3280A或RG7446(其可自瑞士巴塞爾羅氏之子公司基因泰克公司以TECENTRIQ商購)或其抗原結合片段、結合物或變異體。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利案第8,217,149號中之抗體，該專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，PD-L1抑制劑為揭示於美國專利申請公開案第2010/0203056 A1號、第2013/0045200 A1號、第2013/0045201 A1號、第2013/0045202 A1號或第2014/0065135 A1號中之抗體，該等專利之揭示內容特別以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之製備及特性描述於美國專利案第

8,217,149號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。阿替利珠單抗之胺基酸序列闡述於表30中。阿替利珠單抗具有22-96、145-201、262-322、368-426、22''-96''、145''-201''、262''-322''及368''-426''處之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''處之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；221-214'及221''-214'''處之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；227-227''及230-230''處之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11，h 14)；及298及298'處之N-醣基化位點(H CH2 N84.4>A)。

【2521】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含SEQ ID NO:198所提供之重鏈及SEQ ID NO:199所載之輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列的重鏈及輕鏈，或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ ID NO:199中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:198及SEQ

ID NO:199中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2522】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含阿替利珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:200中所示之序列，且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:201中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:200及SEQ ID NO:201中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2523】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:202、SEQ ID NO:203及SEQ ID NO:204中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:205、SEQ ID NO:206及SEQ ID NO:207中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：PD-L1上與任何前述抗

體相同之抗原決定基。

【2524】在一些實施例中，抗PD-L1抗體為藥物管理機構參考阿替利珠單抗核準之抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗PD-L1抗體，該抗PD-L1抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化，氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為阿替利珠單抗。

表 30. 參考阿替利珠單抗之 PD-L1 抑制劑的胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:198 阿替利珠單抗重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 448
SEQ ID NO:199 阿替利珠單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:200 阿替利珠單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA	60 118
SEQ ID NO:201 阿替利珠單抗可變輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR	60 108
SEQ ID NO:202 阿替利珠單抗重鏈 CDR1	GFTFSDSWIH	10
SEQ ID NO:203 阿替利珠單抗重鏈 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG	18
SEQ ID NO:204 阿替利珠單抗重鏈 CDR3	RHWPGGFDY	9
SEQ ID NO:205 阿替利珠單抗輕鏈 CDR1	RASQDVSTAV A	11
SEQ ID NO:206 阿替利珠單抗輕鏈 CDR2	SASFLYS	7
SEQ ID NO:207 阿替利珠單抗輕鏈 CDR3	QQYLYHPAT	9

【2525】在一些實施例中，PD-L1抑制劑包括美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1號中所描述之彼等抗體，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在其他實施例中，亦包括與此等抗體中之任一種競爭結合至PD-L1的抗體。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為MDX-1105，亦稱為BMS-935559，其揭示於美國專利案第US 7,943,743號中，該專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，抗PD-L1抗體係選自揭示於美國專利案第US 7,943,743號中之抗PD-L1抗體，該專利以引用之方式併入本文中。

【2526】在一些實施例中，PD-L1抑制劑為可商購單株抗體，諸如INVIVOMAB抗m-PD-L1純系10F.9G2（目錄號BE0101，美國新罕布夏州西黎巴嫩的Bio X Cell, Inc.）。在一些實施例中，抗PD-L1抗體為可商購單株抗體，諸如AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MIH1)。多種可商購抗PD-L1抗體為本領域一般熟習此項技術者所知。

【2527】在一些實施例中，PD-L2抑制劑為可商購單株抗體，諸如BIOLEGEND 24F.10C12小鼠IgG2aκ同型(目錄號329602，加利福尼亞聖地亞哥Biolegend, Inc.)、SIGMA抗PD-L2抗體(目錄號SAB3500395，密蘇裡州聖路易斯西格瑪奧瑞奇公司)或本領域一般熟習此項技術者已知的其他可商購抗PD-L2抗體。

2. 與CTLA-4抑制劑之組合

【2528】在一些實施例中，提供給癌症患者之TIL療法可包括單獨用治療性TIL群體治療，或可包括組合治療，包括TIL及一或多種CTLA-4抑制劑。

【2529】細胞毒性T淋巴球抗原4(CTLA-4)為免疫球蛋白超家族成員且表現於輔助T細胞表面上。CTLA-4為CD28依賴性T細胞活化之負向調節因子且充當適應性免疫反應之檢查點。類似於T細胞共刺激蛋白CD28，CTLA-4結合抗原在細胞上呈遞CD80及CD86。CTLA-4將抑制因子信號遞送至T細胞，而CD28遞送刺激信號。針對人類CTLA-4之人類抗體已描述為許多疾病病狀之免疫刺激調節劑，諸如治療或預防病毒及細菌感染且治療癌症(WO 01/14424及WO 00/37504)。已在臨床試驗中研究多種完全人類抗人類CTLA-4單株抗體(mAb)，用於治療各種類型的實體腫瘤，該等抗體包括(但不限於)伊匹木單抗(ipilimumab) (MDX-010)及曲美單抗(tremelimumab) (CP-675,206)。

【2530】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑可為本領域已知的任何CTLA-4抑制劑或CTLA-4阻斷劑。詳言之，其為在以下段落中更詳細描述的CTLA-4抑制劑或阻斷劑之一。關於CTLA-4抑制劑，術語「抑制劑」、「拮抗劑」及「阻斷劑」在本文中可互換使用。為了避免疑問，本文中提及作為抗體之CTLA-4抑制劑時可指代化合物或其抗原結合片段、變異體、結合物或生物類似物。為了避免疑問，本文中提及CTLA-4抑制劑時亦可指代小分子化

合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【2531】適用於本發明之方法的CTLA-4抑制劑包括(但不限於)抗CTLA-4抗體、人類抗CTLA-4抗體、小鼠抗CTLA-4抗體、哺乳動物抗CTLA-4抗體、人類化抗CTLA-4抗體、單株抗CTLA-4抗體、多株抗CTLA-4抗體、嵌合抗CTLA-4抗體、MDX-010(伊匹木單抗)、曲美單抗、抗CD28抗體、抗CTLA-4阿德奈汀、抗CTLA-4域抗體、單鏈抗CTLA-4片段、重鏈抗CTLA-4片段、輕鏈抗CTLA-4片段、促效共刺激路徑之CTLA-4抑制劑、揭示於PCT公開案第WO 2001/014424號中之抗體、揭示於PCT公開案第WO 2004/035607號中之抗體、揭示於美國公開案第2005/0201994號中之抗體及揭示於授與歐洲專利第EP 1212422 B1號中之抗體，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。另外的CTLA-4抗體描述於美國專利案第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號中；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號中；及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號中，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。可用於本發明方法中之其他抗CTLA-4抗體包括例如揭示於以下中之抗體：WO 98/42752；美國專利案第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，95(17):10067-10071 (1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》，

22(145): 摘要號2505 (2004)(抗體CP-675206)；Mokyr等人，《癌症研究》，58:5301-5304 (1998)；及美國專利案第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號，該等專利中之每一者的揭示內容以引用之方式併入本文中。

【2532】另外的CTLA-4抑制劑包括(但不限於)以下：通常由於經活化而能夠破壞CD28抗原結合至其同源配位體之能力、抑制CTLA-4結合至其同源配位體之能力、增強經由共刺激路徑之T細胞反應、破壞B7結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞B7活化共刺激路徑之能力、破壞CD80結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD80活化共刺激路徑之能力、破壞CD86結合至CD28及/或CTLA-4之能力、破壞CD86活化共刺激路徑之能力及破壞共刺激路徑的任何抑制劑。此必定包括：CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員之小分子抑制劑；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的抗體；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的反義分子；針對CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的阿德奈汀；CD28、CD80、CD86、CTLA-4以及共刺激路徑之其他成員的RNAi抑制劑(單股及雙股)；以及其他CTLA-4抑制劑。

【2533】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑以如下Kd結合於CTLA-4，該Kd為約10^{-6} M或更小、10^{-7} M或更小、

10^{-8} M或更小、10^{-9} M或更小、10^{-10} M或更小、10^{-11} M或更小、10^{-12} M或更小，例如10^{-13} M與10^{-16} M之間，或在任兩個前述值作為端點的任何範圍內。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd不超過伊匹木單抗之Kd之10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，CTLA-4抑制劑結合至CTLA-4的Kd與伊匹木單抗之Kd大致相同或更小(例如低至多10倍或低至多100倍)。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC50值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC50值高不超過10倍。在一些實施例中，當使用相同分析比較時，與CTLA-4分別與CD80或CD86結合的伊匹木單抗介導之抑制的IC50值相比，CTLA-4抑制劑抑制CTLA-4與CD80或CD86之結合的IC50值大致相同或更小(例如，低至多10倍或低至多100倍)。

【2534】在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4抑制劑，該量足以相對於適合之對照將CTLA-4之表現抑制及/或使CTLA-4之生物活性降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如50%與75%、75%與90%或90%與100%之間。在一些實施例中，以如下量使用CTLA-4路徑抑制劑，該量足以藉由使CTLA-4與CD80、CD86或兩者之結合相對於適合之對照減少至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，例如相對於適合之對照減少50%與75%、75%與

90%或90%與100%之間來降低CTLA-4之生物活性。在評估或量化所關注之藥劑之效應的上下文中之適合對照通常為尚未暴露於所關注之藥劑(例如CTLA-4路徑抑制劑)或用該藥劑處理的相當之生物系統(例如細胞或個體)(或已暴露於可忽略量或用可忽略量進行處理)。在一些實施例中，生物系統可充當其自身之對照，例如可在暴露於藥劑或用藥劑處理之前評估生物系統並與開始或結束暴露或處理之後的狀態進行比較。在一些實施例中，可使用歷史對照。

【2535】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗(可自百時美施貴寶公司以Yervoy商購)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變異體。如此項技術中已知，伊匹木單抗係指抗CTLA-4抗體，一種來源於具有編碼重鏈及輕鏈之人類基因以產生功能性人類譜系之轉殖基因小鼠的完全人類IgG1κ抗體。伊匹木單抗亦可藉由其CAS登記號477202-00-9及在PCT公開案第WO 01/14424中提及，該公開案出於所有目的以全文引用之方式併入。其以抗體10DI之形式揭示。特定言之，伊匹木單抗含有輕鏈可變區及重鏈可變區(具有包含SEQ ID NO:211之輕鏈可變區且具有包含SEQ ID NO:210之重鏈可變區)。伊匹木單抗之醫藥組合物包括含有伊匹木單抗及一或多種稀釋劑、媒劑或賦形劑的所有醫藥學上可接受之組合物。含有伊匹木單抗之醫藥組合物之實例描述於國際專利申請公開案第WO 2007/67959號中。伊匹木單抗可靜脈內(IV)投與。

【2536】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含SEQ

ID NO:208所提供之重鏈及SEQ ID NO:209所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:208及SEQ ID NO:209中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2537】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含伊匹木單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:210中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:211中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ

ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:210及SEQ ID NO:211中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2538】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:212、SEQ ID NO:213及SEQ ID NO:214中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:215、SEQ ID NO:216及SEQ ID NO:217中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2539】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考伊匹木單抗核準之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，一或

多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。伊匹木單抗之胺基酸序列闡述於表31中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為伊匹木單抗。

表31. 伊匹木單抗之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:208 伊匹木單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH 225
SEQ ID NO:209 伊匹木單抗輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 120 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL 180 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 215
SEQ ID NO:210 伊匹木單抗可變重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:211 伊匹木單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK 108

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:212 伊匹木單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYT	8
SEQ ID NO:213 伊匹木單抗重鏈 CDR2	TFISYDGNNK	10
SEQ ID NO:214 伊匹木單抗重鏈 CDR3	ARTGWLGPFD Y	11
SEQ ID NO:215 伊匹木單抗輕鏈 CDR1	QSVGSSY	7
SEQ ID NO:216 伊匹木單抗輕鏈 CDR2	GAF	3
SEQ ID NO:217 伊匹木單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT	9

【2540】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5 mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2541】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，其中伊匹木單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且伊匹木單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2542】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為伊匹木單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與伊匹木單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2543】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約mg/kg投與伊匹木單抗，持續最多4次劑量以治療不可切除性或轉移性黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或

5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2544】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，每3週以約10 mg/kg投與伊匹木單抗，持續4次劑量，接著每12週投與10 mg/kg，持續至多3年，以輔助治療黑色素瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2545】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，每3週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗，緊接著在同一天投與3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療晚期腎細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，可根據標準給藥方案針對晚期腎細胞癌及/或腎細胞癌以單一試劑形式投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2546】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約1

mg/kg靜脈內投與伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投與3 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌。在一些實施例中，在完成組合物之4次劑量之後，如根據標準給藥方案所推薦針對高小形隨體不穩定性(MSI-H)或錯配修復缺陷(dMMR)轉移性大腸直腸癌以單一試劑形式投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2547】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療肝細胞癌。在一些實施例中，每3週經30分鐘以約3 mg/kg靜脈內投與伊匹木單抗，緊接著在同一天經30分鐘靜脈內投與1 mg/kg納武單抗，持續4次劑量，以治療肝細胞癌。在一些實施例中，在完成組合之4次劑量之後，根據標準給藥方案針對肝細胞癌以單一試劑形式投與納武單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2548】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗且每2週投與3 mg/kg納武單抗，以治療轉

移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗，加上每3週360 mg納武單抗與2個週期之含鉑雙重化療，以治療轉移性非小細胞肺癌。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2549】在一些實施例中，投與伊匹木單抗以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，每6週以約1 mg/kg投與伊匹木單抗且每3週投與360 mg納武單抗，以治療惡性胸膜間皮瘤。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始伊匹木單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始伊匹木單抗投與。

【2550】曲美單抗(亦稱為CP-675,206)為完全人類IgG2單株抗體且CAS編號為745013-59-6。曲美單抗以抗體11.2.1形式揭示於美國專利案第6,682,736號(以引用之方式併入本文中)中。曲美單抗之重鏈及輕鏈之胺基酸序列分別闡述於SEQ IND NO:218及219中。已在臨床試驗中針對治療包括黑色素瘤及乳癌之各種腫瘤研究了曲美單抗；其中每4或12週以0.01與15 mg/kg之間的劑量範圍呈單次劑量或多次劑量靜脈內投與曲美單抗。在本發明提供之方案中，局部投與，尤其是皮內或皮下投與曲美單抗。皮內或

皮下投與之曲美單抗的有效量通常在每人5-200毫克/劑的範圍內。在一些實施例中，曲美單抗之有效量在每人每劑10-150毫克/劑的範圍內。在一些特定實施例中，曲美單抗之有效量為每人約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175或200毫克/劑。

【2551】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含SEQ ID NO:218所提供之重鏈及SEQ ID NO:219所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:218及SEQ ID NO:219中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2552】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含曲美單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，

CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:220中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:221中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:220及SEQ ID NO:221中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2553】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:222、SEQ ID NO:223及SEQ ID NO:224中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:225、SEQ ID NO:226及SEQ ID NO:227中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2554】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考曲美單抗核準之抗CTLA-4生物類似物單株抗

體。在一些實施例中，生物類似物包含抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。曲美單抗之胺基酸序列闡述於表32中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為曲美單抗。

表 32. 曲美單抗之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)	
SEQ ID NO:218 曲美單抗重鏈	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGTT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTFRVVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
SEQ ID NO:219 曲美單抗輕鏈	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC	60 120 180 214
SEQ ID NO:220 曲美單抗可變重鏈	GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH	60 120 167
SEQ ID NO:221 曲美單抗可變輕鏈	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKV	60 120 139
SEQ ID NO:222 曲美單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYGMH	10
SEQ ID NO:223 曲美單抗重鏈 CDR2	VIWYDGSNKY YADSV	15
SEQ ID NO:224 曲美單抗重鏈 CDR3	DPRGATLYYY YYGMDV	16
SEQ ID NO:225 曲美單抗輕鏈 CDR1	RASQSINSYL D	11
SEQ ID NO:226 曲美單抗輕鏈 CDR2	AASSLQS	7
SEQ ID NO:227 曲美單抗輕鏈 CDR3	QQYYSTPFT	9

【2555】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以約0.5 mg/kg至約10 mg/kg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投與：約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約1.5 mg/kg、約2 mg/kg、約2.5 mg/kg、約3 mg/kg、約3.5 mg/kg、約4 mg/kg、約4.5

mg/kg、約5 mg/kg、約5.5 mg/kg、約6 mg/kg、約6.5 mg/kg、約7 mg/kg、約7.5 mg/kg、約8 mg/kg、約8.5 mg/kg、約9 mg/kg、約9.5 mg/kg或約10 mg/kg。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始曲美單抗投與。

【2556】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，其中曲美單抗係以約200 mg至約500 mg之劑量投與。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且曲美單抗係以如下劑量投與：約200 mg、約220 mg、約240 mg、約260 mg、約280 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg或約500 mg。在一些實施例中，在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始曲美單抗投與。

【2557】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為曲美單抗或其生物類似物，且每2週、每3週、每4週、每5週或每6週投與曲美單抗。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2、3、4或5週開始曲美單抗投與。在一些實施例中，亦可在切除前(亦即，在自個體或患者獲得腫瘤樣品之前)1、2或3週開始曲

美單抗投與。

【2558】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為來自Agenus之澤弗利單抗(zalifrelimab)或其生物類似物、抗原結合片段、結合物或變異體。澤弗利單抗為完全人類單株抗體。澤弗利單抗經指派化學文摘社(CAS)登記號2148321-69-9且亦稱為AGEN1884。澤弗利單抗之製備及特性描述於美國專利案第10,144,779號及美國專利申請公開案第US2020/0024350 A1號中，該等專利之揭示內容以引用之方式併入本文中。

【2559】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含SEQ ID NO:228所提供之重鏈及SEQ ID NO:229所載之輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列的重鏈及輕鏈或其抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變異體或結合物。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少99%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少98%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少97%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少96%一致的重鏈及輕鏈。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID

NO:228及SEQ ID NO:229中所示之序列至少95%一致的重鏈及輕鏈。

【2560】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含澤弗利單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:230中所示之序列，且CTLA-4抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:231中所示之序列及其保守性胺基酸取代。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少99%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少98%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少97%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少96%一致的V_H區及V_L區。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:230及SEQ ID NO:231中所示之序列至少95%一致的V_H區及V_L區。

【2561】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:231、SEQ ID NO:233及SEQ ID NO:234中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的重鏈CDR1、CDR2及CDR3域；及分別具有SEQ ID NO:235、SEQ ID NO:236及SEQ ID NO:237中所闡述之序列及其保守性胺基酸取代的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3域。在一些實施例中，抗體

競爭以與以下結合及/或結合至以下：CTLA-4上與任何前述抗體相同之抗原決定基。

【2562】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為藥物管理機構參考澤弗利單抗核準之CTLA-4生物類似物單株抗體。在一些實施例中，生物類似物包含抗CTLA-4抗體，該抗CTLA-4抗體包含與參考藥品或參考生物產品之胺基酸序列具有至少97%序列一致性，例如97%、98%、99%或100%序列一致性的胺基酸序列，且其相較於該參考藥品或參考生物產品包含一或多個轉譯後修飾，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，一或多個轉譯後修飾係選自以下中之一者或多者：醣基化、氧化、脫醯胺作用及截短。澤弗利單抗之胺基酸序列闡述於表33中。在一些實施例中，生物類似物為獲得授權或申請授權之抗CTLA-4抗體，其中該抗CTLA-4抗體提供於一種與參考藥品或參考生物產品之調配物不同的調配物中，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。抗CTLA-4抗體可獲得藥物管理機構，諸如美國FDA及/或歐盟EMA授權。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為澤弗利單抗。在一些實施例中，生物類似物提供為進一步包含一或多種賦形劑之組合物，其中該一或多種賦形劑與參考藥品或參考生物產品中包含的賦形劑相同或不同，其中該參考藥品或參考生物產品為

澤弗利單抗。

表 33. 澤弗利單抗之胺基酸序列。

識別號	序列(單字母胺基酸符號)
SEQ ID NO:228 澤弗利單抗重鏈	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:229 澤弗利單抗輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:230 澤弗利單抗可變重鏈	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS 118
SEQ ID NO:231 澤弗利單抗可變輕鏈	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQKP GQAPRLLIYG ASTRATGIPD 60 RFSGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWTFGQ GTKVEIK 107
SEQ ID NO:232 澤弗利單抗重鏈 CDR1	GFTFSSYS 8
SEQ ID NO:233 澤弗利單抗重鏈 CDR2	ISSSSSYI 8
SEQ ID NO:234 澤弗利單抗重鏈 CDR3	ARVGLMGPFD I 11
SEQ ID NO:235 澤弗利單抗輕鏈 CDR1	QSVSRY 6
SEQ ID NO:236 澤弗利單抗輕鏈 CDR2	GAS 3
SEQ ID NO:237 澤弗利單抗輕鏈 CDR3	QQYGSSPWT 9

【2563】另外的抗CTLA-4抗體之實例包括(但不限於)：AGEN1181、BMS-986218、BCD-145、ONC-392、CS1002、REGN4659及ADG116，其為本領域一般熟習此項技術者已知。

【2564】在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為揭示於

以下專利公開案中之任一者中的抗CTLA-4抗體：US 2019/0048096 A1；US 2020/0223907；US 2019/0201334；US 2019/0201334；US 2005/0201994；EP 1212422 B1；WO 2018/204760；WO 2018/204760；WO 2001/014424；WO 2004/035607；WO 2003/086459；WO 2012/120125；WO 2000/037504；WO 2009/100140；WO 2006/09649；WO2005092380；WO 2007/123737；WO 2006/029219；WO 2010/0979597；WO 2006/12168；及WO1997020574，其中之每一者以引用的方式併入本文中。另外的CTLA-4抗體描述於以下中：美國專利案第5,811,097號、第5,855,887號、第6,051,227號及第6,984,720號；PCT公開案第WO 01/14424號及第WO 00/37504號；以及美國公開案第2002/0039581號及第2002/086014號；及/或美國專利案第5,977,318號、第6,682,736號、第7,109,003號及第7,132,281號，其中之每一者以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，抗CTLA-4抗體為例如揭示於以下中之彼等抗體：WO 98/42752；美國專利案第6,682,736號及第6,207,156號；Hurwitz等人，《美國國家科學院院刊》，**1998,** *95,* 10067-10071 (1998)；Camacho等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2004,** 22, 145 (摘要第2505號(2004) (抗體CP-675206)；或Mokyr等人，《癌症研究(*Cancer Res.*)》，**1998,** 58, 5301-5304 (1998)，其中之每一者以引用的方式併入本文中。

【2565】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為如WO

1996/040915(以引用之方式併入本文中)中所揭示之CTLA-4配位體。

【2566】在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為CTLA-4表現之核酸抑制劑。舉例而言，抗CTLA-4 RNAi分子可呈描述於以下之分子的形式：PCT公開案第WO 1999/032619號及第WO 2001/029058號；美國公開案第2003/0051263號、第2003/0055020號、第2003/0056235號、第2004/265839號、第2005/0100913號、第2006/0024798號、第2008/0050342號、第2008/0081373號、第2008/0248576號及第2008/055443號；及/或美國專利案第6,506,559號、第7,282,564號、第7,538,095號及第7,560,438號(以引用之方式併入本文中)。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈在歐洲專利案第EP 1309726號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些情況下，抗CTLA-4 RNAi分子呈在美國專利案第7,056,704號及第7,078,196號(以引用之方式併入本文中)中描述之雙股RNAi分子形式。在一些實施例中，CTLA-4抑制劑為PCT公開案第WO 2004/081021號(以引用之方式併入本文中)中所描述之適體。

【2567】在其他實施例中，本發明之抗CTLA-4 RNAi分子為在美國專利案第5,898,031號、第6,107,094號、第7,432,249號及第7,432,250號以及歐洲申請案第EP 0928290號(以引用之方式併入本文中)中描述之RNA分子。

3. 患者之淋巴球耗減預調節

【2568】在一些實施例中，本發明包括一種用TIL群體治療癌症之方法，其中患者在輸注根據本揭示案之TIL之前經非清髓性化療預治療。在一些實施例中，本發明包括用於治療已用非清髓性化療預治療之患者之癌症的TIL群體。在一些實施例中，TIL群體係藉由輸注投與。在一些實施例中，非清髓性化療為環磷醯胺60 mg/kg/d持續2天(在TIL輸注前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m2/d持續5天(在TIL輸注前第27至23天)。在一些實施例中，在根據本揭示案之非清髓性化療及TIL輸注(第0天)之後，患者每8小時以720,000 IU/kg靜脈內接受IL-2(阿地介白素，可以PROLEUKIN商購)之靜脈內輸注以達到生理耐受。在某些實施例中，TIL群體用於與IL-2組合治療癌症，其中IL-2係在TIL群體之後投與。

【2569】在一些實施例中，患者接受強度降低之非清髓性淋巴球耗減方案。在一些實施例中，強度降低之非清髓性淋巴球耗減方案包含以約250-750毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺。在一些實施例中，環磷醯胺以約250毫克/平方公尺/天之劑量投與。在一些實施例中，環磷醯胺以約500毫克/平方公尺/天之劑量投與。在一些實施例中，環磷醯胺以約750毫克/平方公尺/天之劑量投與。在一些實施例中，環磷醯胺經投與三天或四天。在一些實施例中，環磷醯胺投與後接著以30毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱。在一些實施例中，氟達拉濱經投與三天、四

天或五天。在一些實施例中，環磷醯胺與美司鈉一起投與。在一些實施例中，患者不接受非清髓性淋巴球耗減方案。

【2570】實驗發現表明，在授受性轉移腫瘤特異性T淋巴球之前，淋巴球耗減藉由消除調節性T細胞且競爭免疫系統之元件(『細胞介素庫』)在增強治療功效方面發揮關鍵作用。因此，本發明之一些實施例在引入本發明之TIL之前在患者身上採用淋巴球耗減步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調節」)。

【2571】一般而言，使用氟達拉濱或環磷醯胺(活性形式稱為馬磷醯胺)及其組合之投與實現淋巴球耗減。此類方法描述於Gassner等人，《癌症免疫學及免疫治療》**2011**, 60, 75-85、Muranski等人，《自然臨床實踐腫瘤學》,**2006,** 3, 668-681、Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2008**, *26,* 5233-5239及Dudley等人，《臨床腫瘤學雜誌》**2005**, *23,* 2346-2357中，所有該等文獻以全文引用之方式併入本文中。

【2572】在一些實施例中，氟達拉濱係以0.5 μg/mL至10 μg/mL氟達拉濱之濃度投與。在一些實施例中，氟達拉濱係以1 μg/mL氟達拉濱之濃度投與。在一些實施例中，投與氟達拉濱治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，氟達拉濱係以10毫克/公斤/天、15毫克/公斤/天、20毫克/公斤/天、25毫克/公斤/天、30毫克/公斤/天、35毫克/公斤/天、40毫克/公斤/天或45毫克/公斤/天之劑量投與。在一些實施例中，氟達拉濱治療

係以35毫克/公斤/天投與2至7天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35毫克/公斤/天投與4至5天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以25毫克/公斤/天投與4至5天。

【2573】在一些實施例中，藉由投與環磷醯胺獲得濃度為0.5 μg/mL至10 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，藉由投與環磷醯胺獲得濃度為1 μg/mL的環磷醯胺之活性形式馬磷醯胺。在一些實施例中，投與環磷醯胺治療1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在一些實施例中，環磷醯胺係以100毫克/平方公尺/天、150毫克/平方公尺/天、175毫克/平方公尺/天、200毫克/平方公尺/天、225毫克/平方公尺/天、250毫克/平方公尺/天、275毫克/平方公尺/天或300毫克/平方公尺/天之劑量投與。在一些實施例中，環磷醯胺係靜脈內(亦即i.v.)投與。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以35毫克/公斤/天投與2至7天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250毫克/平方公尺/天靜脈內投與4至5天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250毫克/平方公尺/天靜脈內投與4天。

【2574】在一些實施例中，藉由將氟達拉濱及環磷醯胺一起投與給患者進行淋巴球耗減。在一些實施例中，經4天以25毫克/平方公尺/天靜脈內投與氟達拉濱且以250毫克/平方公尺/天靜脈內投與環磷醯胺。

【2575】在一些實施例中，藉由以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天，接著以25毫克/平方公尺/天

之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗減。

【2576】在一些實施例中，藉由以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗減，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗減。

【2577】在一些實施例中，藉由以約50毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗減，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗減。

【2578】在一些實施例中，藉由以約50毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約20毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗減，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗減。

【2579】在一些實施例中，藉由以約40毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約20毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗減，其中在前兩天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗減。

【2580】在一些實施例中，藉由以約40毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天及以約15毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天來進行淋巴球耗減，其中在前兩

天投與環磷醯胺及氟達拉濱兩者，且其中在總計五天中進行淋巴球耗減。

【2581】在一些實施例中，藉由持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱三天來進行淋巴球耗減。

【2582】在一些實施例中，環磷醯胺係與美司鈉(mesna)一起投與。在一些實施例中，美司鈉係以15 mg/kg投與。在一些實施例中，輸注美司鈉，且若連續輸注，則歷經24小時，伴隨各自環磷醯胺劑量開始，美司鈉可經大約2小時與環磷醯胺一起輸注(第-5天及/或第-4天)，隨後在剩餘22小時以3毫克/公斤/小時之速率輸注。

【2583】在一些實施例中，淋巴球耗減包含以下步驟：始於在向患者投與第三TIL群體之後當天，用IL-2方案治療患者。

【2584】在一些實施例中，淋巴球耗減包含以下步驟：始於向患者投與第三TIL群體當天，用IL-2方案治療患者。

【2585】在一些實施例中，淋巴球耗減包含5天之預調節治療。在一些實施例中，天數指示為第-5天至第-1天，或第0天至第4天。在一些實施例中，該方案包含第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包含第-5天及第-4天(亦即第0天及第1天)的靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，該方案包含第-5天及

第-4天(亦即第0天及第1天)的60 mg/kg靜脈內環磷醯胺。在一些實施例中，環磷醯胺係與美司鈉一起投與。在一些實施例中，該方案進一步包含氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。在一些實施例中，該方案進一步包含第-5天及第-1天(亦即第0天至第4天)的25 mg/m^{2}靜脈內氟達拉濱。

【2586】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天。

【2587】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱(fludarabine)五天。

【2588】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【2589】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投

與環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱三天。

【2590】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱一天。

【2591】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱三天。

【2592】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：持續兩天以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺及以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱三天。

【2593】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表34投與。

表34. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺60 mg/kg	X	X								
美司鈉(按需要)	X	X								
氟達拉濱25毫克/平方公尺/天	X	X	X	X	X					
TIL輸注						X				

【2594】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表35投與。

表35. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺60 mg/kg	X	X							
美司鈉(按需要)	X	X							
氟達拉濱25毫克/平方公尺/天	X	X	X	X					
TIL輸注					X				

【2595】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表36投與。

表36. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺60 mg/kg	X	X						
美司鈉(按需要)	X	X						
氟達拉濱25毫克/平方公尺/天	X	X	X					
TIL輸注				X				

【2596】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表37投與。

表37. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺60 mg/kg	X	X								
美司鈉(按需要)	X	X								
氟達拉濱25毫克/平方公尺/天			X	X	X					
TIL輸注						X				

【2597】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表38投與。

表38. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺300 mg/kg	X	X								
美司鈉(按需要)	X	X								
氟達拉濱30毫克/平方公尺/天	X	X	X	X	X					
TIL輸注						X				

【2598】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表39投與。

表38. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺300 mg/kg	X	X							
美司鈉(按需要)	X	X							
氟達拉濱30毫克/平方公尺/天	X	X	X	X					
TIL輸注					X				

【2599】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表40投與。

表40. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺300 mg/kg	X	X						
美司鈉(按需要)	X	X						
氟達拉濱30毫克/平方公尺/天	X	X	X					
TIL輸注				X				

【2600】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案係根據表41投與。

表41. 例示性淋巴球耗減及治療方案。

天	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
環磷醯胺300 mg/kg	X	X								
美司鈉(按需要)	X	X								
氟達拉濱30毫克/平方公尺/天			X	X	X					
TIL輸注						X				

【2601】在一些實施例中，與前述清髓性淋巴球耗減方案之實施例一起使用之TIL輸注可為本文中所描述之任何TIL組合物，以及添加IL-2方案及投與如本文中所描述的共同療法(諸如，PD-1及PD-L1抑制劑)。

【2602】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注日之前1、2或3天之過程中投與美法侖(melphalan)至總劑量為100 mg/m^2。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注日之前1、2或3天之過程中投與美法侖至總劑量為200 mg/m^2。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注日之前1、2或3天之過程中投與美法侖至總劑量為100 mg/m^{2}且以30毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注日之前1、2或3天之過程中投與美法侖至總劑量為200 mg/m^{2}且以30毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱。

【2603】在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含投與抗CD45抗體。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含投與抗CD45抗體-藥物結合物。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含投與抗CD45抗體-

放射性同位素結合物。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含投與阿帕米單抗(apamistamab)-^{131}I。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注前2天與9天之間以25 mCi、50 mCi、75 mCi、100 mCi、150 mCi或200 mCi之劑量投與之阿帕米單抗-^{131}I。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注前2天與9天之間以25 mCi至200 mCi之劑量投與之阿帕米單抗-^{131}I。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注前4天與8天之間以50 mCi至150 mCi之劑量投與之阿帕米單抗-^{131}I。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注前約6天以約75 mCi之劑量投與之阿帕米單抗-^{131}I。在一些實施例中，非清髓性淋巴球耗減方案包含在TIL輸注前約7天以約100 mCi之劑量投與之阿帕米單抗-^{131}I。

【2604】在一些實施例中，與清髓性淋巴球耗減方案之前述實施例一起使用的TIL輸注可為本文中所描述之任何TIL組合物，包括經基因修飾以包括一或多種附接於其表面之免疫調節劑之TIL產品，且亦可包括MIL及PBL之輸注以替代TIL輸注，以及添加替代淋巴球耗減方案，包括抗CD52抗體阿侖單抗(alemtuzumab)或其變異體、片段、抗體-藥物結合物或生物類似物。

4. IL-2方案

【2605】在一些實施例中，IL-2方案包含高劑量IL-2

方案，其中高劑量IL-2方案包含阿地介白素或其生物類似物或變異體，其在投與治療性TIL群體之治療有效部分之後當天開始靜脈內投與，其中阿地介白素或其生物類似物或變異體係每八小時使用15分鐘推注靜脈內輸注以0.037 mg/kg或0.044 mg/kg IU/kg (患者體重)之劑量投與直至耐受，最多為14個劑量。在休止9天後，可重複此時程再投與14次劑量，最多總計28次劑量。在一些實施例中，IL-2係以1、2、3、4、5或6次劑量投與。在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投與。

【2606】在一些實施例中，IL-2方案包含遞減IL-2方案。遞減IL-2方案已描述於O'Day等人，《臨床腫瘤學雜誌》 **1999**, 17, 2752-61及Eton等人，《癌症》 **2000,** *88,* 1703-9，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，遞減IL-2療法包含經6小時靜脈內投與18×10^6 IU/m^2，接著經12小時靜脈內投與18×10^6 IU/m^2，接著經24小時靜脈內投與18×10^6 IU/m^2，接著經72小時靜脈內投與4.5×10^6 IU/m^2之阿地介白素或其生物類似物或變異體。此治療週期可每28天重複，達最多四個週期。在一些實施例中，遞減IL-2方案包含第1天18,000,000 IU/m^2，第2天9,000,000 IU/m^2以及第3天及第4天4,500,000 IU/m^2。

【2607】在一些實施例中，降低劑量之IL-2方案包含減少數量，例如1、2、3、4或5個劑量之600,000或720,000 IU/kg之阿地介白素或其生物類似物或變異體，其以每8小時15分鐘推注靜脈輸注形式投與直至耐受。在一些實施例

中，患者不接受IL-2方案。

【2608】在一些實施例中，IL-2方案包含劑量遞減IL-2方案。可使用此項技術中已知之任何低劑量IL-2方案，包括Dominguez-Villar及Hafler，《自然免疫學(*Nat. Immunology*)》**2000,** *19,* 665-673；Hartemann等人，《柳葉刀糖尿病與內分泌學(*Lancet Diabetes Endocrinol.*)》**2013**, *1*, 295-305；及Rosenzwaig等人，《風濕病年鑒(*Ann. Rheum. Dis.*)》**2019,** *78,* 209-217中所描述之低劑量IL-2方案，該等文獻之揭示內容以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，低劑量IL-2方案包含每24小時18×10^6 IU/m^2之阿地介白素或其生物類似物或變異體，以連續輸注形式投與5天；隨後2至6天不投與IL-2療法；視情況接著以每24小時連續輸注18×10^6 IU/m^2之形式再靜脈內投與阿地介白素或其生物類似物或變異體5天；視情況在隨後3週不投與IL-2療法，隨後可進行其他週期之投藥。

【2609】在一些實施例中，IL-2係以至多6次劑量之最大劑量投與。在一些實施例中，高劑量IL-2方案適用於小兒用途。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為600,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為400,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為500,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達

最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為300,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為200,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。在一些實施例中，使用每8至12小時劑量為100,000國際單位(IU)/kg的阿地介白素，達最多6次劑量。

【2610】在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投與聚乙二醇化IL-2。在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投與貝培阿地白介素或其片段、變異體或生物類似物。

【2611】在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投與THOR-707或其片段、變異體或生物類似物。

【2612】在一些實施例中，IL-2方案包含在投與TIL之後投與奈瓦紐金α或其片段、變異體或生物類似物。在某些實施例中，每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量向患者投與奈瓦紐金。

【2613】在一些實施例中，IL-2方案包含投與移植至抗體主鏈上之IL-2片段。在一些實施例中，IL-2方案包含投與結合IL-2低親和力受體之抗體細胞介素移植蛋白。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2

分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，抗體細胞介素移植蛋白包含重鏈可變區(V_H)，其包含互補決定區HCDR1、HCDR2、HCDR3；輕鏈可變區(V_L)，其包含LCDR1、LCDR2、LCDR3；及IL-2分子或其片段，其移植至V_H或V_L之CDR中，其中該IL-2分子為突變蛋白，並且其中該抗體細胞介素移植蛋白優先於調節性T細胞擴增T效應細胞。在一些實施例中，IL-2方案包含每1、2、4、6、7、14或21天以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量投與抗體或其片段、變異體或生物類似物，該抗體包含選自由SEQ ID NO:29及SEQ ID NO:38組成之群之重鏈及選自由SEQ ID NO:37及SEQ ID NO:39組成之群之輕鏈。

【2614】在一些實施例中，本文中所描述之抗體細胞介素移植蛋白的血清半衰期比野生型IL-2分子(諸如但不限於阿地介白素(Proleukin®)或可比分子)長。

【2615】在一些實施例中，與清髓性淋巴球耗減方案之前述實施例一起使用之TIL輸注可為本文所描述之任何TIL組合物且亦可包括代替TIL輸注之MIL及PBL輸注，以及添加IL-2方案及投與如本文中所描述之共同療法(諸如PD-1及/或PD-L1抑制劑及/或CTLA-4抑制劑)。

5. 其他治療方法

【2616】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療

患有癌症之個體的方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之如上適用的在任何前述段落中描述之治療性TIL群體。

【2617】在其他實施例中，本發明提供一種用於治療患有癌症之個體的方法，其包含向該個體投與治療有效劑量之如上適用的在任何前述段落中描述之TIL組合物。

【2618】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中在投與治療有效劑量的如上適用的在任何前述段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量的如上適用的在任何前述段落中描述的TIL組合物之前，已向個體投與非清髓性淋巴球耗減方案。

【2619】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天。

【2620】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其進一步包含以下步驟：始於在向個體投與TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療個體。

【2621】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜

脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2622】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為實體腫瘤。

【2623】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之在任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、大腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【2624】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【2625】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為黑色素瘤。

【2626】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為HNSCC。

【2627】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為子宮頸癌。

【2628】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為NSCLC。

【2629】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包括GBM)。

【2630】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為胃腸癌。

【2631】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為高突變癌症。

【2632】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的用於治療患有癌症之個體的方法，其中癌症為小兒高突變癌症。

【2633】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之用於治療患有任何前述段落中所描述之癌症之個體，其中癌症係選自由以下組成之群：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒(HPV)引起的癌症、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃

腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌)、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨骼及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。

【2634】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【2635】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其用於治療患有癌症之個體的方法中，該方法包含向個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【2636】在其他實施例中，本發明提供經修改的如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其中在向個體投與治療有效劑量之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物之前，已向個體投與非清髓性淋巴球耗減方案。

【2637】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天。

【2638】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其進一步包含以下步驟：始於在向患者投與TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【2639】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2640】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其中癌症為實體腫瘤。

【2641】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中所描述之治療性TIL群體或經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、大腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸

部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【2642】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【2643】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其中癌症為黑色素瘤。

【2644】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為HNSCC。

【2645】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為子宮頸癌。

【2646】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為NSCLC。

【2647】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包括GBM)。

【2648】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為胃腸癌。

【2649】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為高突變癌症。

【2650】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物，其中癌症為小兒高突變癌症。

【2651】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中所描述之治療性TIL群體或經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之TIL組合物，其中癌症係選自由以下組成之群：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒(HPV)引起的癌症、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌)、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖

癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨骼及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。

【2652】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向該個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體。

【2653】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向個體投與治療有效劑量之TIL組合物。

【2654】在其他實施例中，本發明提供如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物在治療個體之癌症之方法中的用途，該方法包含向該個體投與非清髓性淋巴球耗減方案且隨後向該個體投與治療有效劑量之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或治療有效劑量之如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物。

【2655】在其他實施例中，本發明提供經修改的如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物，其中在向個體投與治療有效劑量之治療性TIL群體或治療有效劑量之TIL組合物之前，已向個體投與非清髓性淋巴球耗減方案。

【2656】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中非清髓性淋巴球耗減方案包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱五天。

【2657】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體的用途或如上適用之任何前述段落中描述的TIL組合物的用途，其進一步包含以下步驟：始於在向患者投與TIL細胞之後當天，用高劑量IL-2方案治療患者。

【2658】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中高劑量IL-2方案包含每八小時以15分鐘推注靜脈內輸注形式投與600,000或720,000 IU/kg直至耐受。

【2659】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為實體腫瘤。

【2660】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物之用途，其中癌症為黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、大腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠母細胞瘤(包括GBM)、胃腸癌、腎癌或腎細胞癌。

【2661】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上

適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為黑色素瘤、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神經膠母細胞瘤(包括GBM)及胃腸癌。

【2662】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為黑色素瘤。

【2663】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為HNSCC。

【2664】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為子宮頸癌。

【2665】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為NSCLC。

【2666】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為神經膠母細胞瘤(包括GBM)。

【2667】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為胃腸癌。

【2668】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為高突變癌症。

【2669】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中描述的治療性TIL群體或TIL組合物的用途，其中癌症為小兒高突變癌症。

【2670】在其他實施例中，本發明提供經修改之如上適用之任何前述段落中所描述之治療性TIL群體或TIL組合物之用途，其中癌症係選自由以下組成之群：肛門癌、膀胱癌、乳癌(包括三陰性乳癌)、骨癌、由人類乳頭狀瘤病毒(HPV)引起的癌症、中樞神經系統相關癌症(包括室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、神經母細胞瘤、松果體母細胞瘤及原始神經外胚層腫瘤)、子宮頸癌(包括鱗狀細胞子宮頸癌、腺鱗狀子宮頸癌及子宮頸腺癌)、大腸癌、大腸直腸癌、子宮內膜癌、食道癌、食管胃交界處癌症、胃癌、胃腸癌、胃腸基質瘤、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、喉咽癌、喉癌、鼻咽癌、口咽癌及咽癌)、腎癌、肝癌、肺癌(包括非小細胞肺癌(NSCLC)及小細胞肺癌)、黑色素瘤(包括葡萄膜黑色素瘤、脈絡膜黑色素瘤、睫狀體黑色素瘤或虹膜黑色素瘤)、間皮瘤(包括惡性胸膜間皮瘤)、卵巢癌、胰臟癌(包括胰管腺癌)、陰莖癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉瘤(包括尤文氏肉瘤、骨肉瘤、橫紋肌肉瘤以及其他骨骼及軟組織肉瘤)、甲狀腺癌(包括退行性甲狀腺癌)、子宮癌及陰道癌。

實例

【2671】現參考以下實例描述本文中涵蓋之實施例。此等實例僅出於說明之目的提供且本揭示案決不應理解為限於此等實例，而應理解為涵蓋由於本文提供之教示而變得顯而易見的任何及所有變化形式。

實例1：製備用於PRE-REP及REP過程之培養基

【2672】此實例描述用於製備適用於涉及衍生自各種實體腫瘤之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)之培養的方案之組織培養基的程序。此培養基可用於製備本申請案及實例中所描述之任一TIL。

【2673】製備CM1。自冷藏庫取出以下試劑且使其在37℃水浴中升溫：(RPMI1640、人類AB血清、200 mM L-麩醯胺酸)。根據下表42，藉由將各成分添加至適用於待過濾體積之0.2 μm過濾器單元的頂部來製備CM1培養基。在4℃下儲存。

表42. 製備CM1

成分	最終濃度	最終體積500 mL	最終體積1L
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
人AB血清，加熱不活化10%	50 mL	100 mL	
200 mM L-麩醯胺酸	2 mM	5 mL	10 mL
55 mM BME	55 μM	0.5 mL	1 mL
50 mg/mL硫酸建它黴素	50 μg/mL	0.5 mL	1 mL

【2674】使用當天，將所需量之CM1在37℃水浴中預熱且添加6000 IU/mL IL-2。

【2675】根據表43，可按需要進行額外補充。

表43. 按需要對CM1之另外補充。

補充	儲備液濃度	稀釋	最終濃度
GlutaMAX™	200 mM	1:100	2 mM
青黴素/鏈黴素	10,000 U/mL青黴素 10,000 µg/mL鏈黴素	1:100	100 U/mL青黴素 100 µg/mL鏈黴素
雙性黴素B	250 µg/mL	1:100	2.5 µg/mL

製備CM2

【2676】自冰箱取出已製備之CM1或製備新鮮CM1。自冰箱取出AIM-V®，且藉由在無菌培養基瓶中混合已製備之CM1與等體積AIM-V®來製備所需量之CM2。在使用當天向CM2培養基中添加3000 IU/mL IL-2。在使用當天用3000 IU/mL IL-2製成足夠量之CM2。將CM2培養基瓶標記上名稱、製備者名字縮寫、過濾/製備日期、兩週之過期日期，且在需要用於組織培養之前儲存於4℃下。

製備CM3

【2677】在需要使用的當天，製備CM3。CM3與AIM-V®培養基相同，但在使用當天補充3000 IU/mL IL-2。藉由向AIM-V瓶或袋中直接添加IL-2儲備液，製備滿足實驗需求之量的CM3。藉由輕微振盪進行充分混合。添加AIM-V之後，立即將瓶子標記上「3000 IU/mL IL-2」若存在過量CM3，則將其儲存於處於4℃下之瓶子中，標記上培養基名稱、製備者名字縮寫、製備培養基之日期及其過期日期(製備後7天)。儲存於4℃下7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

製備CM4

【2678】CM4與CM3相同，但另外補充2 mM GlutaMAX™(最終濃度)。每1L CM3添加10 mL之200 mM GlutaMAX™。藉由向AIM-V瓶或袋中直接添加IL-2儲備液及GlutaMAX™儲備液，製備滿足實驗需求之量的CM4。藉由輕微振盪進行充分混合。在添加至AIM-V中之後，立即將瓶子標記為「3000 IL/mL IL-2及GlutaMAX」。若存在過量CM4，則將其在4℃下儲存於瓶子中，標記上培養基名稱、「GlutaMAX」及其過期日期(製備後7天)。在4℃下儲存超過7天後，捨棄補充有IL-2之培養基。

實例2：IL-2、IL-15及IL-21細胞介素混合物之用途

【2679】此實例描述充當額外T細胞生長因子之IL-2、IL-15及IL-21細胞介素與本文中之任何實例之TIL過程之組合之用途。

【2680】使用本文中所描述之過程，在開始培養時，TIL可一個實驗組中在存在IL-2之情況下且在另一個組中在存在代替IL-2之IL-2、IL-15及IL-21之組合之情況下自腫瘤生長。在預REP完成時，評估培養物之擴增、表現型、功能(CD107a+及IFN-γ)及TCR Vβ譜系。IL-15及IL-21在本文中之其他地方及Santegoets等人，《轉化醫學雜誌(*J. Transl. Med.*)》，**2013**, *11*, 37中描述。

【2681】結果可表明，相對於僅IL-2條件，可觀測到在IL-2、IL-15及IL-21處理條件下，$CD4^+$及$CD8^+$細胞中之

增強之TIL擴增(>20%)。相對於僅IL-2培養物，在自經IL-2、IL-15及IL-21處理的培養物獲得之TIL中，存在針對具有偏斜TCR Vβ譜系之顯著$CD8^+$群體之偏斜。與僅經IL-2處理之TIL相比，經IL-2、IL-15及IL-21處理之TIL中的IFN-γ及CD107a升高。

實例3：對個別批次之經γ照射的周邊單核細胞之鑑定

【2682】此實例描述用於鑑定在本文中所描述之例示性方法中用作同種異體飼養細胞的個別批次的經γ照射之周邊單核細胞(PBMC，亦稱為單核細胞或MNC)之簡化程序。

【2683】由個別供體製備各批次之經照射之MNC飼養細胞。針對在存在經純化之抗CD3 (純系OKT3)抗體及介白素-2(IL-2)的情況下，在REP中擴增TIL的能力來個別地篩選各批次或供體。此外，在不添加TIL之情況下測試各批次之飼養細胞，以驗證所接受之γ照射劑量足以使其不能進行複製。

【2684】TIL之REP需要經γ照射、生長受到阻滯之MNC飼養細胞。飼養細胞MNC上之膜受體與抗CD3 (純系OKT3)抗體結合且與REP瓶中之TIL交聯，刺激TIL擴增。由自個別供體獲得之全血之白血球清除術製備飼養細胞批料。白血球清除術產物在Ficoll-Hypaque上經歷離心、洗滌、照射且在GMP條件下冷凍保存。

【2685】重要的是，不向接受TIL療法之患者輸注活

飼養細胞，因為此可引起移植物抗宿主疾病(GVHD)。因此，飼養細胞之生長由於對細胞進行γ照射而受到阻滯，引起雙股DNA斷裂及在重新培養時MNC細胞之細胞存活率之損失。

【2686】根據兩個標準評估飼養細胞批料：(1)其在共同培養中使TIL擴增>100倍的能力，及(2)其複製能力不足。

【2687】利用在立式T25組織培養瓶中生長的兩個主要預REP TIL株系，以微型REP型式測試飼養細胞批料。針對兩個不同的TIL株系測試飼養細胞批料，其中各TIL株系在REP中回應於活化而增殖之能力係獨特的。作為對照，與測試批料一起操作許多先前已證實滿足以上標準的經照射之MNC飼養細胞。

【2688】可獲得足以測試所有條件及所有飼養細胞批料之相同預REP TIL株系之儲備液，以確保在單一實驗中測試的所有批料接受等效測試。

【2689】對於所測試的各批次之飼養細胞，存在總共六個T25瓶：預REP TIL株系#1(2個瓶)；預REP TIL株系#2(2個瓶)；及飼養細胞對照物(2個瓶)。含有TIL株系#1及#2之瓶用於評估飼養細胞批料擴增TIL之能力。飼養細胞對照物瓶用於評估飼養細胞批料之複製能力不足。

A. 實驗方案

【2690】第-2/3天，將TIL株系解凍。製備CM2培養基

且使CM2在37℃水浴中升溫。製備40 mL補充有3000 IU/mL IL-2之CM2。保持溫熱直至使用。將20 mL不含IL-2之預溫熱之CM2置放於用所使用之TIL株系之名稱標記之兩個50 mL錐形管中之每一者中。自LN2儲存器移出兩個指定的預REP TIL株系且將小瓶轉移至組織培養室。藉由將小瓶在經密封之拉鏈儲存袋內置放於37℃水浴中直至剩餘少量冰來解凍。

【2691】使用無菌移液管，將各小瓶之內含物立即轉移至準備好的經標記之50 mL錐形管中之20 mL CM2中。使用不含IL-2的CM2補足至40 mL以洗滌細胞，且在400×CF下離心5分鐘。抽吸上清液且再懸浮於補充有3000 IU/mL IL-2之5 mL溫熱的CM2中。

【2692】一式兩份地移出小等分試樣(20 μL)以使用自動細胞計數器進行細胞計數。記錄計數。在計數時，將具有TIL細胞之50 mL錐形管置放於潮濕的37℃，5% CO_2培育箱中，其中將蓋鬆開以允許氣體交換。測定細胞濃度，且將TIL在補充有3000 IU/mL IL-2之CM2中稀釋至1×10^6個細胞/毫升。

【2693】在潮濕的37℃培育箱中，視需要在24孔組織培養盤中之多個孔中以2毫升/孔進行培養，直至微型REP的第0天。在單獨的24孔組織培養盤中培養不同的TIL株系以避免混淆及潛在的交叉污染。

【2694】第0天，起始微型REP。針對待測試之飼養細胞批料之數目製備足夠的CM2培養基。(例如，對於一

次性測試4份飼養細胞批料，製備800 mL CM2培養基)。將上文所製備之CM2的一部分等分，且向其中補充3000 IU/mL IL-2以用於細胞培養。(例如，對於一次性測試4份飼養細胞批料，製備具有3000 IU/mL IL-2之500 mL CM2培養基)。

【2695】獨立地與各TIL株系一起操作以防止交叉污染，自培育箱移出具有TIL培養物之24孔盤且轉移至BSC。

【2696】使用無菌移液管或100-1000 µL移液器及吸頭，自待使用之各孔中之TIL移出約1 mL培養基且將其置放於24孔組織培養盤之未使用的孔中。

【2697】使用新鮮的無菌移液管或100-1000 µL移液器及吸頭，將剩餘培養基與孔中的TIL混合以將細胞再懸浮，且隨後將細胞懸浮液轉移至標記有TIL批料名稱的50 mL錐形管中且記錄體積。

【2698】用保留的培養基清洗各孔且將該體積轉移至相同的50 mL錐形管中。以400×CF旋轉細胞以收集細胞集結粒。抽出培養基上清液且將細胞集結粒再懸浮於2-5 mL含有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基中，所使用之體積係基於所收集的孔之數目及集結粒之尺寸，亦即，體積應足以確保濃度>1.3×10^6個細胞/毫升。

【2699】使用血清移液管，將細胞懸浮液充分混合且記錄體積。移出200 µL以使用自動細胞計數器進行細胞計數。在計數時，將具有TIL細胞之50 mL錐形管置放於潮濕

的5% CO_2，37℃培育箱中，其中將蓋鬆開以允許氣體交換。記錄計數。

【2700】自培育箱移出含有TIL細胞之50 mL錐形管，且將其中之細胞以1.3×10^6個細胞/毫升之濃度再懸浮於補充有3000 IU/mL IL-2之溫熱的CM2中。將50 mL錐形管放回培育箱中且將蓋子鬆開。

【2701】對於第二TIL株系，重複以上步驟。

【2702】在將要將TIL塗佈至用於實驗之T25瓶中之前，如下所示將TIL以1:10稀釋至最終濃度為1.3×10^5個細胞/毫升。

【2703】製備MACS GMP CD3純(OKT3)操作溶液。自4℃冷凍機中取出OKT3之儲備溶液(1 mg/mL)且置放於BSC中。在微型REP之培養基中使用最終濃度為30 ng/mL之OKT3。

【2704】在用於實驗之各T25瓶中，每20 mL需要600 ng OKT3；此等效於每20 mL需要60 µL的10 µg /mL溶液，或對於各飼養細胞批料，所測試之全部6個瓶需要360 µL。

【2705】對於所測試的各飼養細胞批料，對於10 µg/mL之操作濃度，製備400 µL的1 mg/mL OKT3之1:100稀釋物(例如，對於一次性測試4份飼養細胞批料，製備1600 µL的1 mg/mL OKT3之1:100稀釋物：16 µL的1 mg/mL OKT3+1.584 mL具有3000 IU/mL IL-2之CM2培養基)。

【2706】製備T25瓶。在製備飼養細胞之前，標記各

瓶且用CM2培養基填充瓶。將瓶置放於37℃潮濕的5% CO_2培育箱中以保持培養基溫熱，同時等待添加其餘組分。在製備飼養細胞後，將組分添加至各瓶中之CM2中。

【2707】其他資訊提供於表44中。

表44. 溶液資訊

組分	共培養物瓶中之體積	對照物(僅飼養細胞)瓶中之體積
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18 mL	19 mL
MNC：1.3×10^7 個/毫升於 CM2 + 3000 IU IL-2 中 (最終濃度 1.3×10^7 個/瓶)	1 mL	1 mL
OKT3：10 μL/mL 於 CM2 = 3000 IU IL-2 中	60 μL	60 μL
TIL：1.3×10^5 個/毫升於具有 3000 IU IL-2 之 CM2 中 (最終濃度 1.3×10^5 個/瓶)	1 mL	0

【2708】製備飼養細胞。對於此方案，所測試之每份批料需要至少78×10^6個飼養細胞。由SDBB冷凍之各1 mL小瓶在冷凍時具有100×10^6個活細胞。假設自液態N_2儲存器解凍後之回收率為50%，建議每批次至少解凍兩個1 mL小瓶之飼養細胞，從而在各REP中使用估計100×10^6個活細胞。或者，若在1.8 mL小瓶中供應，則僅一個小瓶即可提供足夠的飼養細胞。

【2709】在將飼養細胞解凍之前，對於待測試之各飼養細胞批料，預溫熱約50 mL不含IL-2之CM2。自LN2儲存器移出指定飼養細胞批料小瓶，置放於拉鏈儲存袋中且置放於冰上。小瓶在密閉的拉鏈儲存袋中藉由浸沒於37℃水浴中來解凍。自拉鏈袋移出小瓶，用70% EtOH噴塗或擦拭，且轉移至BSC。

【2710】使用移液管，將飼養細胞小瓶之內含物立即轉移至50 mL錐形管中之30 mL溫熱的CM2中。用小體積之CM2洗滌小瓶以移除小瓶中之任何殘餘細胞且在400×CF下離心5分鐘。抽吸上清液且再懸浮於4 mL溫熱的CM2加3000 IU/mL IL-2中。移出200 μL以使用自動細胞計數器進行細胞計數。記錄計數。

【2711】將細胞以1.3×10^{7}個細胞/毫升再懸浮於溫熱的CM2加3000 IU/mL IL-2中。將TIL細胞自1.3×10^{6}個細胞/毫升稀釋至1.3×10^{5}個細胞/毫升。

【2712】設置共培養物。將TIL細胞自1.3×10^{6}個細胞/毫升稀釋至1.3×10^{5}個細胞/毫升。將4.5 mL CM2培養基添加至15 mL錐形管中。自培育箱移出TIL細胞且使用10 mL血清移液管充分再懸浮。自1.3×10^{6}個細胞/毫升TIL懸浮液移出0.5 mL細胞且添加至15 mL錐形管中之4.5 mL培養基中。將TIL儲備液瓶放回培育箱中。充分混合。對第二TIL株系重複上述操作。

【2713】將具有用於單一飼養細胞批料之預溫熱培養基之瓶自培育箱轉移至BSC。藉由用1 mL移液器吸頭向上及向下移液若干次來混合飼養細胞，且將1 mL(1.3×10^{7}個細胞)轉移至用於該飼養細胞批料之各瓶中。向各瓶中添加60 μL OKT3操作儲備液(10 μg/mL)。將兩個對照瓶放回培育箱中。

【2714】將1 mL(1.3×10^{5})各TIL批料轉移至經相應標記之T25瓶中。將培養瓶放回培育箱中且直立培育。自第5

天開始進行干預。對所測試之所有飼養細胞批料重複此程序。

【2715】第5天，培養基更換。製備具有3000 IU/mL IL-2之CM2。各瓶需要10 mL。藉由10 mL移液管，將具有3000 IU/mL IL-2之10 mL溫熱的CM2轉移至各瓶。將瓶放回培育箱中且直立培育至第7天。對所有所測試之飼養細胞批料重複上述操作。

【2716】第7天，收集。自培育箱移出瓶且轉移至BSC，注意避免干擾瓶底部上之細胞層。在不干擾瓶底部上生長之細胞的情況下，自各測試瓶移出10 mL培養基且自各對照瓶移出15 mL培養基。

【2717】使用10 mL血清移液管，將細胞再懸浮於中剩餘的培養基中且充分混合以打散任何細胞凝集塊。在藉由移液充分混合細胞懸浮液之後，移出200 μL以進行細胞計數。結合自動細胞計數器設備使用適當標準操作程序對TIL進行計數。在第7天記錄計數。對所測試之所有飼養細胞批料重複此程序。

【2718】評估飼養細胞對照瓶之複製能力不足，且自第0天開始評估含有TIL的瓶之擴增倍數。

【2719】第7天，繼續操作飼養細胞對照瓶至第14天。在第7天完成飼養細胞對照瓶之計數之後，將15 mL含有3000 IU/mL IL-2的新鮮CM2培養基添加至各對照瓶中。將對照瓶放回培育箱中且以直立位置培育至第14天。

【2720】第14天，飼養細胞對照瓶之延長之非增殖

期。自培育箱移出瓶且轉移至BSC，注意避免干擾瓶底部上之細胞層。在不干擾瓶底部生長之細胞的情況下，自各對照瓶移出約17 mL培養基。使用5 mL血清移液管，將細胞再懸浮於中剩餘的培養基中且充分混合以打散任何細胞凝集塊。記錄各瓶之體積。

【2721】在藉由移液充分混合細胞懸浮液之後，移出200 μL以進行細胞計數。結合自動細胞計數器設備使用適當標準操作程序對TIL進行計數且記錄計數。對所測試之所有飼養細胞批料重複此程序。

B. 結果及驗收準則方案

【2722】結果。γ照射之劑量係足以使飼養細胞不能進行複製。預期所有批料符合評估準則且亦顯示與第0天相比，在REP培養之第7天剩餘之活飼養細胞之總數減少。預期所有飼養細胞批料皆符合以下評估標準：直至REP培養之第7天，TIL之生長擴增100倍。預期第14天的飼養細胞對照瓶之計數將持續第7天發現的非增殖趨勢。

【2723】接受準則。針對各批次之飼養細胞測試之各TIL株系複本符合以下接受準則。接受準則為兩倍，如以下表45中所示。

表45. 接受準則之實施例。

測試	接受準則
MNC之照射及無複製能力	在第7天及第14天未觀測到生長
TIL擴增	各TIL之至少100倍擴增(至少1.3×10^7個活細胞)

【2724】評估當在存在30 ng/mL OKT3抗體及3000 IU/mL IL-2之情況下培養時，照射劑量是否足以使MNC飼養細胞無法複製。經由如藉由在REP的第7天及第14天之自動細胞計數測定的總活細胞計數(TVC)來評估複製能力不足。

【2725】接受準則為「無生長」，意謂在第7天及第14天，總活細胞數目與在REP之第0天放入培養物中之初始活細胞數目相比未增加。

【2726】評估飼養細胞支持TIL擴增之能力。根據活細胞自REP之第0天開始之培養至REP之第7天的擴增倍數來量測TIL生長。在第7天，如藉由自動細胞計數所評估，TIL培養物達成最小100倍擴增(亦即，超過在REP之第0天放入培養物中之活TIL細胞的總數之100倍)。

【2727】不符合接受準則的MNC飼養細胞批料的應急測試。在MNC飼養細胞批料不符合以上概述之接受準則中之任一者的情況下，將進行以下步驟以重新測試該批料，以排除其起因係簡單的實驗者錯誤。

【2728】若存在該批料之兩個或更多個剩餘附屬測試小瓶(satellite testing vial)，則再測試該批料。若存在該批料之一個或不存在該批料之剩餘附屬測試小瓶，則根據上

文所列之接受準則，該批料不合格。

【2729】為了合格，相關批料及對照批料必須達成以上接受準則。在符合此等準則之後，准許使用該批料。

實例4：製備IL-2儲備溶液

【2730】此實例描述將經純化之凍乾重組人類介白素-2溶解於適合用於其他組織培養方案(包括本申請案及實例中所描述之所有彼等方案)之儲備樣品中的過程，包括涉及使用rhIL-2之彼等過程。

【2731】程序。製備0.2%乙酸溶液(HAc)。將29 mL無菌水轉移至50 mL錐形管中。向50 mL錐形管中添加1 mL 1 N乙酸。藉由倒轉管2至3次進行充分混合。藉由使用Steriflip過濾器進行之過濾將HAc溶液滅菌。

【2732】製備含1% HSA之PBS。在150 mL無菌過濾器單元中，向96 mL PBS中添加4 mL 25% HSA儲備溶液。過濾溶液。儲存於4℃下。針對製備的每一小瓶rhIL-2，填寫表格。

【2733】製備rhIL-2儲備液(6×10^6 IU/mL最終濃度)。每一批次之rhIL-2不同，且所需資訊見於製造商之分析證書(COA)，諸如：1)每小瓶rhIL-2之質量(mg)、2) rhIL-2之比活性(IU/mg)及3)推薦0.2% HAc復原體積(mL)。

【2734】使用以下公式計算rhIL-2批次所需的1% HSA之體積：

$$\left\{\text{小瓶質量(mg)} \times \frac{\text{生物活性}}{6\times10^{6}\ \text{IU/mg}}\right\} + \text{HAc體積(mL)} + 1\%\ \text{HSA體積(mL)}$$

[2735] 舉例而言，根據rhIL-2批料10200121(CellGenix)之COA，1 mg小瓶之比活性為25×10^{6} IU/mg。推薦在2 mL 0.2% HAc中復原rhIL-2。

$$\left\{\frac{1\text{mg} \times 25\times10^{6}\ \text{IU/mg}}{6\times10^{6}\ \text{IU/mL}}\right\} + 2\text{mL} + 2.167\text{mL HSA}$$

[2736] 用酒精擦拭物擦拭IL-2小瓶之橡膠塞。使用連接至3 mL注射器之16G針，將推薦體積之0.2% HAc注射至小瓶中。請小心不要在拔出針頭時取開塞子。將小瓶倒轉3次且旋動直至所有粉末溶解。小心地取下塞子並擱置於酒精擦拭物上。向小瓶中添加所計算體積之1% HSA。

[2737] 儲存rhIL-2溶液。對於短期儲存(< 72小時)，將小瓶儲存於4℃下。對於長期儲存(> 72小時)，將小瓶等分成較小體積，且在準備使用之前儲存於-20℃下之冷凍小瓶中。避免冷凍/解凍循環。在製備日期之後6個月過期。Rh-IL-2標籤包括供應商及目錄號、批號、過期日期、操作員首字母縮寫、濃度及等分體積。

實例5：冷凍保存過程

[2738] 此實例描述使用7454型CryoMed受控速率冷凍器(Thermo Scientific)之用於根據本文中所描述之程序製備的TIL之冷凍保存過程方法。

【2739】所使用之設備如下：鋁製卡匣支架(與CS750冷凍袋相容)、用於750 mL袋的冷凍卡匣、低壓(22 psi)液氮罐、冷凍機、熱電偶感測器(用於袋子之帶狀型)及CryoStore CS750冷凍袋(OriGen Scientific)。

【2740】自成核至-20℃，冷凍過程提供0.5℃速率且提供1℃/分鐘之冷卻速率直至-80℃終點溫度。程式參數如下：步驟1—在4℃下等待；步驟2：1.0℃/min (樣品溫度)達至-4℃；步驟3：20.0℃/min (箱室溫度)達至-45℃；步驟4：10.0℃/min (箱室溫度)達至-10.0℃；步驟5：0.5℃/min (箱室溫度)達至-20℃；且步驟6：1.0℃/min (樣品溫度)達至-80℃。

實例6：用確定培養基進行之腫瘤擴增過程

【2741】可用相應的確定培養基(例如，CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增SFM，賽默飛世爾，包括例如DM1及DM2)替代CM1及CM2培養基來進行上文或下文中所揭示之過程。

實例7：冷凍保存之TIL細胞療法之例示性GEN 2製備

【2742】此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current Good Tissue Practices)及當前優良製造規範(current Good Manufacturing Practices)在G-Rex瓶中進行Iovance Biotherapeutics公司的TIL細胞療法過程的cGMP製造。此實例描述一種根據當前組織優良操作規範(current

Good Tissue Practices)及當前優良製造規範(current Good Manufacturing Practices)在G-Rex瓶中進行TIL細胞療法過程的例示性cGMP製造。

表46. 過程擴增例示性計劃。

估計天數(接種後)	活性	目標準則	預期容器	估計總體積(mL)
0	腫瘤分割	以每單位G-REX100MCS計，≤50個所需腫瘤片段	G-REX100MCS，1個瓶	≤1000
11	REP接種	以每單位G-REX100MCS計之5-200×10^6個活細胞	G-REX-500MCS，1個瓶	≤5000
16	REP分瓶	以每單位G-REX-500MCS計之1×10^9個活細胞	G-REX-500MCS≤5個瓶	≤25000
22	收集	可獲得細胞總數	3至4個CS-750袋	≤530

表47. 培養瓶體積

培養瓶類型	工作容積/培養瓶(mL)
G-REX100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【2743】CM1培養基製備。在BSC中，向RPMI 1640培養基瓶添加試劑。添加以下試劑t，每瓶添加：加熱不活化人類AB血清(100.0 mL)；GlutaMax™ (10.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL (1.0 mL)；2-巯基乙醇(1.0 mL)

【2744】自BSC取出不必要之材料。自BSC分發培養基試劑，將硫酸建它黴素及HBSS保留在BSC以用於調配洗

滌培養基製備。

【2745】解凍IL-2等分試樣。解凍一個1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)，直至所有冰融化為止。記錄IL-2：批號及有效期

【2746】將IL-2儲備液轉移至培養基中。在BSC中，將1.0 mL IL-2儲備液轉移至準備之CM1第0天培養基瓶中。添加CM1第0天培養基1瓶及IL-2 (6×10^6 IU/mL) 1.0 mL。

【2747】將G-REX100MCS傳遞至BSC中。將G-REX100MCS (W3013130)無菌傳遞至BSC中。

【2748】將所有完全CM1第0天培養基泵吸至G-REX100MCS培養瓶中。組織片段錐形管或G-REX100MCS。

【2749】腫瘤洗滌培養基製備。在BSC中，將5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)添加至1×500 mL HBSS培養基(W3013128)瓶中。每瓶添加：HBSS (500.0 mL)；硫酸建它黴素，50 mg/mL (5.0 mL)。經由1L 0.22微米過濾器單元(W1218810)製備含有建它黴素之經過濾HBSS。

【2750】第0天腫瘤處理。獲得腫瘤試樣且立即轉移至2-8℃下之套件中進行處理。等分腫瘤洗滌培養基。使用8''鑷子(W3009771)進行腫瘤洗滌1。自試樣瓶移出腫瘤且轉移至所製備之「洗滌1」培養皿中。此隨後為腫瘤洗滌2及腫瘤洗滌3。量測且評估腫瘤。評估是否觀測到整個腫瘤面積之> 30%壞死及/或為脂肪組織。在適用時清潔解剖。若腫瘤較大且觀測到>30%組織外表壞死/為脂肪，則

藉由使用解剖刀及/或鑷子之組合移除壞死/脂肪組織並同時保留腫瘤內部結構來進行「清除分割」。解剖腫瘤。使用解剖刀及/或鑷子之組合，將腫瘤試樣切割成偶數個適當大小之片段(至多6個中間片段)。轉移中間腫瘤片段。將腫瘤片段分割成大小大致為3×3×3 mm之片。儲存中間片段以防脫水。重複中間片段分割。測定收集之小塊數目。若僅保留所需組織，則自「有利中間片段」6孔盤選擇另外的有利腫瘤片段來填充丟棄片段，使得最多達50個片段。

【2751】準備錐形管。將腫瘤片轉移至50 mL錐形管中。製備用於G-REX100MCS之BSC。自培育箱移除G-REX100MCS。將G-REX100MCS培養瓶無菌傳遞至BSC中。將腫瘤片段添加至G-REX100MCS培養瓶中。使小塊均勻分佈。

【2752】按以下參數使G-REX100MCS保溫：使G-REX培養瓶保溫：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。計算：保溫時間；下限=保溫時間+252小時；上限=保溫時間+276小時。

【2753】過程完成後，捨棄所有剩餘已升溫培養基並解凍IL-2之等分試樣。

【2754】第11天-培養基製備監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO2百分比：5.0±1.5% CO2。

【2755】在培育箱中使3×1000 mL RPMI 1640培養基

(W3013112)瓶及3×1000 mL AIM-V (W3009501)瓶升溫≥30分鐘。自培育箱移除RPMI 1640培養基瓶。準備RPMI 1640培養基瓶。過濾培養基。解凍3×1.1 mL IL-2等分試樣(6×106 IU/mL) (BR71424)。自培育箱中取出AIM-V培養基。將IL-2添加至AIM-V中。將10 L Labtainer袋及中繼泵轉移裝置無菌轉移至BSC中。

【2756】準備10 L Labtainer培養基袋。準備Baxa泵。準備10L Labtainer培養基袋。將培養基泵吸至10 L Labtainer中。自Labtainer袋取下自動泵吸管。

【2757】混合培養基。輕緩地揉按袋子以進行混合。依據取樣計劃對培養基進行取樣。移除20.0 mL培養基且置於50 mL錐形管中。製備細胞計數稀釋液管。在BSC中，向四個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。將試劑自BSC轉移至2至8℃下。準備1 L轉移包。在BSC外部，將1L轉移包熔接(依據過程註釋5.11)至附接於所準備的「完全CM2第11天培養基」袋的轉移裝置上。準備飼養細胞轉移包。培育完全CM2第11天培養基。

【2758】第11天-TIL收集預處理表格。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱移除G-REX100MCS。準備300 mL轉移包。將轉移包熔接至G-REX100MCS。

【2759】準備用於TIL收集之培養瓶且起始TIL收集。收集TIL。使用GatheRex，透過血液過濾器將細胞懸浮液

轉移至300 mL轉移包中。檢查膜上之黏附細胞。

【2760】沖洗培養瓶膜。閉合G-REX100MCS上之夾子。確保所有夾子閉合。熱封TIL及「上清液」轉移包。計算TIL懸浮液之體積。準備用於取樣之上清液轉移包。

【2761】抽取Bac-T樣品。在BSC中，自1L「上清液」轉移包中吸取約20.0 mL上清液，並分配至無菌的50 mL錐形管中。

【2762】依據取樣計劃接種BacT。使用適當大小之注射器自準備的標記有BacT之50 mL錐形管移除1.0 mL樣品且接種於厭氧瓶。

【2763】培育TIL。在需要之前將TIL轉移包置於培育箱中。進行細胞計數及演算。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。存活率÷2。活細胞濃度÷2。測定計數之上限及下限。下限：活細胞濃度平均值×0.9。上限：活細胞濃度平均×1.1。確認兩個計數在可接受界限內。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。

【2764】調整TIL懸浮液之體積：計算移除細胞計數樣品後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積(A)。取出的細胞計數樣品之體積(4.0 mL)(B)經調整TIL細胞總體積C = A - B。

【2765】計算活TIL細胞總數。平均活細胞濃度*：總體積；活細胞總數：C = A×B。

【2766】流動式細胞測量術之計算：若活TIL細胞總

計數為≥4.0×10^7，則計算獲得用於流動式細胞測量術樣品的1.0×10^7個細胞的體積。

【2767】流動式細胞測量術所需之活細胞總數：1.0×10^7個細胞。流動式細胞測量術所需之細胞體積：活細胞濃度除以1.0×10^7個細胞A。

【2768】計算等於2.0×10^8個活細胞的TIL懸浮液之體積。按需要，計算待取出的過量TIL細胞體積，且取出過量TIL並按需要將TIL置於培育箱中。計算按需要取出之過量TIL總量。

【2769】將以供冷凍之目標細胞濃度添加至過量TIL細胞的CS-10培養基之計算量為1.0×10^8個細胞/mL。按需要使過量TIL離心。觀測錐形管並添加CS-10。

【2770】填充小瓶。將1.0 mL細胞懸浮液等分至適當大小之冷凍小瓶中。將剩餘體積等分至適當大小之冷凍小瓶中。如果體積≤0.5mL，將CS10添加至小瓶中，直至體積為0.5 mL。

【2771】計算獲得用於冷凍保存之1×10^7個細胞所需之細胞體積。取出樣品以進行冷凍保存。將TIL置於培育箱中。

【2772】樣品之冷凍保存。觀測錐形管，且緩慢添加CS-10且記錄添加0.5 mL CS10之體積。

【2773】第11天-飼養細胞獲得飼養細胞。自LN2冷凍機獲得至少兩個不同批號的3袋飼養細胞。在準備解凍之前將細胞保存於乾冰上。準備水浴或cryotherm。在

37.0±2.0℃水浴或cytotherm處解凍飼養細胞約3至5分鐘或直至冰剛好消失為止。自培育箱移除培養基。合併解凍之飼養細胞。將飼養細胞添加至轉移包。將飼養細胞自注射器分配至轉移包中。對合併飼養細胞進行混合，且標記轉移包。

【2774】計算轉移包中之飼養細胞懸浮液之總體積。移除細胞計數樣品。針對各樣品使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包抽吸4×1.0 mL細胞計數樣品。將每個樣品等分至經標記之冷凍小瓶中。進行細胞計數，且判定乘數選定方案且輸入乘數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上部及下限，並確認其在界限內。

【2775】調整飼養細胞懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣品後飼養細胞懸浮液之經調整體積。計算活飼養細胞總數。按需要獲得另外的飼養細胞。按需要解凍另外的飼養細胞。將第4飼養細胞袋置於拉鏈袋中，且在37.0±2.0℃水浴或cytotherm中解凍約3至5分鐘並合併另外的飼養細胞。量測體積。量測注射器中飼養細胞之體積並記錄在下面(B)。計算飼養細胞之新的總體積。將飼養細胞添加至轉移包。

【2776】按需要製備稀釋液，將4.5 mL AIM-V培養基添加至四個15 mL錐形管中。準備細胞計數。針對各樣品使用單獨的3 mL注射器，使用非必要注入口自飼養細胞懸浮液轉移包取出4×1.0 mL細胞計數樣品。進行細胞計數及

演算。根據進行的所有四次計數測定平均活細胞濃度。調整飼養細胞懸浮液之體積，且計算取出細胞計數樣品後飼養細胞懸浮液之經調整體積。飼養細胞總體積減去取出之4.0 mL。計算獲得$5x10^9$個活飼養細胞所需的飼養細胞懸浮液之體積。計算過量飼養細胞體積。計算待取出之過量飼養細胞之體積。取出過量飼養細胞。

【2777】使用1.0 mL注射器及16G針頭，吸取0.15 mL OKT3且添加OKT3。熱封飼養細胞懸浮液轉移包。

【2778】第11天G-REX填充及接種設置G-REX-500MCS。自培育箱移除「完全CM2第11天培養基」並將培養基泵吸至G-REX500MCS中。將4.5 L培養基泵吸至G-REX500MCS中，填充至培養瓶上標示之線處。按需要熱封並使培養瓶保溫。將飼養細胞懸浮液轉移包熔接至G-REX500MCS。將飼養細胞添加至G-REX500MCS。熱封。將TIL懸浮液轉移包熔接至培養瓶。將TIL添加至G-REX500MCS。熱封。將G-REX500MCS在37.0±2.0℃下保溫，CO2百分比：5.0±1.5% CO2。

【2779】計算保溫範圍。進行計算以確定在第16天自培育箱取出G-REX500MCS的適當時間。下限：保溫時間+108小時。上限：保溫時間+132小時。

【2780】第11天過量TIL冷凍保存。適用：冷凍過量TIL小瓶。確證在冷凍前已設定CRF。進行冷凍保存。將小瓶自速率受控冷凍機轉移至適當儲存件中。完成冷凍後，將小瓶自CRF轉移至適當儲存容器。將小瓶轉移至適

當儲存件中。記錄在LN2中的儲存位置。

【2781】第16天培養基製備預熱AIM-V培養基。針對培養基袋1、2及3計算使培養基升溫的時間。確保所有袋子已升溫12至24小時之持續時間。設定用於上清液之10L Labtainer。使用魯爾連接子將流體泵轉移裝置之較大直徑端附接至10L Labtainer袋之一個凹形端口。設定用於上清液之10L Labtainer並進行標記。設定用於上清液之10L Labtainer。確保在自BSC之前取出前閉合所有夾子。注意：在TIL收集期間使用上清液袋，該TIL收集可與培養基製備並行地進行。

【2782】解凍IL-2。每袋CTS AIM V培養基解凍5×1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL) (BR71424)，直至所有冰融化為止。等分100.0 mL GlutaMax™。向GlutaMax™中添加IL-2。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。準備用於調配之CTS AIM V培養基袋。多級Baxa泵。準備調配培養基。將GlutaMax™ +IL-2泵吸至袋中。監測參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使完全CM4第16天培養基升溫。製備稀釋液。

【2783】第16天REP分瓶。監測培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃，CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。自培育箱移除G-REX500MCS。準備1 L轉移包且標記為TIL懸浮液並稱重為1 L。

【2784】G-REX-500MCS之體積減少。將約4.5 L培養上清液自G-REX-500MCS轉移至10 L Labtainer。

【2785】準備用於TIL收集之培養瓶。取出上清液後，閉合通向紅色管線之所有夾子。

【2786】起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以使細胞剝離，且確保所有細胞剝落。

【2787】TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液轉移包之所有夾子。使用GatheREX，將細胞懸浮液轉移至TIL懸浮液轉移包中。注意：確保維持邊緣傾斜，直至收集到所有細胞及培養基為止。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-REX500MCS上之夾子。熱封含有TIL之轉移包。熱封含有上清液之10L Labtainer。記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算懸浮液體積。準備用於樣品取出之轉移包。自細胞上清液取出測試樣品。

【2788】無菌及BacT測試取樣。自製備之15 mL錐形標記之BacT移除1.0 mL樣品。移除細胞計數樣品。在BSC中，針對各樣品使用單獨的3 mL注射器，自「TIL懸浮液」轉移包移除4×1.0 mL細胞計數樣品。

【2789】移除黴漿菌樣品。使用3 mL注射器，自TIL懸浮液轉移包移除1.0 mL並置於準備的標記有「黴漿菌稀釋劑」之15 mL錐形管中。

【2790】準備用於接種之轉移包。將TIL置於培育箱中。自BSC取出細胞懸浮液，且在需要之前置於培育箱中。進行細胞計數及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣品進行稀釋，得到稀釋度為1:10。測定進行細胞計數之細胞的

活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：稀釋可以根據預期的細胞濃度進行調整。自進行的所有四次計數中確定平均活細胞濃度。調整TIL懸浮液之體積。計算取出細胞計數樣品後TIL懸浮液之經調整體積。總TIL細胞體積減去取出以用於測試之5.0 mL。

【2791】計算活TIL細胞總數。計算待接種之培養瓶之總數目。注意：待接種的G-REX-500MCS培養瓶之最大數目為五。若計算的待接種培養瓶之數目超過五，則使用可用的所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。

【2792】計算用於繼代培養之培養瓶數目。計算除所準備之袋子以外還需要之培養基袋的數目。按計算需要每兩個G-REX-500M培養瓶準備一個10 L「CM4第16天培養基」袋。繼續接種第一GREX-500M培養瓶，同時準備另外的培養基並使其升溫。準備確定的所計算數目之其他培養基袋並使其升溫。填充G-REX500MCS。準備泵吸培養基並將4.5 L培養基泵吸至G-REX500MCS中。熱封。重複填充。使培養瓶保溫。計算待添加至新G-REX500MCS培養瓶中的TIL懸浮液之目標體積。若計算之培養瓶數目超過五，則使用所有體積之細胞懸浮液接種僅五個培養瓶。準備用於接種之培養瓶。自培育箱移除G-REX500MCS。準備用於泵吸之G-REX500MCS。除較大過濾器管線外，閉合所有夾子。自培育箱取出TIL。製備用於接種之細胞懸浮液。將「TIL懸浮液」轉移包無菌熔接(依據過程註釋5.11)至泵入口管線。將TIL懸浮液袋置於稱上。

【2793】用TIL懸浮液接種培養瓶。泵吸所計算體積之TIL懸浮液至培養瓶中。熱封。填充剩餘培養瓶。

【2794】監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37.0±2.0℃；CO_2百分比：5.0±1.5% CO_2。使培養瓶保溫。

【2795】測定在第22天自培育箱移除G-REX500MCS的時間範圍。

【2796】第22天洗滌緩衝液製備。準備10L Labtainer袋。在BSC中，經由魯爾連接子將4''血漿轉移裝置附接至10L Labtainer袋。準備10L Labtainer袋。在轉移出BSC之前，閉合所有夾子。注意：為待進行收集之每兩個G-REX500MCS培養瓶準備一個10L Labtainer袋。將Plasmalyte泵吸至3000 mL袋中，且藉由翻轉泵及操控袋子之位置來自3000 mL Origen袋去除空氣。將25%的人類白蛋白添加至3000 mL袋中。獲得最終體積為120.0 mL的人類白蛋白25%。

【2797】製備IL-2稀釋劑。使用10 mL注射器，使用LOVO洗滌緩衝液袋上之無針注入口移除5.0 mL LOVO洗滌緩衝液。將LOVO洗滌緩衝液分配至50 mL錐形管中。

【2798】等分CRF空白袋LOVO洗滌緩衝液。使用100 mL注射器，自無針注入口吸取70.0 mL LOVO洗滌緩衝液。

【2799】解凍一份1.1 mL IL-2 (6×10^6 IU/mL)，直至所有冰融化為止。將50 µL IL-2儲備液(6×10^6 IU/mL)添加至標記為「IL-2稀釋劑」的50 mL錐形管中。

【2800】冷凍保存準備。將5個冷凍盒置於2至8℃下，以對其進行預處理，以便用於最終產物冷凍保存。

【2801】製備細胞計數稀釋液。在BSC中，向4個的15 mL錐形管中添加4.5 mL已標記有「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基。準備細胞計數。將4個冷凍小瓶標記上小瓶編號(1至4)。將小瓶保存在BSC以供使用。

【2802】第22天TIL收集。監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示器：37±2.0℃，CO2百分比：5%±1.5%。自培養箱中移除G-REX500MCS培養瓶。準備TIL收集袋並進行標記。封閉額外之連接子。體積減少：將約4.5 L上清液自G-REX500MCS轉移至上清液袋。

【2803】準備用於TIL收集之培養瓶。起始TIL收集。劇烈敲擊培養瓶並旋動培養基以剝離細胞。確保所有細胞已剝落。起始TIL收集。鬆開通向TIL懸浮液收集袋之所有夾子。TIL收集。使用GatheRex，將TIL懸浮液轉移至3000 mL收集袋中。檢查膜上之黏附細胞。沖洗培養瓶膜。閉合G-REX500MCS上之夾子，並確保閉合所有夾子。將細胞懸浮液轉移至LOVO來源袋中。閉合所有夾子。熱封。移除4×1.0 mL細胞計數樣品

【2804】進行細胞計數。利用NC-200及過程註釋5.14進行細胞計數及演算。首先藉由將0.5 mL細胞懸浮液添加至準備的4.5 mL AIM-V培養基中來對細胞計數樣品進行稀釋。得到1:10稀釋度。測定進行細胞計數之細胞的平均存

活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。測定計數之上限及下限。測定進行細胞計數之細胞的平均存活率、活細胞濃度及總成核細胞濃度。稱量LOVO來源袋。計算活TIL細胞總數。計算成核細胞總數。

【2805】製備黴漿菌稀釋劑。經由魯爾樣品口自一個上清液袋移除10.0 mL並置於15 mL錐形管中。

【2806】進行「TIL G-REX收集」方案並測定最終產物目標體積。裝載一次性套組。取出濾液袋。輸入濾液容量。將濾液容器置於實驗台上。附接PlasmaLyte。確證已附接PlasmaLyte，且觀測到PlasmaLyte正在移動。將來源容器附接至導管，且確證已附接來源容器。確認PlasmaLyte正在移動。

【2807】最終調配及填充。目標體積/袋子計算。計算待調配於空白袋中之CS-10及LOVO洗滌緩衝液的體積。準備CRF空白袋。

【2808】計算待添加至最終產物的IL-2之體積。所需最終IL-2濃度(IU/mL)-300IU/mL。IL-2工作儲備：6×10^4 IU/mL。組裝連接設備。將4S-4M60無菌熔接至CC2單元連接子。將CS750冷凍袋無菌熔接至製備之線束上。將CS-10袋熔接至4S-4M60之尖端上。用IL-2製備TIL。使用適當大小之注射器，自「IL-2 6×10^4」等分試樣取出所測定量之IL-2。標記經調配TIL袋。將經調配TIL袋添加至設備。添加CS10。切換注射器。將約10 mL空氣吸取至100 mL注射器中並替換設備上之60 mL注射器。添加CS10。準備

CS-750袋。分配細胞。

【2809】自最終產物袋移除空氣並獲得保留物。一旦已填充最後一個最終產物袋，即閉合所有夾子。將10 mL空氣吸取至新的100 mL注射器中且更換設備上的注射器。將保留物分配至50 mL錐形管中，且將管標記為「保留物」及批號。針對每個袋子重複空氣移除步驟。

【2810】準備用於冷凍保存之最終產物，包括目視檢查。在冷凍保存之前將冷凍袋保存於降溫包上或2至8℃下。

【2811】移除細胞計數樣品。使用適當大小之移液管，取出2.0 mL保留物並置於15 mL錐形管中以用於細胞計數。進行細胞計數及演算。注意：僅將一個樣品稀釋至確證稀釋度足夠的適當稀釋度。將另外的樣品稀釋至適當稀釋因數並繼續進行計數。測定進行細胞計數之細胞的活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。注意：可根據預期細胞濃度調整稀釋度。測定活細胞濃度平均值及存活率平均值。測定計數之上限及下限。計算IFN-γ。熱封最終產物袋。

【2812】依據以下例示性取樣計劃標記且收集樣品。

表 48. 樣品計劃。

樣品	容器數目	每次添加之樣品體積	容器類型
*黴漿菌	1	1.0 mL	15 mL 錐形管
內毒素	2	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
革蘭氏染色(Gram Stain)	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
干擾素-γ	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
流動式細胞測量術	1	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T 瓶
QC 保留物	4	1.0 mL	2 mL 冷凍小瓶
附屬小瓶	10	0.5 mL	2 mL 冷凍小瓶

【2813】無菌性及BacT測試。測試取樣。在BSC中，自使用適當大小之注射器收集的保留細胞懸浮液中移除1.0 mL樣品，並接種厭氧瓶。對好氧瓶重複以上操作。

【2814】最終產物冷凍保存準備速率受控冷凍機(CRF)。確證已設定CRF。設定CRF探針。將最終產物及樣品置於CRF中。測定要達至4℃ ±1.5℃所需的時間並繼續進行CRF運行。完成CRF且儲存。完成運行後停止CRF。自CRF取出盒子及小瓶。將盒子及小瓶轉移至氣相LN2進行儲存。記錄儲存位置。

【2815】最終藥品之處理及分析包括以下測試：(第22天)藉由流動式細胞測量術測定第22天REP天之CD3+細胞；(第22天)革蘭氏染色方法(GMP)；(第22天)藉由凝膠凝塊LAL分析(GMP)進行細菌內毒素測試；(第16天) BacT無菌性分析(GMP)；(第16天) TD-PCR (GMP)檢測黴漿菌DNA；可接受外觀特質；(第22天) BacT無菌分析(GMP)(第22天)；(第22天) IFN-γ分析。如本文中所描述之其他效力分析法亦用於分析TIL產物。

實例8：GEN 3擴增平台之例示性實施例

第0天

【2816】製備腫瘤洗滌培養基。在開始之前使培養基升溫。將5 mL建它黴素(50 mg/mL)添加至500 mL HBSS瓶中。將5mL腫瘤洗滌培養基添加至15 mL錐形瓶中，用於OKT3稀釋。準備飼養細胞袋。將飼養細胞無菌轉移至飼養細胞袋且在37℃下儲存直至使用或冷凍。若在37℃下，則對飼養細胞進行計數。若冷凍，則解凍且接著對飼養細胞進行計數。

【2817】飼養細胞濃度之最佳範圍在5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。製備具有4.5 mL AIM-V之四個錐形管。對於每次細胞計數，添加0.5 mL細胞級份。若總活飼養細胞數目≥1×10^9個細胞，則進行調節飼養細胞濃度。計算自第一飼養細胞袋移出的飼養細胞體積，以便將1×10^9個細胞添加至第二飼養細胞袋中。

【2818】使用p1000微量移液管，將900 µL的腫瘤洗滌培養基轉移至OKT3等分試樣(100 µL)中。使用注射器及無菌技術，抽取0.6 mL OKT3且添加至第二飼養細胞袋中。將培養基體積調節至2 L之總體積。將第二飼養細胞袋轉移至培育箱中。

【2819】OKT3調配物細節：可以100 µL等分試樣形式，以來自小瓶之原始儲備液濃度(1 mg/mL)將OKT3等分及冷凍。每個1 mL小瓶具有約10X等分試樣。在-80℃下儲存。第0天：15微克/瓶，亦即，30 ng/mL於500 mL中，至

多約60 μL，1個等分試樣。

【2820】向標記為過量腫瘤片狀物之6孔盤之所有孔中添加5 mL腫瘤洗滌培養基。保存腫瘤洗滌培養基，以進一步用於在解剖期間保持腫瘤水分。將50 mL腫瘤洗滌培養基添加至各100 mm皮氏培養皿(petri dish)中。

【2821】在解剖培養皿蓋下用直尺作為參考，將腫瘤分割成27 mm^3片段(3×3×3 mm)。解剖中間片段，直至達到60個片段。對最終片段之總數進行計數且根據所產生之最終片段之數目來準備G-REX100MCS瓶(通常為60個片段/瓶)。

【2822】在標記為片段管1至片段管4的錐形管中保留有利的組織片段。根據起始片段管之數目計算用飼養細胞懸浮液接種之G-REX100MCS瓶之數目。

【2823】自培育箱移出飼養細胞袋且接種G-REX100MCS。標記為D0(第0天)。

【2824】向G-REX100 MCS中之培養物中添加腫瘤片段。在無菌條件下，擰開標記有腫瘤片段培養物(D0)1的G-REX100MCS及標記有片段管的50 mL錐形管之蓋子。旋轉打開的片段管1，且同時略微抬起G-REX100MCS的蓋子。在旋轉的同時將培養基及片段一起添加至G-REX100MCS中。記錄轉移至G-REX100MCS中之片段之數目。

【2825】一旦片段位於G-REX瓶之底部，抽取7 mL培養基且創建七個1 mL等分試樣，5 mL用於擴展表徵且2 mL

用於無菌樣品。將用於擴展表徵之5個等分試樣(最終片段培養物上清液)儲存在-20℃下直至需要為止。

【2826】分別用1 mL最終片段培養物上清液接種一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶。對進行取樣的各瓶重複上述操作。

在第7-8天

【2827】準備飼養細胞袋。在冷凍之情況下，將飼養細胞袋在37℃水浴中解凍3-5分鐘。若冷凍，則對飼養細胞進行計數。飼養細胞濃度之最佳範圍在5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。製備具有4.5 mL AIM-V之四個錐形管。對於每次細胞計數，將0.5 mL細胞級份添加至新的冷凍小瓶管中。將樣品充分混合且進行細胞計數。

【2828】若活飼養細胞總數≥2×10^9個細胞，則進行下一個步驟以調節飼養細胞濃度。計算自第一飼養細胞袋移出的飼養細胞之體積，以便將2×10^9個細胞添加至第二飼養細胞袋中。

【2829】使用p1000微量移液管，將900 µL HBSS轉移至100 µL OKT3等分試樣中。藉由向上及向下移液3次進行混合。製備兩個等分試樣。

【2830】OKT3調配物細節：可以100 µL等分試樣形式，以來自小瓶之原始儲備液濃度(1 mg/mL)將OKT3等分及冷凍。每個1 mL小瓶具有約10×等分試樣。在-80℃下儲存。第7/8天：30微克/瓶，亦即，60 ng/mL於500 mL中，

至多120 μl，2個等分試樣。

【2831】使用注射器及無菌技術，抽取0.6 mL OKT3且添加至飼養細胞袋中，確保全部添加。將培養基體積調節至2 L之總體積。對第二OKT3等分試樣重複上述操作且添加至飼養細胞袋中。將第二飼養細胞袋轉移至培育箱中。

【2832】製備具有飼養細胞懸浮液之G-REX100MCS瓶。根據第0天產生之G-REX瓶之數目記錄待處理的G-REX100MCS瓶之數目。自培育箱移出G-REX瓶且自培育箱移出第二飼養細胞袋。

【2833】在添加飼養細胞懸浮液之前移除上清液。將一個10 mL注射器連接至G-REX100瓶且抽取5 mL培養基。創建五個1 mL等分試樣，5 mL用於擴展表徵，且將用於擴展表徵之5個等分試樣(最終片段培養物上清液)儲存在-20℃下直至發起人提出要求。對各G-REX100瓶進行標記且重複上述操作。

【2834】取決於瓶之數目，5-20×1 mL樣品用於表徵：

- 5 mL = 1個培養瓶
- 10 mL = 2個培養瓶
- 15 mL = 3個培養瓶
- 20 mL =4個培養瓶

【2835】繼續將飼養細胞接種至G-REX100 MCS中，且對各G-REX100 MCS瓶重複上述操作。使用無菌轉移方

法，將500 mL第二飼養細胞袋按重量(假設1 g=1 mL)藉由重力轉移至各G-REX100MCS瓶中且記錄轉移量。標記為第7天培養物且對各G-REX100瓶重複上述操作。將G-REX100MCS瓶轉移至培育箱中。

第10-11天

【2836】移出第一個G-REX100MCS瓶，且在無菌條件下使用10 mL注射器移出7 mL預處理培養物上清液。創建七個1 mL等分試樣，5 mL用於擴展表徵且2 mL用於無菌樣品。

【2837】小心地混合瓶且使用新的10 mL注射器移出10 mL上清液且轉移至標記為D10/11黴漿菌上清液之15 mL管中。

【2838】小心地混合瓶且使用新的注射器根據待處理的瓶之數量移出以下體積：

- 1個瓶=40毫升
- 2個瓶=20毫升/瓶
- 3個瓶=13.3毫升/瓶
- 4個瓶=10毫升/瓶

【2839】應自所有瓶抽吸總共40 mL，且彙集在標有『第10/11天QC樣品』之50 mL錐形管中，且儲存在培育箱中直至需要為止。進行細胞計數且分配細胞。

【2840】將用於擴展表徵之5個等分試樣(預處理培養物上清液)儲存在≤-20℃下直至需要為止。分別用1 mL預

處理培養物上清液接種一個厭氧BacT/Alert瓶及一個好氧BacT/Alert瓶。

【2841】繼續將細胞懸浮液轉移至G-REX-500MCS且對各G-REX100MCS重複上述操作。使用無菌條件，將各G-REX100MCS之內含物轉移至G-REX-500MCS中，每次監測約100 mL液體轉移。當G-REX100MCS之體積降低至500 mL時，停止轉移。

【2842】在轉移步驟期間，使用10 mL注射器且自G-REX100MCS抽吸10 mL細胞懸浮液至注射器中。根據培養中之瓶的數目按照說明書進行操作。若僅1個瓶：總共使用兩個注射器移出20 mL。若2個瓶：每個瓶移出10 mL。若3個瓶：每個瓶移出7 mL。若4個瓶：每個瓶移出5 mL。將細胞懸浮液轉移至一個共用的50 mL錐形管。保持在培育箱中直至細胞計數步驟及QC樣品。QC所需之細胞總數為約20e6個細胞：4×0.5 mL細胞計數(細胞計數首先非經稀釋)。

【2843】分析法所需之細胞量如下：

1. 至少10×10^6個細胞用於效能分析法，諸如本文中所描述之分析法，或用於IFN-γ或顆粒酶B分析法

2. 1×10^6個細胞用於黴漿菌

3. 5×10^6個細胞用於CD3+/CD45+的流動式細胞測量術

【2844】將G-REX-500MCS瓶轉移至培育箱。

【2845】製備QC樣品。在此實施例中，分析法需要

至少15×10^{8}個細胞。分析法包括：細胞計數及存活率；黴漿菌(1×10^{6}個細胞/平均存活濃度；)流動(5×10^{6}個細胞/平均存活濃度；)及IFN-g分析法(5×10^{6}個細胞-1×10^{6}個細胞；IFN-γ分析法需要8-10×10^{6}個細胞。

【2846】計算在10×10^{6}個細胞/毫升下冷凍保存之細胞級份之體積，且計算需準備之小瓶之數目

第16-17天

【2847】洗滌緩衝液製備(1% HSA Plasmalyte A)。將HSA及Plasmalyte轉移至5 L袋中以製備LOVO洗滌緩衝液。使用無菌條件將總體積為125 mL的25% HSA轉移至5 L袋中。將10 mL或40 mL洗滌緩衝液移出且轉移至『IL-2 6×10^4 IU/mL管』中(若IL-2係預先製備，則為10 mL，或若IL-2係新鮮製備，則為40 mL)。

【2848】計算添加至Plasmalyte+1% HSA中的經復原之IL-2的體積：經復原之IL-2的體積=(IL-2之最終濃度×最終體積)/IL-2之比活性(基於標準分析法)。IL-2之最終濃度為6×10^4 IU/mL。最終體積為40 mL。

【2849】移出所計算之經復原之IL-2所需之初始體積之IL-2且轉移至『IL-2 6×10^4 IU/mL』管中。將來自預先製備之等分試樣的100 μL IL-2 6×10^6 IU/mL添加至含有10 mL LOVO洗滌緩衝液之標記為『IL-2 6×10^4 IU/mL』之管中。

【2850】自G-REX-500MCS瓶移出約4500 mL上清液。旋轉剩餘的上清液且將細胞轉移至細胞收集池袋中。

對所有G-REX-500MCS瓶重複上述操作。

【2851】移出60 mL上清液且添加至上清液管中以用於品質對照分析法，包括黴漿菌偵測。儲存在+2-8℃下。

【2852】細胞收集。對細胞進行計數。製備四個具有4.5 mL AIM-V之15 mL錐形管。此等錐形管可預先製備。最佳範圍=介於5×10^4與5×10^6個細胞/毫升之間。(推薦1:10稀釋度)。對於1:10稀釋度，向先前製備之4500 µL AIM V中添加500 µL CF。記錄稀釋因數。

計算預LOVO(存活+死亡)的TC(總細胞)=

平均總細胞

濃度(預LOVO TC濃度)

(存活+死亡)

X

源袋之體積

計算預LOVO(存活)的TVC(總活細胞)=

平均總活細胞

濃度(預LOVO TVC)

(存活)

X

LOVO源袋之體積

【2853】當總細胞(TC)數目>5×10^9時，移出5×10^8個細胞以冷凍保存為MDA保留樣品。5×10^8÷平均TC濃度(步驟14.44)=待移出之體積。

【2854】當總細胞(TC)數目≤5×10^9時，移出4×10^6個細胞以冷凍保存為MDA保留樣品。4×10^6÷平均TC濃度=待移出之體積。

【2855】當測定總細胞數目時，待移出之細胞數目應允許保留150×10^9個活細胞。確認預LOVO的TVC為5×10^8或4×10^6或不適用。計算待移出的細胞體積。

【2856】計算袋中剩餘的剩餘總細胞。計算預LOVO的TC(總細胞)。[平均總細胞濃度X剩餘體積=預LOVO剩餘TC]

【2857】根據剩餘的細胞之總數目，選擇表49中之對應過程。

表49. 細胞總數目。

總細胞：	*滯留物(mL)*
0<總細胞≤31×10^9	115
31×10^9<總細胞≤71×10^9	165
71×10^9<總細胞≤110×10^9	215
110×10^9<總細胞≤115×10^9	265

【2858】選擇與所用過程相對應的IL-2添加的體積。體積計算為：滯留物體積×2×300 IU/mL=所需IL-2的IU。所需IL-2的IU/6×10^4 IU/mL=LOVO袋後添加的IL-2體積。記錄所有添加之體積。在冷凍小瓶中獲得樣品用於進一步分析。

【2859】充分混合細胞產物。密封所有袋以用於進一步處理，適當時包括冷凍保存。

【2860】按需要對獲得的冷凍小瓶樣品進行內毒素、IFN-γ、無菌及其他分析法。

實例9：GEN 2及GEN 3例示性過程

【2861】此實例說明Gen 2及Gen 3過程。過程Gen 2及Gen 3 TIL通常由衍生自個別患者(經由手術切除腫瘤)且接著離體擴增之自體TIL構成。Gen 3過程之啟始第一擴增步驟為在存在介白素-2(IL-2)及單株抗體OKT3之情況下進行細胞培養，該單株抗體靶向經照射之周邊血液單核細胞(PBMC)之骨架上的T細胞輔受體CD3。

【2862】Gen 2 TIL產物之製造由兩個階段組成：1)預快速擴增(預REP)，及2)快速擴增方案(REP)。在預REP期間，將切除的腫瘤切割成≤50個各維度為2-3 mm的片段，此等片段用含血清的培養基(含有補充的10% HuSAB之RPMI 1640培養基)及6,000 IU/mL之介白素-2(IL-2)培養11天之時段。在第11天，收集TIL且將其引入大規模二級REP擴增中。REP由以下組成：在5 L體積的補充有3000 IU/mL rhIL-2的CM2中，在5×10^9個經照射之同種異體PBMC飼養細胞的共培養中活化≤200×10^6個來自預REP的活細胞持續5天，該等飼養細胞負載有150 μg單株抗CD3抗體(OKT3)。在第16天，培養物體積降低90%且將細胞級份以≥1×10^9個活淋巴球/瓶拆分至多個G-REX-500瓶中，且用CM4補足至5 L。將TIL再培育6天。在第22天收集REP，洗滌，調配且冷凍保存，隨後在-150℃下運送至臨床站點以

用於輸注。

【2863】Gen 3 TIL產物之製造由三個階段組成：1)啟始第一擴增方案，2)快速第二擴增方案(亦稱為快速擴增階段或REP)，及3)繼代培養物拆分。為了實現啟始第一擴增TIL增殖，將所切除之腫瘤切割成≤120個各維度為2-3 mm的片段。在啟始第一擴增之第0天，在3個100 MCS容器中之每一者中，在約100 cm^2之表面區域上建立約2.5×10^8個同種異體照射的PBMC飼養細胞之飼養層，該等飼養細胞負載有OKT-3。將腫瘤片段分佈在3個100 MCS容器中且在其中用含有500 mL含血清的CM1培養基及6,000 IU/mL的介白素-2(IL-2)及15 μg OKT-3培養7天之時段。在第7天，藉由以下來起始REP：將約5×10^8個負載有OKT-3之同種異體照射的PBMC飼養細胞之額外飼養細胞層併入三個100 MCS容器中之每一者中的腫瘤片段化培養階段中且用500 mL CM2培養基及6,000 IU/mL IL-2及30 μg OKT-3培養。藉由活化同一容器中的整個啟始第一擴增培養物來增強REP起始，該活化係藉由使用密閉系統流體將負載OKT3之飼養細胞轉移至100MCS容器中來實現。對於Gen 3，TIL規模擴大或拆分涉及以下過程步驟：將整個細胞培養物經由密閉系統流體轉移而針對較大容器進行按比例縮放且轉移(自100 M瓶轉移至500 M瓶)且添加額外4 L CM4培養基。在第16天收集REP，洗滌，調配且冷凍保存，隨後在-150℃下運送至臨床站點以用於輸注。

【2864】總體而言，Gen 3過程為更短、可縮放性更

高且易於修改之擴增平台，其將適應穩定製造及過程可比性。

表 50. 例示性 Gen 2 及例示性 Gen 3 製造過程之比較。

步驟	過程(Gen 2)	過程(Gen 3)
預 REP-第 0 天	多達 50 個片段，1 個 G-REX100MCS，11 天 在 1 L CM1 培養基 +IL-2(6000 IU/mL)中	整個腫瘤多達 120 個片段，均勻分佈在多達 3 個瓶中。1 個瓶：1-60 個片段 2 個瓶：61-89 個片段 3 個瓶：90-120 個片段 在 500 mL CM1 培養基 +IL-2(6000 IU/mL)中 7 天 2.5×10^8 個飼養細胞/瓶 15 μg OKT-3/瓶
REP 起始	直接進行 REP，第 11 天， $<200\times10^6$ 個 TIL (1)G-REX-500MCS 於 5 L CM2 培養基中 IL-2(3000 IU/mL) 5×10^9 個飼養細胞 150 μg OKT-3	直接進行 REP，第 7 天，所有細胞，同一 G-REX100MCS 添加 500 CM2 培養基 IL-2(6000 IU/mL) 5×10^8 個飼養細胞/瓶 30 μg OKT-3/瓶
TIL 增殖或規模擴大	體積減少且將細胞級份拆分至至多 5 個 G-REX-500MCS 中 4.5 L CM4 培養基+IL-2(3000 IU/mL) $\geq1\times10^9$ 個 TVC/瓶 第 16 天拆分	將各 G-REX100MCS(1 L)轉移至 1 個 G-REX-500MCS 添加 4 L CM4 培養基+IL-2(3000 IU/mL) 在第 9 天至第 11 天規模擴大
收集	在第 22 天收集， LOVO-自動細胞洗滌器	在第 16 天收集 LOVO-自動細胞洗滌器
最終調配物	冷凍保存產物 300 IU/mL IL2-CS10 於 LN_2 中，多個等分試樣	冷凍保存產物 300 IU/mL IL2-CS10 於 LN_2 中， 多個等分試樣
處理時間	**22 天**	**16 天**

【2865】在第0天，對於兩種過程，將腫瘤洗滌3次且將片段隨機分組且分成兩個池；每種過程一個池。對於Gen 2過程，將片段轉移至一個GREX 100MCS瓶中，該瓶具有含有6,000 IU/mL rhIL-2之1 L CM1培養基。對於Gen 3

過程，將片段轉移至一個G-REX100MCS瓶中，該瓶具有含有6,000 IU/mL rhIL-2、15 μg OKT-3及2.5×10^8個飼養細胞之500 mL CM1。根據各過程在不同的日子進行Rep起始日之TIL的接種。對於其中G-REX100MCS瓶之體積降低90%之Gen 2過程，在第11天將所收集之細胞懸浮液轉移至新的G-REX-500MCS中，以在含有IL-2 (3000 IU/mL)加5×10^9個飼養細胞及OKT-3 (30 ng/mL)之CM2培養基中開始REP起始。根據方案，將細胞擴增且在第16天拆分至多個具有CM4培養基及IL-2 (3000 IU/mL)之G-REX-500 MCS瓶中。接著根據方案，在第22天收集培養物且冷凍保存。對於Gen 3過程，在第7天進行REP起始，其中使用相同的G-REX100MCS進行REP起始。簡言之，向各瓶中添加500 mL含有IL-2 (6000 IU/mL)以及5×10^8個飼養細胞及30 μg OKT-3之CM2培養基。在第9-11天，將培養物之規模擴大。將整個體積的G-REX100M (1 L)轉移至G-REX-500MCS中，且添加4 L含有IL-2 (3000 IU/mL)之CM4。將瓶培育5天。在第16天收集培養物且冷凍保存。

【2866】比較中包括三種不同的腫瘤，兩種肺腫瘤(L4054及L4055)及一種黑色素瘤(M1085T)。

【2867】對於L4054及L4055，CM1 (培養基1)、CM2 (培養基2)及CM4 (培養基4)培養基係預先製備的且保持在4℃下。在不進行過濾之情況下製備CM1及CM2培養基，以比較在進行及不進行培養基之過濾的情況下之細胞生長。

【2868】對於L4055腫瘤，在REP起始及規模擴大

時，將培養基在37℃下升溫至多24小時。

【2869】結果. 對於所實現之總活細胞，Gen 3之結果在Gen 2之結果之30%以內。在再刺激之後，Gen 3最終產物呈現更高的IFN-γ產量。如藉由存在之總獨特CDR3序列所量測，Gen 3最終產物呈現增加之純系多樣性。Gen 3最終產物呈現更長的平均端粒長度。

【2870】Gen 2及Gen 3過程之預REP及REP擴增遵循上文所描述之程序。對於各腫瘤，兩個池含有相等數目之片段。歸因於腫瘤之較小尺寸，無法達成每個瓶之最大片段數目。在Gen 2過程之第11天及Gen 3過程之第7天收集總預REP細胞(TVC)且進行計數。為比較兩個預REP組，將細胞計數除以培養物中所提供之片段之數目，以計算每個片段之活細胞之平均值。如以下表51中所指示，與Gen 3過程相比，以每個片段計，在Gen 2過程中始終生長更多細胞。Gen 3過程之第11天之預期TVC數目之外推計算，計算方法係將預REP TVC除以7且接著乘以11。

表51. 預REP細胞計數

腫瘤ID	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
預REP TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
片段數目	21	21	24	24	16	16
預REP之以每個片段計之平均TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
Gen 3之第11天之預REP之外推值	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

*L4055，未經過濾的培養基。

【2871】對於Gen 2及Gen 3過程，根據過程條件對

TVC進行計數且產生過程中之每天之活細胞百分比。在收集時，收集第22天(Gen 2)及第16天(Gen 3)細胞且產生TVC計數。接著，將TVC除以第0天提供之片段數目，以計算以每個片段計之活細胞的平均值。藉由將所收集之TVC除以REP起始TVC來計算擴增倍數。如表52所示，比較Gen 2及Gen 3，對於L4054，擴增倍數係類似的；在L4055之情況下，Gen 2過程之擴增倍數更高。特定言之，在此情況下，在REP起始日之前使培養基升溫24。對於M1085T，在Gen 3中亦觀測到較高擴增倍數。Gen 3過程之第22天之預期TVC數目之外推計算，計算方法係將REP TVC除以16且接著乘以22。

表52. TIL最終產物之總活細胞計數及擴增倍數。

腫瘤ID	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
#片段	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC/片段(在收集時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP起始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
規模擴大	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
收集	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
擴增倍數，收集/REP起始	**468.4**	**425.9**	**2056.8**	**634.6**	**925.0**	**2197.2**
Gen 3之第22天之REP收集之外推值	**N/A**	**2.53E+10**	**N/A**	**1.20E+10**	**N/A**	**1.06E+10**

*L4055，未經過濾的培養基。

【2872】表53：TIL最終產物之存活百分比：在收集後，針對存活百分比之放行準則來比較最終TIL REP產物。Gen 2及Gen 3過程之所有條件皆超過70%存活率準則，且在各過程及腫瘤中係類似的。

【2873】在收集後，針對存活百分比之放行準則來比

較最終TIL REP產物。Gen 2及Gen 3過程之所有條件皆超過70%存活率準則，且在各過程及腫瘤中係類似的。

表53. REP之存活百分比(TIL最終產物)

腫瘤ID	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
過程	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
REP起始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
規模擴大	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
收集	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【2874】由於每個瓶之片段數目低於最大所需數目，故針對各腫瘤計算在收集日所估計之細胞計數。該評估係基於以下預期：臨床腫瘤在第0天足夠大以接種2個或3個瓶。

表54. 將估計細胞計數計算值外推至Gen 3過程之全尺寸2及3個瓶。

腫瘤ID	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Gen 3過程	**2個瓶**	**3個瓶**	**2個瓶**	**3個瓶**	**2個瓶**	**3個瓶**
估計收集	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

【2875】免疫表現型分析-TIL最終產物之表現型標記物比較。三種腫瘤L4054、L4055及M1085T在Gen 2及Gen 3過程中皆經歷TIL擴增。在收集後，對REP TIL最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。對於所有條件，TCR a/b+細胞之百分比超過90%。

【2876】與自Gen 2過程收集的TIL相比，自Gen 3過程收集之TIL展示更高的CD8及CD28之表現。Gen 2過程展示較高的CD4+百分比。

【2877】與自Gen 2過程收集之TIL相比，自Gen 3過

程收集之TIL展示更高的中樞記憶室之表現。

【2878】在來自兩個腫瘤L4054及L4055之TIL中分析活化及耗減標記物，以比較來自Gen 2及Gen 3 TIL擴增過程之最終TIL產物。Gen 2及Gen 3過程之活化及耗減標記物係類似的。

【2879】再刺激時之干擾素γ分泌。在收集日，即Gen 2的第22天及Gen 3的第16天，對於L4054及L4055，使用經塗佈之抗CD3盤對TIL進行再刺激隔夜。使用抗CD3、CD28及CD137珠粒對M1085T進行再刺激。在所有條件下，在再刺激24小時後收集上清液且冷凍上清液。使用相同ELISA盤同時對來自兩種過程之上清液評估藉由ELISA進行之IFNγ分析。在所分析之三個腫瘤中觀測到來自Gen 3過程之較高的IFNγ產量。

【2880】培養基中之IL-2含量之量測。為了比較Gen 2與Gen 3過程之IL-2消耗，對於腫瘤L4054及L4055，在REP起始、規模擴大及收集日收集細胞上清液。藉由來自R&D之Quantitate ELISA套組量測細胞培養物上清液中之IL-2的量。一般趨勢指示當與Gen 2過程相比時，Gen 3過程中之IL-2濃度保持較高。此可能歸因於Gen 3的REP起始時之IL-2濃度較高(6000 IU/mL)以及整個過程中培養基之殘留。

【2881】代謝受質及代謝物分析。量測代謝受質(諸如D-葡萄糖及L-麩醯胺酸)之含量作為整體培養基消耗之代替物。量測其互逆代謝物，諸如乳酸及氨。葡萄糖係培

養基中之單糖，粒線體利用其以ATP形式產生能量。當葡萄糖氧化時，產生乳酸(乳酸酯為乳酸之酯)。在細胞指數生長期期間大量產生乳酸酯。高含量之乳酸酯會對細胞培養過程產生負面影響。

【2882】對於Gen 2及Gen 3過程，在REP起始、規模擴大及收集日收集L4054及L4055之用過培養基。在Gen 2之第11天、第16天及第22天且在Gen 3之第7天、第11天及第16天收集用過培養基。用CEDEX生物分析儀分析上清液中之葡萄糖、乳酸、麩醯胺酸、GlutaMax™及氨之濃度。

【2883】L-麩醯胺酸係細胞培養基調配物中所需的一種不穩定的必需胺基酸。麩醯胺酸含有胺，及此醯胺結構基團可向細胞輸送及遞送氮。當L-麩醯胺酸氧化時，細胞會產生有毒的氨副產物。為了抵消L-麩醯胺酸之降解，向Gen 2及Gen 3過程之培養基中補充GlutaMax™，其在水溶液中更穩定且不會自發降解。在兩個腫瘤株系中，Gen 3組在過程期間展示L-麩醯胺酸及GlutaMax™之減少，以及整個REP中氨之增加。在Gen 2組中，觀測到恆定的L-麩醯胺酸及GlutaMax™濃度，以及氨產量略微增加。對於氨，Gen 2及Gen 3過程在收集日時係類似的，且展示L-麩醯胺酸降解之略微差異。

【2884】藉由Flow-FISH重複端粒。使用Flow-FISH技術量測在Gen 2及Gen 3過程中，L4054及L4055上之端粒重複之平均長度。使用來自DAKO之用於流動式細胞測量術分析的端粒PNA套組/FITC計算相關端粒長度(RTL)之測定

結果。Gen 3展示與Gen 2類似的端粒長度。

【2885】CD3分析。為了測定各過程中產生的細胞產物之純系多樣性，對L4054及L4055之所收集之TIL最終產物進行取樣，且經由T細胞受體之CDR3部分的定序來分析以用於純系多樣性分析。

【2886】表55展示Gen 2及Gen 3之間的在TIL收集細胞產物上，共有L4054上之獨特CDR3序列百分比之比較。Gen 3與Gen 2最終產物共有199個序列，對應於Gen 2最終產物中之前80%的獨特CDR3序列中之97.07%係與Gen 3最終產物共有。

表55. L4054上Gen 2與Gen 3過程之間的共有uCDR3序列之比較。

#uCDR3 (重疊%)	所有uCDR3		前80%的uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355(48.85%)	205	199(97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

【2887】表56展示Gen 2及Gen 3之間的在TIL收集細胞產物上，共有L4055上之獨特CDR3序列百分比之比較。Gen 3與Gen 2最終產物共有1833個序列，對應於Gen 2最終產物中之前80%的獨特CDR3序列中之99.45%係與Gen 3最終產物共有。

表56. L4055上Gen 2與Gen 3過程之間的共有uCDR3序列之比較。

#uCDR3 (重疊%)	所有uCDR3		前80%的uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599(50.77%)	1843	1833(99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

【2888】在不進行過濾之情況下預先製備CM1及CM2培養基且保持在4℃下，直至用於腫瘤L4055以用於Gen 2及Gen 3過程。

【2889】對於L4055腫瘤，在REP起始日，使培養基在37℃下升溫24小時以用於Gen 2及Gen 3過程。

【2890】在過程中收集的上清液中未量測到LDH。

【2891】用K2 cellometer細胞計數器進行M1085T TIL細胞。

【2892】在腫瘤M1085T上，樣品不可用，諸如用於代謝分析之上清液；用於活化及耗減標記物分析、端粒長度及CD3-TCR vb分析之TIL產物。

【2893】結論。此實例針對功能品質屬性以及Gen 2及Gen 3過程之擴展表現型表徵及培養基消耗來比較3個獨立供體腫瘤組織。

【2894】根據所產生之總活細胞及總有核細胞群體之存活率來評估Gen 2及Gen 3預REP及REP擴增比較。Gen 2(22天)與Gen 3(16天)之收集日之TVC細胞劑量之間無可比性。Gen 3細胞劑量低於Gen 2，為在收集時所收集的總活細胞之約40%。

【2895】假設在第11天而非第7天進行預REP收集且在第22天而非第16天進行REP收集，計算Gen 3過程之外推細胞數目。在此兩種情況下，與Gen 2過程相比，Gen 3展示更類似的TVC數目，表明早期活化增強型TIL增長。

【2896】在外推Gen 3過程中之其他瓶(2或3)之值的情況下，假設所處理的腫瘤之尺寸更大，且達到如所描述之每個過程所需的最大片段數目。觀測到，與Gen 2過程之第22天相比，Gen 3過程在第16天進行之收集可實現類似的TVC劑量。此觀測結果為重要的，且指示培養物之早期活化可減少TIL處理時間。

【2897】根據所產生之總活細胞及總有核細胞群體之存活率來評估Gen 2及Gen 3預REP及REP擴增比較。Gen 2(22天)與Gen 3(16天)之收集日之TVC細胞劑量之間無可比性。Gen 3細胞劑量低於Gen 2，為在收集時所收集的總活細胞之約40%。

【2898】就表現型表徵而言，與Gen 2過程相比，在Gen 3過程中在三個腫瘤上觀測到較高的CD8+及CD28+表現。

【2899】與Gen 2過程相比，Gen 3過程展示略微較高的中樞記憶隔室。

【2900】儘管Gen 3過程的持續時間較短，但Gen 2及Gen 3過程展示類似的活化及耗減標記物。

【2901】在所分析之三個腫瘤中，Gen 3最終產物上之IFNγ(IFN gamma)產量比Gen 2高3倍。此資料表明，與Gen 2過程相比，Gen 3過程產生功能強大且更有效的TIL產物，此可能歸因於Gen 3上之CD8及CD28的表現更高。表現型表徵表明，在三個腫瘤上，與Gen 2過程相比，Gen 3之CD8+、CD28+表現之陽性趨勢。

【2902】Gen 2及Gen 3之TIL最終產物之端粒長度類似。

【2903】Gen 2及Gen 3最終產物之葡萄糖及乳酸鹽含量類似，表明Gen 3過程之培養基上的營養物含量未受到影響，因為與Gen 2相比，在過程中之每一天皆未進行減量移除且過程中之整體培養基體積較小。

【2904】與Gen 2過程相比，整個Gen 3過程的處理時間減少約兩倍，此將顯著降低藉由Gen 3過程擴展的TIL產物之商品成本(COG)。

【2905】IL-2消耗表明Gen 2過程中之IL-2消耗之一般趨勢，且在Gen 3過程中，由於未移除舊培養基，因此IL-2較高。

【2906】藉由CDR3 TCRab序列分析，Gen 3過程展示較高的純系多樣性。

【2907】在預REP的第0天添加飼養細胞及OKT-3允許TIL的早期活化且允許使用Gen 3過程進行TIL生長。

【2908】表57描述與當前Gen 2過程相比，Gen 3過程之各種實施例及結果。

表 57. 例示性 Gen 3 過程特徵。

步驟	過程 Gen 2 實施例	過程 Gen 3 實施例
預 REP-第 0 天	≤50 個片段 1X G-REX100MCS 1 L 培養基 IL-2(6000 IU/mL) 11 天	≤240 個片段 ≤60 個片段/瓶 ≤4 個瓶 ≤2 L 培養基(500 毫升/瓶) IL-2(6000 IU/mL) $2.5x10^8$ 個飼養細胞/瓶 15 μg OKT3/瓶
REP 起始	新鮮 TIL 直接進行 REP 第 11 天 ≤$200e^6$ 個活細胞 $5×10^9$ 個飼養細胞 G-REX-500MCS 5 L CM2 培養基+IL-2(3000 IU/mL) 150 μg OKT3	新鮮 TIL 直接進行 REP 第 7 天 活化整個培養物 $5×10^8$ 個飼養細胞 30 μg OKT3/瓶 G-REX100MCS 500 mL 培養基+IL-2(6000 IU/mL)
TIL 繼代培養或規模擴大	≤5 個 G-REX-500MCS ≤1×10 個活細胞/瓶 5 L/瓶 第 16 天	≤4 個 G-REX-500MCS 將整個培養物規模擴大 4 L/瓶 第 10-11 天
收集	在第 22 天收集， LOVO-自動細胞洗滌器 2 個洗滌週期	在第 16 天收集 LOVO-自動細胞洗滌器 5 個洗滌週期
最終調配物	冷凍保存產物 300 IU/mL IL2-CS10 於 LN_2 中， 多個等分試樣	冷凍保存產物 300 IU/mL IL-2-CS10 於 LN_2 中， 多個等分試樣
處理時間	22 天	16 天

實例 10：例示性 GEN 3 過程(亦稱為 GEN 3.1)

【2909】此實例描述關於「用於 TIL 擴增的 Gen 2 及 Gen 3 過程之間的可比較性」的其他研究。Gen 3 過程經修改以在該過程早期包括活化步驟，從而增加最終總活細胞(TVC)輸出，同時維持表現型及功能概況。如下文所描述，將 Gen 3 實施例修改為另一實施例且在本文中在此實例中稱為 Gen 3.1。

【2910】在一些實施例中，Gen 3.1 TIL製造過程具有四個操作員介入：

1. 腫瘤片段分離及活化：在過程之第0天，解剖腫瘤且產生各自為約3×3 mm之最終片段(總共至多240個片段)且在1至4個G-REX100MCS瓶中培養。各瓶含有至多60個片段、500 mL CM1或DM1培養基，且補充有6,000 IU rhIL-2、15 μg OKT3及2.5×10^8個經照射之同種異體單核細胞。將培養物在37℃下培育6至8天。

2. TIL培養物再活化：在第7至8天，在兩種情況下，經由緩慢添加補充有6,000 IU rhIL-2、30 μg OKT3及5×10^8個經照射之同種異體單核細胞之CM2或DM1培養基來補充培養物。注意不要干擾瓶底部之現有細胞。將培養物在37℃下培育3至4天。

3. 培養規模擴大：在第10至11天進行。在培養規模擴大期間，在兩種情況下，將G-REX100MCS之全部內含物轉移至含有4 L補充有3,000 IU/mL IL-2之CM4或DM2之G-REX500MCS瓶中。將瓶在37℃下培育5至6天直至收集。

4. 收集/洗滌/調配：在第16至17天，將瓶體積減小且合併。將細胞濃縮且用含有1% HSA之PlasmaLyte A pH 7.4洗滌。經洗滌之細胞懸浮液與CryoStor10以1:1之比率調配，且補充rhIL-2至最終濃度為300 IU/mL。

【2911】藉由受控速率冷凍將DP冷凍保存且儲存在氣相液氮中。*完整標準TIL培養基1、2或4(CM1、CM2、CM4)

可替代稱為確定培養基(DM1或DM2)之CTS™OpTmizer™ T細胞無血清擴增培養基，如上文所提及。

【2912】過程描述。在第0天，將腫瘤洗滌3次，接著片段化成3×3×3之最終片段。在將整個腫瘤片段化後，接著將最終片段同等地隨機化且分成三個池。將一個隨機化片段池引入各組，根據三種實驗基質添加相同數目之片段。

【2913】在整個TIL擴增過程中，使用標準培養基進行腫瘤L4063擴增，且使用確定培養基(CTS OpTmizer)進行腫瘤L4064擴增。培養基之組分描述於本文中。

【2914】CM1完整培養基1：RPMI+麩醯胺酸，補充有2 mM GlutaMax™、10%人類AB血清、建它黴素(50 μg/mL)、2-巰基乙醇(55 μM)。最終培養基調配物補充有6000 IU/mL IL-2。

【2915】CM2完整培養基2：50% CM1培養基+50% AIM-V培養基。最終培養基調配物補充有6000 IU/mL IL-2。

【2916】CM4完整培養基4：補充有GlutaMax™(2 mM)之AIM-V。最終培養基調配物補充有3000 IU/mL IL-2。

【2917】補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)之CTS OpTmizer CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。

【2918】DM1：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增

補充劑(26 mL/L)以及CTS™免疫細胞SR(3%)及GlutaMax™(2 mM)之CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。最終調配物補充有6,000 IU/mL IL-2。

【2919】DM2：補充有CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增補充劑(26 mL/L)以及CTS™免疫細胞SR(3%)及GlutaMax™(2 mM)之CTS™OpTmizer™ T細胞擴增基礎培養基。最終調配物補充有3,000 IU/mL IL-2。

【2920】預先製備所使用之所有類型之培養基，亦即，完整(CM)及確定(DM)培養基，保持在4℃下直至使用前一天，且在處理日之前預先在培育箱中，在37℃下升溫長達24小時。

【2921】對於兩種腫瘤，在第7天進行TIL培養物再活化。對於L4063在第10天且對於L4064在第11天進行規模擴大。收集兩種培養物且在第16天冷凍保存。

【2922】達成的結果。測定Gen 3.0及Gen 3.1過程之細胞計數及存活百分比。在所有條件下之擴增皆遵循此實例中所描述之細節。

【2923】對於各腫瘤，將片段分成三個相等數目之池。歸因於腫瘤之較小尺寸，無法達成每個瓶之最大片段數目。對於三種不同的過程，評估在各條件下的總活細胞及細胞存活率。細胞計數測定為在第7天進行再活化時之TVC、在第10天(L4064)或第11天(L4063)進行規模擴大時之TVC，以及在第16/17天進行收集時之TVC。

【2924】第7天及第10/11天之細胞計數視為FIO。藉

由將在第16/17天進行收集時之TVC除以第7天再活化日之TVC來計算擴增倍數。為了比較三個組，將收集日之TVC除以在第0天添加至培養物中之片段的數目，以計算以每個片段計之活細胞之平均值。

【2925】對L4063及L4064進行細胞計數及存活率分析法。在兩個腫瘤上，以每個片段計，Gen 3.1測試過程比Gen 3.0過程產生更多的細胞。

【2926】總活細胞計數及擴增倍數；在過程期間之存活百分比。在再活化、規模擴大及收集後，獲得在所有條件下之存活百分比。在第16/17天收集後，針對存活百分比之放行準則來比較最終TIL。在所有過程及腫瘤中，所評估之所有條件皆超過70%的存活率準則且係類似的。

【2927】免疫表現型分析-TIL最終產物之表現型表徵。對最終產物進行流動式細胞測量術分析，以測試純度、分化及記憶標記物。在所有條件下，TCRα/β、CD4+及CD8+細胞之群體百分比係恆定的。

【2928】進行REP TIL之擴展表現型分析。在兩個腫瘤中，TIL產物展示與Gen 3.0相比，在Gen 3.1條件下更高的CD4+細胞百分比，且在兩種條件下，與Gen 3.1條件相比，在Gen 3.0下更高的來自CD8+群體之CD28+細胞百分比。

【2929】自Gen 3.0及Gen 3.1過程收集之TIL展示與CD4+及CD8+細胞上之CD27及CD56表現類似的表現型標記物，以及CD4+圈選細胞群體上之類似的CD28表現。

TIL最終產物上之記憶標記物比較：

【2930】將在第16天收集之TIL之冷凍樣品染色以用於分析。Gen 3.0及Gen 3.1過程之TIL記憶狀態係類似的。

TIL最終產物上之活化及耗減標記物比較：

【2931】CD4+及CD8+細胞上圈選之Gen 3.0及Gen 3.1過程之活化及耗減標記物係類似的。

【2932】再刺激後之干擾素γ分泌。對於L4063及L4064，使用經塗佈之抗CD3盤對所收集之TIL進行再刺激隔夜。在所分析之兩個腫瘤中，與Gen 3.0過程相比，觀測到來自Gen 3.1過程之較高的IFNγ產量。

【2933】培養基中之IL-2含量之量測。為比較在所有條件及過程下之IL-2消耗量，在第7天之再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)之規模擴大及第16天/第17天之收集時收集細胞上清液且冷凍。接著將上清液解凍且接著分析。藉由製造商方案量測細胞培養物上清液中之IL-2之量。

【2934】在相同培養基條件下評估之整個過程期間，整個Gen 3及Gen 3.1過程之IL-2消耗係類似的。對所收集之L4063及L4064之用過培養基進行IL-2濃度(pg/mL)分析。

【2935】代謝物分析。對於每種條件，在L4063及L4064之第7天再活化起始、第10天(L4064)/第11天(L4063)規模擴大及第16天/第17天收集時自L4063及L4064收集用過培養基上清液。用CEDEX生物分析儀分析上清液之葡萄

糖、乳酸酯、麩醯胺酸、GlutaMax™及氨之濃度。

【2936】與完整培養基(2 g/L)相比，確定培養基中之葡萄糖濃度較高，為4.5 g/L。總體而言，在各培養基類型中，Gen 3.0及Gen 3.1過程的葡萄糖之濃度及消耗係類似的。

【2937】觀測到乳酸酯之增加，且Gen 3.0及Gen 3.1條件以及用於再活化擴增之兩種培養基(完整培養基及確定培養基)之乳酸酯之增加係類似的。

【2938】在一些情況下，標準基礎培養基含有2 mM L-麩醯胺酸且補充有2 mM GlutaMax™以補償L-麩醯胺酸在培養條件下天然降解為L-麩胺酸及氨。

【2939】在一些情況下，所使用之確定(無血清)培養基與基礎培養基相比不含L-麩醯胺酸，且僅補充有最終濃度為2 mM之GlutaMax™。GlutaMax™係L-丙胺酸及L-麩醯胺酸之二肽，在水溶液中比L-麩醯胺酸更穩定，且不會自發降解為麩胺酸及氨。相反，二肽逐漸解離成個別胺基酸，從而保持較低但足夠濃度的L-麩醯胺酸，以維持穩定的細胞生長。

【2940】在一些情況下，麩醯胺酸及GlutaMax™之濃度在規模擴大日略微降低，但在收集日展示增加，達到與再活化日相比類似或更接近之含量。對於L4064，在整個過程期間，麩醯胺酸及GlutaMax™濃度在不同條件下展示以類似速率進行之略微降低。

【2941】與在含有2 mM GlutaMax™之確定培養基中

生長之樣品相比，在含有2 mM麩醯胺酸+2 mM GlutaMax™之標準培養基中生長之樣品中之氨濃度更高。此外，如所預期，在培養過程中，存在氨之逐漸增加或積聚。在三種不同測試條件下，不存在氨濃度之差異。

【2942】藉由Flow-FISH重複端粒。使用Flow-FISH技術量測在Gen 3及Gen 3.1過程中，L4063及L4064上之端粒重複之平均長度。使用來自DAKO之用於流動式細胞測量術分析的端粒PNA套組/FITC計算相關端粒長度(RTL)之測定結果。進行端粒分析法。比較樣品與對照細胞株(1301白血病)中之端粒長度。對照細胞株為具有允許計算相對端粒長度之長穩定端粒的四倍體細胞株。在兩種腫瘤中評估之Gen 3及Gen 3.1過程展示類似的端粒長度。

TCR Vβ譜系分析

【2943】為了測定在各過程中產生之細胞產物之純系多樣性，經由對T細胞受體之CDR3部分進行定序來分析TIL最終產物以進行純系多樣性分析。

【2944】在三種條件之間比較三個參數：

- 獨特CDR3(uCDR3)之多樣性指數
- 共有uCDR3百分比
- 對於前80%的uCDR3：
  - 比較共有uCDR3複本百分比
  - 比較獨特純系型之出現率

【2945】對照及Gen 3.1測試，TIL收集細胞產物上之

共有獨特CDR3序列之百分比：Gen 3及Gen 3.1測試最終產物共有975個序列，等效於Gen 3之前80%的獨特CDR3序列中之88%係與Gen 3.1共有。

【2946】對照及Gen 3.1測試，TIL收集細胞產物上之共有獨特CDR3序列之百分比：Gen 3及Gen 3.1測試最終產物共有2163個序列，等效於Gen 3之前80%的獨特CDR3序列中之87%係與Gen 3.1共有。

【2947】不同過程之由在第16天收集時所收集之1×10^6個細胞鑑別的獨特CD3序列之數目。基於樣品內之獨特肽CDR之數目，Gen 3.1測試條件與Gen 3.0相比展示略微更高的純系多樣性。

【2948】夏儂熵(Shannon entropy)多樣性指數為可靠及常用的比較度量，因為在兩種腫瘤中，Gen 3.1條件與Gen 3過程相比展示略微更高的多樣性，表明Gen 3.1測試條件之TCR Vβ譜系之多株性高於Gen 3.0過程。

【2949】此外，對於腫瘤L4063及L4064，Gen 3.1測試條件之TCR Vβ譜系展示與Gen 3.0過程之相應譜系之超過87%的重疊。

【2950】在再活化日，用於Gen 3.1測試L4064之用過培養基上的IL-2濃度值低於預期值(與Gen 3.1對照及Gen 3.0條件類似)。

【2951】該低值可能歸因於移液誤差，但由於採集的樣品極少，因此不可能重複分析法。

【2952】結論。與Gen 3.0及Gen 3.1對照物相比，在

第0天包括飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1測試條件在第16天收集時展示更高的細胞劑量之TVC。Gen 3.1測試條件下之最終產物的TVC比Gen 3.0高約2.5倍。

【2953】對於所測試之兩種腫瘤樣品，在第0天添加OKT-3及飼養細胞之Gen 3.1測試條件在收集時達到瓶之最大容量。在此等條件下，若在第0天起始最多4個瓶，則最終細胞劑量可在80-100×10^9個TIL之間。

【2954】在Gen 3.1測試及Gen 3.0過程之間保持所有品質屬性，例如表現型表徵，包括最終TIL產物之純度、耗減、活化及記憶標記物。

【2955】在所分析之兩種腫瘤中，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1中的最終TIL產物的IFN-γ產生比Gen 3.0高3倍，表明Gen 3.1過程產生有效的TIL產物。

【2956】在各測試條件下未觀測到葡萄糖或乳酸酯含量之差異。在各種培養基條件下，未觀測到Gen 3.0與Gen 3.1過程之間的麩醯胺酸及氨之差異。培養基中之較低麩醯胺酸含量未限制細胞生長，且表明僅在培養基中添加GlutaMax™便足以提供細胞增殖所需之營養物。

【2957】分別在第11天及第10天進行規模擴大，且在過程之收集日所達到之細胞數目方面未展示顯著差異，且在兩種情況下，在整個過程期間之代謝物消耗係類似的。此觀測結果表明Gen 3.0最佳化過程可在處理天數方面具有靈活性，藉此促進製造排程之靈活性。

【2958】藉由CDR3 TCRab序列分析所量測，與Gen

3.0相比，在第0天添加飼養細胞及OKT-3之Gen 3.1過程展示更高的純系多樣性。

【2959】圖32描述Gen 3過程(Gen 3最佳化過程)之實施例。標準培養基及CTS Optimizer無血清培養基可用於Gen 3最佳化過程TIL擴增。在使用CTS Optimizer無血清培養基之情況下，建議將培養基上的GlutaMax™之最終濃度增加至4 mM。

實例11：經修飾之具有膜錨定之IL-15及IL-21免疫調節融合蛋白質之TIL之製備及表徵

材料及方法

病毒製備及T細胞轉導

【2960】為了製備慢病毒，將含有經栓繫之細胞介素基因序列(表58)之pLenti-載體及封裝輔助載體(VSV-G，Gag/Pol)共同轉染至293T細胞中。自第2-3天培養物上清液收集慢病毒上清液，接著進行超離心(120,000 g)以濃縮慢病毒以用於TIL轉導。在T細胞轉導之前，用TransACT (1:100)刺激預REP細胞2天。將1E5個經活化之預REP細胞與經濃縮之慢病毒一起添加至預塗有Retronectin之48孔盤中。在基因轉導之後兩天，收集預REP細胞以用於REP過程或其他表現型表徵及功能分析法。

表 58. 膜錨定之 IL-15 及 IL-21 融合蛋白質 DNA 序列

構築體	DNA 序列
teIL-15	atggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggtcaacgtgatcagcgacctgaa gaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccgatgtgcaccctagctgcaaag tgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgccagcatccacgataccgtgg aaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgagga actggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtggc ggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcggaggttccggcggaggatctcttcagctcctg ccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcacgtactgtttcgctccccggtgcagaga gagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg(SEQ ID NO:296)
teIL-21	atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagaccggcacatgatccgg atgagacagctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagttcctgcctgctcctgag gacgtggaaacaaattgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcgccaacaccggcaacaa cgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccggaagaaggcagaagcac agactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcctccaaaagagttcctggaacggttcaagagcctgctgcag aagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattctagcggaggcggaggaagtggtggcgga ggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggtggaagcggtggtggtggc tctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacactgatctccgtgaacggc atcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaacgagcggctgagaagagaa tctgtgcggcctgtt(SEQ ID NO:297)
teIL-15/ IL21	atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagaccggcacatgatccgg atgagacagctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagttcctgcctgctcctgag gacgtggaaacaaattgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcgccaacaccggcaacaa cgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccggaagaaggcagaagcac agactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcctccaaaagagttcctggaacggttcaagagcctgctgcag aagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattctagcggaggcggaggaagtggtggcgga ggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggtggaagcggtggtggtggc tctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacactgatctccgtgaacggc atcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaacgagcggctgagaagagaa tctgtgcggcctgttagagccaagagatctggaagcggcgccaccaactttagcctgctgaaacaggctggcgacgtgga agagaaccctggacctatggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggtcaacg tgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccgatgtg cacctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgccag catccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggct gcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgttcatca acacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcggaggttccggcggga ggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcacgtactgtttcg ctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg(SEQ ID NO:298)

流動式細胞測量術

【2961】為了檢驗經轉導之細胞中之mIL-15表現，使用生物素-結合物IL-15(biolgend, San Diego, CA)加鏈黴抗生物素蛋白-BV421(Biolegend, San Diego, CA)將經轉導之細胞染色。為了檢驗mIL-21表現，使用PE結合之IL-21抗

體將經轉導之細胞染色。為了檢驗T細胞分裂，使用CellTrace™紫細胞增殖染料(ThermoFisher scientific, Waltham, MA)預先標記T細胞。在5天之後，在存在或不存在IL-2(20 IU/mL)之情況下，在離體培養物中分析T細胞分裂。為了檢驗T細胞活化及分化，使用來自碧迪生物科學、Biolegend、賽默飛世爾之抗體進行表現型表徵。用BioRad ZE5流式細胞儀獲取資料且用FlowJo軟體(FlowJo, LLC, Ashland, OR)進行分析。

T細胞計數及存活率

【2962】在TIL擴增之後收集REP細胞。使用Cellometer K2細胞計數器(Nexcelom, Lawrence, MA)藉由AOPI分析法評估活細胞數目。

預REP及REP過程

【2963】將人類腫瘤樣品解剖成約3 mm片狀物且與推薦的含有IL-2(6000 IU/mL)之培養基一起在Grex10中培養。在培養11天之後，收集預REP細胞以用於2天活化及2天慢病毒轉導。接著，在REP擴增過程中用經照射之PBMC、抗CD3抗體及3,000 IU/mL IL-2將經轉導之預REP細胞再繁殖11天。

結果

基因轉導之後的mIL-15/mIL-21之表現

【2964】在基因轉導之後，用300 IU/mL IL-2將經轉導之預REP細胞再離體擴增5天。藉由流動式細胞測量術染色，經轉導之預REP細胞呈現mIL-15及mIL-21之表現。如圖38A中所示，存在經mIL-15慢病毒轉導之TIL中之54.8% mIL-15之表現、經mIL-21轉導之TIL中之53.5% mIL-21之表現以及經mIL-15/IL21轉導之TIL中之36.5% mIL-15/mIL-21雙重陽性細胞之表現。使用未經轉導之細胞作為陰性對照。

mIL-15預REP細胞呈現pSTAT5信號傳導之持續活化且展示增加之增殖

【2965】在驗證表面細胞介素表現之後，檢驗T細胞功能性。STAT5之磷酸化為在γ鏈細胞介素刺激後T細胞活化之標誌。在血清饑餓之條件下，經mIL-15、mIL-21及mIL-15/IL-21慢病毒轉導之細胞顯示持續的pSTAT5信號傳導，指示mIL-15具有功能性。如圖38B中所示，在誘導pSTAT5活化方面，mIL-15優於mIL-21。此外，藉由CellTrace增殖分析法檢驗經mIL-15慢病毒轉導之TIL之細胞增殖。在存在或不存在IL-2之情況下，將預先經CellTrace紫標記之TIL離體培養5天。如圖38C中所示，在存在或不存在IL-2之情況下，mIL-15 TIL與mIL-21或mIL-15/IL-21 TIL相比呈現優良的增殖能力。mIL-15 TIL可在不存在IL-2之情況下增殖，表明mIL-15可替代IL-2提供增殖信號。

REP過程之後的mIL-15/mIL-21之表現

【2966】在慢病毒轉導之後，在REP過程中將TIL擴增11天。接著，藉由流動式細胞測量術評估膜結合之細胞介素受體之表面表現。如圖39A中所示，存在mIL-15 TIL中之31.1% mIL-15之表現、mIL-21 TIL中之63% mIL-21之表現以及mIL-15/IL21 TIL中之10.7% mIL-15/mIL-21雙重陽性細胞之表現。使用未經轉導之細胞作為陰性對照。

mIL-15/mIL-21之表現促進REP過程中之CD8T細胞擴增

【2967】在所收集之REP細胞中，在經mIL-15、mIL-21及mIL-15/IL-21慢病毒轉導之TIL中偵測到CD8+ T細胞百分比之增加(圖39B及圖39C)。此與先前報導一致，該等先前報導證實IL-15及IL-21充當優先刺激CD8 T細胞之增殖及存活之強效刺激劑。

表現mIL-15/mIL-21之REP TIL之表現型

【2968】為了表徵mIL-15及mIL-21對REP細胞之免疫調節作用，在圈選之CD8+CD3+ T細胞(圖40)及CD4+CD3+ T細胞子集(圖41)中用新鮮解凍之REP細胞進行表現型分析。吾人發現mbIL-15顯著下調CD25(IL-2Rα)表現與IL-2相同，IL-15在使用IL-2Rβ及IL-2Rγ方面進行競爭，表明調節CD25之負反饋機制。此外，mIL-15似乎活化T細胞，其特徵在於較高的TIM3、TOX之表現，而IL-21呈現拮抗劑作用。此外，mIL-15及mIL-21皆下調Eomes之表現。未

觀測到其他表面標記物(諸如PD-1、CD27、CXCR3等)之表現之顯著差異。

實例12：經修飾之具有膜錨定之IL-15及IL-21免疫調節融合蛋白質之TIL之製備及表徵

【2969】對於此研究，將製備經修飾之具有膜錨定之IL-15及/或IL-21免疫調節融合蛋白質之TIL，其中使用NFAT啟動子控制膜錨定之免疫調節IL-15及IL-21之表現，該啟動子包括連接至最小人類IL-2啟動子之NFAT反應性元件，參見例如表59。將如以下所闡述來表徵經修飾之TIL。

材料及方法

病毒製備及T細胞轉導

【2970】為了製備慢病毒，將含有經栓繫之細胞介素基因序列(表59)之pLenti-載體及封裝輔助載體(BaEV-TR，Gag/Pol)共同轉染至293T細胞中。自第2-3天培養物上清液收集慢病毒上清液，接著進行超離心(120,000 g)以濃縮慢病毒以用於TIL轉導。將1E5個預REP細胞與經濃縮之慢病毒一起添加至預塗有Retronectin之48孔盤中。在基因轉導之後兩天，收集預REP細胞以用於REP過程或其他表現型表徵及功能分析法。

表 59. 膜錨定之 IL-12、IL-15 及 IL-21 DNA 序列(具有 NFAT 啟動子)

構築體	DNA 序列
NFAT-Te-IL12 DNA 序列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaa aaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattagg aggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaa ctgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgc atctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGG ACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGCACTCCATCTG GGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTACCCCGAC GCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGCCGGAGGAGGACG GCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTGCTGGGCTCTGGTAA GACCTTAACCATCCAGGTCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACG TGTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGCCTGCTGCTCCTGCACAA GAAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGGATATCCTTAAAGACCAGAAGGAG CCCAAGAACAAAACCTTCCTGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGGC GCTTTACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTTCTCC GTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTCTGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGC CGCTACCCTGTCGGCTGAGCGCGTCCGTGGTGACAACAAGGAGTACGAG TACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGAGT CCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGA GAACTACACCTCCTCCTTCTTTATACGCGACATCATCAAGCCTGACCCCC CTAAAAACCTGCAGCTGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGT ATCCTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCC TGACCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAGAAGGA CCGCGTGTTCACCGACAAAACCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAAC GCGAGCATCTCCGTACGGGCACAGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTC AGAGTGGGCTTCGGTTCCGTGTTCTGGAGGAGGTGGCGGCGGCTCACGC AACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACCCGGGTATGTTTCCTTGTCTGCACCA CTCTCAGAACTTGCTCCGTGCCGTCTCGAATATGCTGCAGAAGGCCCGCC AGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAGTGAGGAGATCGATCATGAGGA CATCACCAAGGACAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTCTGCCGCTGGAG TTGACAAAGAACGAGAGCTGCCTCAATAGCCGCGAGACTTCCTTCATCA CCAACGGCTCCTGCCTCGCGAGCCGTAAGACCTCCTTTATGATGGCGCTG TGCCTGTCAAGTATCTACGAAGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAA AACTATGAACGCAAAACTCCTGATGGATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGG ACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTT CAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGAGGAACCCGACTTTT ACAAGACAAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTACACGCGTTCCGCATTCG GGCCGTGACCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTCGTCCGGCG GGGGGGGCTCCGGTGGGGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGG CGGCTCCGGCGGAGGTTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTC TGATTTCCGTCAACGGAATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTTG CTCCCAGATGTAGAGAGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAGAG CGTGAGGCCTGTGTGA (SEQ ID NO:299)
NFAT-Te-IL15 DNA 序列	Tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggagga aaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattag gaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaa actgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattg catctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGACTG GACTTGGATACTCTTTCTGGTCGCTGCCGCCACACGGGTGCACTCTAATT

	GGGTCAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAG CATGCACATCGACGCCACACTGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCT GCAAAGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAG CCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGATACCGTGGAAAATCTGATC ATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCG GCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAAAAGAACATCAAAGAGTTTCT GCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTCATCAACACCTCATCAGGTG GCGGTGGAAGCGGAGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGCG GAGGTTCCGGCGGAGGATCTCTTCAGCTCCTGCCATCTTGGGCTATCACC CTGATTAGTGTGAATGGGATCTTTGTCATCTGTTGTCTCACGTACTGTTTC GCTCCCCGGTGCAGAGAGAGAAGGCGCAACGAAAGACTGCGGAGAGAA AGCGTCAGACCCGTGTGA(SEQ ID NO:300)
NFAT-TeIL21 DNA序列	Tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggagga aaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattag gaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaa actgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattg catctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTG GACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCATAGCCAGG GCCAAGACCGGCACATGATCCGGATGAGACAGCTGATCGACATCGTGGA CCAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCTGAGTTCCTGCCTGCTC CTGAGGACGTGGAAACAAATTGCGAGTGGTCCGCCTTCAGCTGCTTCCA GAAGGCCCAGCTGAAAAGCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCAT CAACGTGTCCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCTAGCACCAATGCC GGAAGAAGGCAGAAGCACAGACTGACCTGTCCTAGCTGCGACAGCTACG AGAAGAAGCCTCCAAAAGAGTTCCTGGAACGGTTCAAGAGCCTGCTGCA GAAGATGATCCACCAGCACCTGAGCAGCAGAACCCACGGCTCTGAAGAT TCTAGCGGAGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGTGGAT CAGGCGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGCGGAGGTGGAAGCG GTGGTGGTGGCTCTGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCTCTTCA ATTGCTGCCTAGCTGGGCCATCACACTGATCTCCGTGAACGGCATCTTCG TGATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTCGCCCCTAGATGCAGAGAGCGGAGA AGAAACGAGCGGCTGAGAAGAGAATCTGTGCGGCCTGTTTAA(SEQ ID NO:301)
NFAT-TeIL15-IL21 DNA序列	tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaa aaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattagg aggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaa ctgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgc atctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctggccaccATGGATTGG ACCTGGATTCTGTTCCTGGTGGCCGCTGCCACAAGAGTGCATAGCCAGGG CCAAGACCGGCACATGATCCGGATGAGACAGCTGATCGACATCGTGGAC CAGCTGAAGAACTACGTGAACGACCTGGTGCCTGAGTTCCTGCCTGCTCC TGAGGACGTGGAAACAAATTGCGAGTGGTCCGCCTTCAGCTGCTTCCAG AAGGCCCAGCTGAAAAGCGCCAACACCGGCAACAACGAGCGGATCATC AACGTGTCCATCAAGAAGCTGAAGCGGAAGCCTCCTAGCACCAATGCCG GAAGAAGGCAGAAGCACAGACTGACCTGTCCTAGCTGCGACAGCTACGA GAAGAAGCCTCCAAAAGAGTTCCTGGAACGGTTCAAGAGCCTGCTGCAG AAGATGATCCACCAGCACCTGAGCAGCAGAACCCACGGCTCTGAAGATT CTAGCGGAGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGTGGATC AGGCGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGCAGTGGCGGAGGTGGAAGCGG TGGTGGTGGCTCTGGCGGAGGCGGTAGCGGCGGAGGCGGATCTCTTCAA TTGCTGCCTAGCTGGGCCATCACACTGATCTCCGTGAACGGCATCTTCGT GATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTCGCCCCTAGATGCAGAGAGCGGAGA

	AGAAACGAGCGGCTGAGAAGAGAATCTGTGCGGCCTGTTAGAGCCAAGA GATCTGGAAGCGGCGCCACCAACTTTAGCCTGCTGAAACAGGCTGGCGA CGTGGAAGAGAACCCTGGACCTATGGACTGGACTTGGATACTCTTTCTGG TCGCTGCCGCCACACGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACGTGATCAGCGAC CTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACAC TGTACACCGAGTCCGATGTGCACCCTAGCTGCAAAGTGACCGCCATGAA GTGCTTTCTGCTGGAACTGCAAGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCC AGCATCCACGATACCGTGGAAAATCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCC TGTCCAGCAACGGCAATGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGA ACTGGAAGAAAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTCCACATC GTGCAGATGTTCATCAACACCTCATCAGGTGGCGGTGGAAGCGGAGGTG GCGGTAGTGGCGGCGGAGGCTCAGGCGGCGGAGGTTCCGGCGGAGGATC TCTTCAGCTCCTGCCATCTTGGGCTATCACCCTGATTAGTGTGAATGGGA TCTTTGTCATCTGTTGTCTCACGTACTGTTTCGCTCCCCGGTGCAGAGAGA GAAGGCGCAACGAAAGACTGCGGAGAGAAAGCGTCAGACCCGTGTAA(S EQ ID NO:302)

流動式細胞測量術

【2971】為了檢驗經轉導之細胞中之mIL-15表現，使用生物素-結合物IL-15 (biolgend, San Diego, CA)加鏈黴抗生物素蛋白-BV421 (Biolegend, San Diego, CA)將經轉導之細胞染色。為了檢驗mIL-21表現，使用PE結合之IL-21抗體將經轉導之細胞染色。為了檢驗T細胞分裂，使用CellTrace™紫細胞增殖染料(ThermoFisher scientific, Waltham, MA)預先標記T細胞。在5天之後，在存在或不存在IL-2 (20 IU/mL)之情況下，在離體培養物中分析T細胞分裂。為了檢驗T細胞活化及分化，使用來自碧迪生物科學、Biolegend、賽默飛世爾之抗體進行表現型表徵。用BioRad ZE5流式細胞儀獲取資料且用FlowJo軟體(FlowJo, LLC, Ashland, OR)進行分析。

T細胞計數及存活率

【2972】在TIL擴增之後收集REP細胞。使用

Cellometer K2細胞計數器(Nexcelom, Lawrence, MA)藉由AOPI分析法評估活細胞數目。

預REP及REP過程

【2973】將人類腫瘤樣品解剖成約3 mm片狀物且與推薦的含有IL-2 (6000 IU/mL)之培養基一起在Grex10中培養。在培養11天之後，收集預REP細胞以用於2天活化及2天慢病毒轉導。接著，在REP擴增過程中用經照射之PBMC、抗CD3抗體及3,000 IU/mL IL-2將經轉導之預REP細胞再繁殖11天。

結果

基因轉導之後的mIL-15/mIL-21之表現

【2974】在基因轉導之後，用300 IU/mL IL-2將經轉導之預REP細胞再離體擴增5天。藉由流動式細胞測量術染色，評估經轉導之預REP細胞之mIL-15及mIL-21之表現。使用未經轉導之細胞作為陰性對照。

mIL-15預REP細胞呈現pSTAT5信號傳導之持續活化且展示增加之增殖

【2975】在驗證表面細胞介素表現之後，檢驗T細胞功能性。特定言之，在血清饑餓條件下評估經修飾之TIL之STAT5之磷酸化，以測定經修飾之TIL是否表現功能性mIL-15及/或IL-21。此外，藉由CellTrace增殖分析法檢驗

經mIL-15慢病毒轉導之TIL之細胞增殖。

REP過程之後的mIL-15/mIL-21之表現

【2976】在慢病毒轉導之後，在REP過程中將TIL擴增11天且接著藉由流動式細胞測量術評估膜結合之細胞介素受體之表面表現。針對CD8+ T細胞評估所收集之REP細胞。先前報導證實IL-15及IL-21充當優先刺激CD8 T細胞之增殖及存活之強效刺激劑。

表現mIL-15/mIL-21之REP TIL之表現型

【2977】為了表徵mIL-15及mIL-21對REP細胞之免疫調節作用，在圈選之CD8+CD3+ T細胞及CD4+CD3+ T細胞子集中用新鮮解凍之REP細胞進行表現型分析。將評估以下之表現：CD27、PD1、TIM3、CD62L、TOX、T-bet、CD38、CXCR3、Eomes及CD25。

實例13：經修飾之具有膜錨定之IL-2及IL-12免疫調節融合蛋白質之TIL之製備及表徵

【2978】將四個冷凍保存之TIL群體解凍且使用Cellaca MX計數器評估細胞數目及存活率。接著，將TIL再懸浮且使用SQZ方法(亦即，「擠壓」)將編碼膜錨定之IL-2及/或IL-12之mRNA (mbIL-2及mb-IL12)遞送至TIL之亞群中。例示性mbIL-2及mbIL-12構築體描繪於圖37中。將評估以下TIL亞群：1)無SQZ；2)無mRNA；3) mbIL-2

mRNA；4) mbIL-12 mRNA；及5) mbIL-2+mbIL-12 mRNA。在擠壓之後，使用Cellaca MX計數器再次評估細胞之存活率及數目。接著，將細胞再懸浮且在存在或不存在300 IU/mL IL-2之情況下，在CM2培養基中培養4天。每天收集細胞以測定細胞數目、存活率及表面標記物表現，包括(但不限於)：mbIL-2及mIL-12。在擠壓之後，亦將在存在或不存在300 IU/mL IL-2之情況下用TransAct刺激細胞。亦將評估細胞數目、存活率及標記物表現以及IFNg及TNFa含量。亦將在擠壓之後將一些TIL冷凍保存且在1週之後解凍，以在存在或不存在IL-2之情況下培養1、2、3及4天之後分析mbIL-2及mbIL-12之表現。此將允許評估與新鮮細胞相比，經擠壓及冷凍保存之細胞是否保持相同的膜結合之細胞介素表現量。

【2979】在活體外細胞毒性分析中使用KILR THP-1細胞評估用mbIL-2及mbIL-12進行擠壓之細胞之功能作用。在存在或不存在300 IU/mL IL-2之情況下，將經擠壓之TIL與KILR THP-1細胞以10:1比率共同培養。在24小時之後，藉由向培養盤中添加受質來評估細胞毒性。在單獨的實驗集合中，在存在或不存在300 IU/mL IL-2之情況下，將經擠壓及對照性TIL與KILR THP-1細胞共同培養3天。在此培育期之後，評估TIL數目、存活率及表現型。

【2980】在此初始活體外實驗集合之後，在NSG及hIL-2 NOG小鼠中用對照性以及經mbIL-2及mbIL-12擠壓之TIL運行PDX模型。對於此等實驗，將使用經冷凍保存之

黑色素瘤TIL及配對的PDX腫瘤細胞。簡言之，在NSG及hIL-2 NOG小鼠中接種PDX腫瘤細胞。在建立腫瘤之後，用對照性及經擠壓之TIL(對應於PDX模型)以10E6個細胞/小鼠經由尾部靜脈注射來接種攜帶腫瘤之小鼠。每兩週一次量測腫瘤及小鼠體重。

【2981】在如上文所描述完成初始概念驗證(POC)實驗之後，使用以上實例7中所描述之Gen 2過程進行兩次工程改造操作，且接著進行細胞擠壓過程(如上文所描述)以用mbIL-2 mRNA及/或mbIL-12 mRNA轉染所得TIL群體。在擠壓之前及之後針對細胞計數及存活率來評估TIL，且在存在或不存在IL-2之情況下，在擠壓之後評估標記物表現且評估4天。

實例14：經修飾之具有膜錨定之IL-18免疫調節融合蛋白質之TIL之製備及表徵

【2982】IL-18為可藉由增強IFN-g(最初稱為IFNγ誘導因子)之產生來促進1型免疫反應的促炎細胞介素。已研究IL-18對於癌症治療之免疫刺激作用。重組人類IL-18(rhIL-18)之投與展示非常好的安全性概況，癌症患者可耐受高達2,000 μg/kg之劑量，通常具有輕度至中度毒性(《臨床癌症研究》2008)。

【2983】IL-18結合蛋白(IL-18BP)為一種分泌型蛋白，其可中和IL-18且抑制IL-18之生物學功能。發現IL-18BP在多種人類腫瘤之腫瘤微環境中經常上調。最近開發

一種抗誘餌IL-18 (DR-IL18)，其展現對IL-18BP抑制之抗性，同時經由與IL-18R複合物結合而保持信號傳導潛力(《自然》，2020)。此外，表現人類IL-18之CAR-T細胞已證實在異種移植模型中展現出強大的增強增殖及抗腫瘤活性。一項針對huCART19-IL18治療NHL/CLL患者之臨床研究正在進行中(《細胞報導(Cell Report)》，2017；NCT04684563)。

【2984】因此，不受任何特定操作理論之束縛，據信如所描述且藉由本文中提供之方法製備之包括膜錨定之IL-18免疫調節融合蛋白質之TIL(即經拴繫之IL-18 TIL)可用於癌症之治療。

【2985】為表徵此類經拴繫之IL-18 TIL之特性，藉由慢病毒基因轉導表現此等融合蛋白質之構築體結合本文中所描述之11天REP過程來製備表現膜錨定之IL18 (TeIL-18)及DR-IL18 (TeDRIL-18)之TIL。對於此項研究，使用源自7種不同腫瘤之TIL：頭頸(3)、肺(2)、乳房(1)及黑色素瘤(1)。與對照相比，此等經修飾之TIL在TIL擴增及細胞存活率方面未展現顯著變化。參見圖42。如圖43A及圖43B所示，經由該過程產生之表現TeIL-18及TeDRIL-18之TIL展現出高表現量之TeIL-18及TeDRIL-18。此外，高表現量在REP後得以維持。

【2986】為表徵在經修飾之TIL上表現之TeIL-18及TeDRIL-18之功能，對三種不同REP TIL產物進行工程改造以使用本文中所提供之REP方法表現TeIL-18或TeDRIL-18。使用抗CD3抗體OKT3在有及沒有TCR刺激之情況下評

估所得經修飾之TIL的IFN-γ產生。如圖44所示，TeIL-18 REP TIL在沒有OKT3刺激之情況下產生少量之IFN-γ，且在TCR刺激後增加IFN-γ。

【2987】為允許更多地控制IL-18之表現，TIL經修飾以在誘導型NFAT啟動子之控制下表現TeIL-18及TeDRIL-18。如圖46所示，TeIL-18 REP TIL在T細胞刺激後展現出顯著量之IL-18產生。此外，與對照相比，TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL在T細胞刺激後均展現出不同程度之IFN-γ產生增加。

【2988】使用KILR-THP-I細胞毒性分析進一步評估TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL之功能，及表現型。此等實驗係使用新鮮解凍且重複刺激之TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL進行。對於重複刺激之實驗，TIL用TransACT (1:100)活化3輪(第0天、第3天及第6天)，且在第8天收集用於測試。TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL (圖46A至圖46C)展示改良之細胞毒性及增加之IFN-γ產生(圖47A及圖47B，以及圖48G及圖48H)。與新鮮解凍之TIL相比，重複刺激之TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL展現更大之細胞毒性(參見圖46C)，或許係由於中央記憶T細胞群體之增加。在此等TIL群體中活化之表現型評估展示，對於TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL，CD4+及CD8+子集中活化標記物(例如CD25、TIM3、CD38)之表現較高。參見圖48E及圖48F。TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL亦展現較少之分化，T細胞幹性生物標記物(例如IL-7R、CD62L及CD28)之表現較高，且中央

記憶T細胞(Tcm)之頻率較高。參見圖48A至圖48D。

【2989】進一步評估TeIL-18及TeDRIL-18 REP TIL以確定對THP-I MHC-I及MHC-II表現之任何影響。將TIL及THP-I細胞(10:1)共培養，且評估THP-I細胞之抗原呈現基因表現。如圖49A及圖49B所示，MHC-I及MHC-II在共培養系統中之THP-I細胞中上調。

實例15：在NFAT啟動子之控制下表現經拴繫之IL-12且減少PD-1表現之經修飾TIL之製備及表徵

【2990】對於此項研究，將製備具有膜錨定之IL-12免疫調節融合蛋白質及一或多種用於降低內源性PD-1表現之shRNA之經修飾TIL。圖50描繪允許表現膜錨定之IL-12(TeIL-12)及PD-1 shRNA之例示性核酸構築體。如圖50所示，膜錨定之免疫調節IL-12之表現係使用NFAT啟動子控制，該啟動子包括與最小人類IL-2啟動子連接之NFAT反應元件，參見例如表60。shRNA在PolIII啟動子(U6)之控制下。

病毒製備及T細胞轉導

【2991】為了製備慢病毒，將含有經栓繫之細胞介素基因序列(表60)及PD-1 shRNA (表61)之pLenti-載體及封裝輔助載體(BaEV-TR，Gag/Pol)共同轉染至293T細胞中。自第2-3天培養物上清液收集慢病毒上清液，接著進行超離心(120,000 g)以濃縮慢病毒以用於TIL轉導。將1E5個預REP細

胞與經濃縮之慢病毒一起添加至預塗有Retronectin之48孔盤中。在基因轉導之後兩天，收集預REP細胞以用於根據本文中所描述之REP過程或其他表現型表徵及功能分析法。

表 60- TeIL-12/shRNA 構築體之序列

構築體	DNA 序列
6XNFAT 結合模體	GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACT GTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGA AGGCGTCAATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACA GAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAAT TAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGA (SEQ ID NO:390)
IL-2min 啟動子	CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGC ATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGT AACCTCAACTCCTG ((SEQ ID NO:391)
TeIL-12	ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGC ACTCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGACGTGTACGTGGTGGAATTGGATT GGTACCCCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGC CGGAGGAGGACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTG CTGGGCTCTGGTAAGACCTTAACCATCCAGGTCAAGGAGTTCGGTGAT GCAGGACAGTACACGTGTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGC CTGCTGCTCCTGCACAAGAAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGGATATC CTTAAAGACCAGAAGGAGCCCAAGAACAAAACCTTCCTGCGATGCGAG GCTAAGAATTACTCCGGGCGCTTTACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCT CGACCGACCTGACCTTCTCCGTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTCTGATCC GCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACCCTGTCGGCTGAGCGCGTCCG TGGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACA GCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGAGTCCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGG ACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCCTTCTTTAT ACGCGACATCATCAAGCCTGACCCCCCTAAAAACCTGCAGCTGAAGCC CCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTATCCTGGGAGTACCCCGACAC CTGGTCTACTCCTCATTCGTATTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGTGC AGGGCAAGTCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAA ACCAGCGCGACTGTCATTTGTCGGAAGAACGCGAGCATCTCCGTACGG GCACAGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTTC CGTGTTCTGGAGGAGGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGA CGCCGGACCCGGGTATGTTTCCTTGTCTGCACCACTCTCAGAACTTGCT CCGTGCCGTCTCGAATATGCTGCAGAAGGCCCGCCAGACTCTGGAGTT CTATCCATGCACTAGTGAGGAGATCGATCATGAGGACATCACCAAGGA CAAGACATCCACCGTGGAGGCTTGTCTGCCGCTGGAGTTGACAAAGAA CGAGAGCTGCCTCAATAGCCGCGAGACTTCCTTCATCACCAACGGCTCC TGCCTCGCGAGCCGTAAGACCTCCTTTATGATGGCGCTGTGCCTGTCAA GTATCTACGAAGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGA ACGCAAAACTCCTGATGGATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGGACCAGA ACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACTC CGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGAGGAACCCGACTTTTACAA GACAAAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTACACGCGTTCCGCATTCGGGC CGTGACCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTCGTCCGGCGGG

	GGGGGCTCCGGTGGGGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGC GGCTCCGGCGGAGGTTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTC TGATTTCCGTCAACGGAATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTT GCTCCCAGATGTAGAGAGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAG AGCGTGAGGCCTGTGTGA (SEQ ID NO:392)
IRES	CCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAA TAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTC TTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGC ATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGA ATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAA CGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACA GGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGG CGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAG TCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCC AGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACAT GCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAA CCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGATAA (SEQ ID NO:393)
U6 啟動子	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGG CTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATT AGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGC AGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACT TGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAA ACACC (SEQ ID NO:394)

表 61 – PD-1 shRNA 序列

構築體	DNA 序列
PD-1 shRNA #1	GGATTTCCAGTGGCGAGAGAACTCGAGTTCTCTCGCCACTGGAAATCC (SEQ ID NO:395)
PD-1 shRNA #2	CATTGTCTTTCCTAGCGGAATCTCGAGATTCCGCTAGGAAAGACAATG (SEQ ID NO:396)
PD-1 shRNA #3	CAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCTCGAGCTCTCTTTGATCTGCGCCTTG (SEQ ID NO:397)
PD-1 shRNA #4	AAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTCGAGGCTCTCTTTGATCTGCGCCTT (SEQ ID NO:398)
PD-1 shRNA #5	ATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTCGAGTTTAGCACGAAGCTCTCCGAT (SEQ ID NO:399)
PD-1 shRNA #6	AGTATGCCACCATTGTCTTTCCTCGAGGAAAGACAATGGTGGCATACT (SEQ ID NO:400)
PD-1 shRNA #7	GGATTTCCAGTGGCGAGAGAACTCGAGTTCTCTCGCCACTGGAAATCC (SEQ ID NO:401)

流動式細胞測量術

【2992】使用免疫螢光染色及流動式細胞測量術分析評估 TIL TeIL-12及PD-1表現。

T細胞計數及存活率

【2993】在TIL擴增之後收集REP細胞。使用Cellometer K2細胞計數器(Nexcelom, Lawrence, MA)藉由AOPI分析法評估活細胞數目。

預REP及REP過程

【2994】將人類腫瘤樣品解剖成約3 mm片狀物且與推薦的含有IL-2 (6000 IU/mL)之培養基一起在Grex10中培養。在培養11天之後，收集預REP細胞以用於2天活化及2天慢病毒轉導。接著，在REP擴增過程中用經照射之PBMC、抗CD3抗體及3,000 IU/mL IL-2將經轉導之預REP細胞再繁殖11天。

實例16：在NFAT啟動子之控制下表現經拴繫之IL-12之經修飾TIL之製備及表徵

【2995】圖51展示例示性TIL擴增過程，其包括編碼TeIL-12之慢病毒載體之轉導，該TeIL-12由EF-1α啟動子或NFAT啟動子控制，該啟動子包括與最小人類IL-2啟動子連接之NFAT反應元件。

【2996】在包括6000 IU/mL IL-2之細胞培養基中預REP 11天后，在10 ng/mL IL-7及20 ng/mL IL-15之存在下以1:100之比率用TransACT刺激TIL 2天。

【2997】在塗有RetroNectin®之盤中，在CM2 + IL-7及IL-15中使用慢病毒+以1:100 Lentiboost-P進行旋轉轉

導。轉導後，接著將TIL靜置2天，隨後使用25K TIL、CM2中之5E6個飼養細胞+ 3000 IU/mL之IL-2 + 30 ng/mL之OKT3 (總體積4 mL)在GREX-24中進行REP過程。培育5天后，向每個孔中添加額外4 mL CM2 + 3000 IU/mL IL-2。培育持續總共11天，接著收集TIL。

【2998】在REP收集後，使用IL-12P70流動抗體藉由流動式細胞測量術檢驗TIL上IL-12之表面表現(圖52A)。TIL亦用TransACT或PMA刺激。刺激後48小時，藉由流動式細胞測量術檢驗IL-12之表面表現(圖52B)。

【2999】亦分析表現TeIL-12之TIL之IL-12活性(圖53)。5E4個HEK-IL18報導細胞經接種於96孔盤中之DMEM + 10% FBS培養基中。附著後，經轉導之TIL以5:1、1:1及0.5:1之比率分別以2.5E5、5E4及2.5E4個細胞/孔接種。設置Transwell。在培育隔夜後，收集20 µl培養物上清液且轉移至另一96孔盤。向每個孔中添加180 µL Quantiblue試劑且於37℃下培育，直至最高之IL-12標準品變成深紫色。

【3000】本研究使用五個腫瘤樣品(2個肺、1個頭頸、1個乳房及1個卵巢)生成TIL。圖54展示REP後TIL之擴增倍數(A)及存活率(B)。圖55展示藉由數位PCR偵測到之TeIL-12之表現頻率(A)及每個細胞之病毒複本數(B)。

【3001】藉由KILR® THP-1分析法評估表現TeIL-12之TIL之細胞毒性。REP後TIL (1E5)及KILR-THP-1細胞(1E4)在96孔盤中以10:1之比率共培養。培育24小時後，收

集上清液用於細胞毒性分析。使用KILR偵測試劑來偵測THP-1目標細胞死亡(圖56A及圖56B)。藉由ELISA檢驗培養上清液中之IFN-γ產生(圖56C及圖56D)及IL-12脫落(圖56E)。TeIL-12及NFAT驅動之誘導型TeIL-12 TIL在基於THP-1之同種異體細胞毒性分析中均展示改良之殺傷活性。在共培養分析法中偵測到IFN-γ增加> 30倍。TeIL-12脫落發生在TeIL-12 TIL及KILR® THP-1細胞之共培養期間。

【3002】亦藉由xCelligence RTCA分析法評估表現TeIL-12之TIL之細胞毒性。將10,000個目標細胞#1接種於RTCA E盤中。培育隔夜後，以10:1或3:1之比率添加REP後TIL。藉由xCELLigence RTCA儀器動態監測細胞生長(圖57A)。用目標細胞#2進行相同分析法(圖57B)。TeIL-12及NFAT TeIL-12 TIL展示優異之同種異體細胞毒性。

【3003】為測試連續殺傷能力，用TransACT (1:100)重複刺激REP後TIL，且在最後TransACT刺激後2天收集(圖58A)。進行KILR® THP-1細胞毒性分析、IFN-γ定量(圖58B)及xCELLigence RTCA殺傷分析(圖58C)以評估TIL殺傷功效。

【3004】藉由流動式細胞測量術分析REP後TIL之CD8+、CD4+及CD4+FoxP3+T細胞子集(圖59)。在CD8+、CD4+及CD4+FoxP3+ T細胞子集之分佈上未觀測到差異。

【3005】藉由流動式細胞測量術偵測Tcm (CCR7+CCR45RA-)、Tem (CCR7-CD45RA-)、Tema (CCR7-CD45RA+)

子集及CD62L在REP後TIL上之表現(圖60)。在Tcm、Tem及Tema分佈中未觀測到統計學顯著差異。TeIL-12/NFAT-TeIL-12 REP後TIL展示較少分化，CD62L表現增加。

【3006】藉由流動式細胞測量術偵測T細胞耗減標記物PD-1、LAG-3、Tim-3及TIGIT在REP後TIL上之表現(圖61)。未觀測到PD-1及LAG-3表現之顯著變化。觀測到Tim-3及TIGIT之表現減少，在TIGIT中更明顯。

【3007】藉由流動式細胞測量術偵測T細胞活化標記物CD25、CD38、CD39及CD69在REP後TIL上之表現(圖62)。在TeIL-12 REP後TIL (CD8+T細胞)中觀測到活化標記物CD25表現增加，而在NFAT-TeIL-12 REP後TIL中觀測到CD25表現降低。未觀測到CD38表現之變化，而CD69表現降低。

【3008】藉由流動式細胞測量術偵測T細胞功能相關標記物IFN-γ、TNF-α、CD107a及顆粒酶B在REP後TIL上之表現(圖63)。在TeIL-12 REP後TIL中觀測到IFN-γ及顆粒酶B產生增加，且在CD8+ T細胞群體中更顯著。

實例17：REP期間抗CD3抗體時間選擇及劑量之優化以及對經拴繫之IL-15/IL-21之擴增及表面表現之影響

【3009】本研究藉由在REP起始後之不同天數添加抗CD3抗體來測試對TIL擴增及TeIL-15/TeIL21表面表現之影響。上述實例在抗CD3抗體添加時間選擇方面如本文中所描述進行修改；抗CD3抗體之添加時間如下文段落所示。

【3010】使用實施例7中描述之Gen 2過程製備預REP

TIL，接著使用以下方案在EF-1α啟動子之控制下用編碼TeIL-15或TeIL-15及TeIL-21之慢病毒載體進行基因轉導。

TIL之病毒轉導

【3011】藉由將1mL解凍之細胞懸浮液添加至9mL預熱之不含建它黴素之CM2中解凍TIL，且在室溫(RT)下以500xg離心4分鐘。

【3012】棄去上清液且將TIL懸浮於1mL不含建它黴素之CM2 + 300 IU/mL IL-2中並計數。

【3013】將TIL以1e6/mL懸浮於24孔盤中不含建它黴素之CM2 + 300 IU/mL IL-2中，每孔2mL。培育隔夜。

【3014】製備IL-15、IL-7之20x混合液，每孔添加100uL。

- 最終濃度：不含建它黴素之CM2中之IL-15 (10 ng/mL)、IL-7 (20 ng/mL)
- 實例：需要10個孔
  - 10個孔 x 100uL混合液 = 1mL
  - 添加IL-15至濃度為200ng/mL
  - 添加IL-7至濃度為400ng/mL
- 注意：在添加TransACT、IL-15及IL-7之前自每個孔中移除120uL，使最終體積為2mL

【3015】將100uL之20x細胞介素混合液添加至24孔盤內之每個TIL培養物中。接著，將20uL TransACT添加至每個孔中。用移液器輕輕混合每個孔以均勻分散TIL且與刺

激混合液混合。培育2天。

【3016】藉由每孔添加250uL來塗佈具有Retronectin(於PBS中1:100稀釋)之非組織培養48孔盤。用封口膜(parafilm)包裹盤且隨後在4℃下培育隔夜。

【3017】自retronectin盤移除塗佈溶液，且用250uL 2% BSA級分V替代。注意：立即添加2% BSA級分V，以免孔變乾。

【3018】在室溫下培育30分鐘進行封閉。

【3019】移除封閉溶液。添加計算體積之病毒上清液且用封口膜包裹。離心2000xg，90分鐘，32℃。注意：在添加盤之前加熱離心機。

【3020】在盤與病毒一起旋轉的同時，收集TIL並計數。TIL以1e6/mL懸浮於不含建它黴素之CM2中。

【3021】一旦盤完成旋轉，即添加以下各物：

1. 100 uL TIL懸浮液(1e5個細胞)

2. 200 uL不含建它黴素之CM2

3. 300 uL CM2 + IL-15 (20 ng/mL)+ IL-7 (40 ng/mL)+ Lentibooster 1:50

4. = 每孔總計600 uL

【3022】離心2000xg，20分鐘，32℃。置於培育箱中且培育3天。

【3023】在表現TeIL-15之慢病毒載體進行基因轉導後，使用飼養細胞、3000 IU/ml IL-2及抗CD3抗體OKT3或HIT3a處理預REP TIL以進行REP擴增。在開始REP過程後

之不同天數(第0天、第2天及第4天)，將OKT3 (30ng/ml)或HIT3a (30ng/ml)添加至REP培養基中。在REP擴增11天后，收集REP後TIL。使用以下方案分析TIL擴增及TeIL-15/TeIL-21之表面表現。在第2天或第4天添加OKT3或HIT3a導致TeIL-15之表面表現增加(圖64A及圖64B)。

經拴繫之細胞介素之表面表現檢查(用1E5稀釋2倍)

Maker 20 樣品

25ul/樣品 X10				487.5ul DPBS
活/死	1:200			2.5ul
FC 塊	1:50			10ul

8 分鐘，在室溫下

50 染色緩衝液

50ul 染色緩衝液 20 個樣品				860ul
CD3	BUV737	UCHT1	1.5ul	30ul
CD45	PerCP	HI30	1ul	20ul
IL-21	PE	4BG1	2.5ul	50ul
IL15	生物素	BH1543	2ul	40ul

AB 在 4C 下培育 45 分鐘，洗滌兩次

50ul 染色緩衝液 20 個樣品				992ul
抗生物素蛋白-BV421	1:200	0.25ul		5ul

AB 在 4C 下培育 20 分鐘，洗滌兩次

添加 200ul 染色緩衝液，用於流動式細胞測量術操作

【3024】在表現TeIL-15及TeIL-21之慢病毒載體進行基因轉導後，使用飼養細胞、3000 IU/ml IL-2及抗CD3抗體OKT3或HIT3a處理預REP TIL以進行REP擴增。在開始REP過程後之不同天數(第0天、第2天及第4天)，將OKT3(30 ng/ml)或HIT3a (30 ng/ml)添加至REP培養基中。在REP擴增11天后，收集REP後TIL。使用上述方案分析TIL擴增及TeIL-15/TeIL-21之表面表現。在第2天或第4天添加OKT3或HIT3a導致TeIL-15及TeIL-21之表面表現增加(圖65A及圖65B)。

【3025】在表現TeIL-15之慢病毒載體進行基因轉導後，使用飼養細胞、3000 IU/ml IL-2及抗CD3抗體OKT3處理預REP TIL以進行REP擴增。OKT3在第0天以不同濃度(30 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、3 ng/mL及1 ng/mL)添加至REP培養基中。在REP擴增11天后，收集REP後TIL。使用上述方案分析TIL擴增及TeIL-15/TeIL-21之表面表現。添加30 ng/mL之OKT3導致TeIL-15之最高表面表現(圖66A及圖66B)。

【3026】在表現TeIL-15及TeIL-21之慢病毒載體進行基因轉導後，使用飼養細胞、3000 IU/ml IL-2及抗CD3抗體OKT3處理預REP TIL以進行REP擴增。OKT3在第0天以不同濃度(30 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、3 ng/mL及1 ng/mL)添加至REP培養基中。在REP擴增11天后，收集REP後TIL。使用上述方案分析TIL擴增及TeIL-15/TeIL-21之表面表現。添加所有濃度之OKT3導致TeIL-15及TeIL-21

之低表面表現(圖67A及圖67B)。

* * *

【3027】提供上述實例以為此項技術中熟習此項技術者提供如何製得並使用本發明之組合物、系統及方法之實施例的完整揭示內容及描述，且並不意欲限制本發明人定義其發明之範疇。此項技術中熟習此項技術者顯而易見的進行本發明之上文所描述模式的修改意欲在以下申請專利範圍之範疇內。本說明書中提及之所有專利及公開案指示此項技術中熟習本發明所屬領域者之技能水準。

【3028】所有標題及章節名稱僅用於清晰及參考目的，且不應視為以任何方式具限制性。舉例而言，此項技術中熟習此項技術者應瞭解根據本文所描述之本發明之精神及範疇按需要組合來自不同標題及章節之各種態樣的有用性。

【3029】本文中引用之所有參考文獻以全文引用之方式且出於所有目的併入本文中，其引用程度如同各個別公開案或專利或專利申請案經特定且個別地指示出於所有目的以全文引用的方式併入本文中一般。

【3030】如本領域中熟習此項技術者將顯而易見，可在不脫離本申請案之精神及範疇的情況下對其進行多種修改及改變。本文所描述之特定實施例及實例僅作為實例提供，且本申請案僅受隨附申請專利範圍之各項以及申請專利範圍授權之等效物之全部範疇限制。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="116983-5109-
WO_Sequence Listing_Traditional Chinese.XML" softwareName="WIPO Sequence"
softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-07-20">
 <ApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>112103170</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2023-01-30</FilingDate>
 </ApplicationIdentification>
 <ApplicantFileReference>116983-5109-WO</ApplicantFileReference>
 <EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
  <ApplicationNumberText>63/304,498</ApplicationNumberText>
  <FilingDate>2022-01-28</FilingDate>
 </EarliestPriorityApplicationIdentification>
 <ApplicantName languageCode="zh">美商艾歐凡斯生物治療公司</ApplicantName>
 <ApplicantNameLatin>Iovance Biotherapeutics, Inc.</ApplicantNameLatin>
 <InventorName languageCode="zh">福格特  費德瑞克</InventorName>
 <InventorNameLatin>Frederick G. VOGT</InventorNameLatin>
 <InventionTitle languageCode="zh">細胞介素相關之腫瘤浸潤性淋巴球組合物及方法
</InventionTitle>
 <InventionTitle languageCode="en">Cytokine associated tumor infiltrating
lymphocytes compositions and methods</InventionTitle>
 <SequenceTotalQuantity>402</SequenceTotalQuantity>
 <SequenceData sequenceIDNumber="1">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>476</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..476</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q2">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SEQIDNOMUROMONABHEAVYCHAINQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHW
VKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT
VSSAKTTAPSVYPLAPVCGGTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS
QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q4">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFR
GSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRADTAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKD
INVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>134</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..134</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>132</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..132</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q8">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL
KPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT</INSDSeq_
sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="5">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>133</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..133</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q10">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>303</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..303</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q12">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGS
SSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQGSGGGSELCD
DDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERK
TTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICT
G</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>452</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..452</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q14">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSARRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPN
VNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGW
FLCTAMEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDESGSGGASSESSASSDGPHPVITESRASSESSASSDGPHPVITESREP
KSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_
sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q16">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SESSASSDGPHPVITP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q18">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MHKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTTEKETFCRAATVLRQFYSHHEK
DTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS</INSDSeq_se
quence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="10">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q20">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAAR
KLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTC
WNKILMGTKEH</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="11">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>115</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..115</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q22">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHD
TVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>132</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..132</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q24">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNN
ERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS</INSDSeq_
sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q26">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI
TFCQSIISTLT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>133</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..133</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</INSDSeq
_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="15">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>133</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..133</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q30">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEE
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>145</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..145</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q32">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGM
SVG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="17">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q34">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIWWDDKKDYNPSLKS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q36">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SMITNWYFDV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="19">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>141</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..141</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q38">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVG<
/INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="20">
   <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q40">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DIWWDDKKDYNPSLKS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q42">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SMITNWYFDV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="22">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>142</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..142</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q44">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGM
</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="23">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q46">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>WWDDK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q48">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SMITNWYFDV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="25">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>143</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..143</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q50">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQC
LEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGM
S</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="26">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q52">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IWWDDKK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q54">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>ARSMITNWYFDV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>253</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..253</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q56">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN
PKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT
IVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDP
ADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>533</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..533</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q58">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QMILNGINNYKNPKLTAMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR
DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKK
DYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq
_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="30">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q60">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>KAQLSVGYMH</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q62">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DTSKLAS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="32">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q64">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>FQGSGYPFT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q66">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QLSVGY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q70">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GSGYPF</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q72">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="37">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q74">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKAQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq
_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="38">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>583</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..583</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q76">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN
PKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETAT
IVEFLNRWITFCQSIISTLTSTSGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDP
ADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="39">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q78">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SEQIDNOLIGHTCHAIN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="40">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>255</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..255</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q80">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTC
DICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLD
GKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>256</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..256</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q82">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCN
ICRVCAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTFNDQNGTGVCRPWTNCSLD
GRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLQVLTLFLALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIF
KQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="42">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>441</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..441</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q84">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSP
SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC
PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLT
VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="43">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q86">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFS
GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY
PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="44">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>116</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..116</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q88">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSP
SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="45">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q90">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFS
GSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="46">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q92">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>STYWIS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="47">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q94">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>KIYPGDSYTNYSPSFQG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="48">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q96">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>RGYGIFDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="49">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q98">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SGDNIGDQYAH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="50">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q100">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QDKNRPS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="51">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q102">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ATYTGFGSLAV</INSDSeq_sequence>
```

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="52">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q104">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPS
LESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</INSDSeq_sequ
ence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="53">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>216</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..216</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q106">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFCGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSD
Seq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="54">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q108">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEK
GLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="55">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>110</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..110</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q110">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ
APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="56">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q112">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GYYWS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="57">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q114">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>EINHGGYVTYNPSLES</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="58">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q116">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DYGPGNYDWYFDL</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="59">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q118">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RASQSVSSYLA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="60">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q120">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DASNRAT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="61">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q122">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQRSDWPPALT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="62">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>230</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..230</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q124">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="63">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q126">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGPGSSKSCDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="64">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q128">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGSGSSKSCDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="65">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q130">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GGPGSSSSSSSKSCDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="66">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q132">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGSGSSSSSSSKSCDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="67">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>29</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..29</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q134">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGPGSSSSSSSSSKSCDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="68">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>29</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..29</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q136">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GGSGSSSSSSSSSKSCDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="69">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>24</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..24</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q138">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGPGSSGSGSSSDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="70">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q140">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGPGSSGSGSDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="71">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q142">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGPSSSGSDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="72">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>25</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..25</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q144">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGSSSSSSSSGSDKTHTCPPCPAPE</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="73">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q146">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>METDTLLLWVLLLWVPAGNGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="74">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q148">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SGSGSGSGSGS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="75">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q150">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SSSSSSGSGSGS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="76">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q152">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SSSSSSGSGSGSGSGS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="77">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>254</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..254</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q154">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASP
GSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY
VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA
RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="78">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>168</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..168</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q156">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE
LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL
TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="79">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q158">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVKQRPGQVLEWIGEINPGNGHTNYNE
KFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSFTTARGFAYWGQGTLVTVS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="80">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q160">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPATQSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRF
SGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQDGHSFPPTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="81">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>119</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..119</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q162">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVKQRPGQVLEWIGEINPGNGHTNYNE
KFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSFTTARGFAYWGQGTLVTVSA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="82">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q164">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPATQSVTPGDRVSLSCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRF
SGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQDGHSFPPTFGGGTKLEIKR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="83">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q166">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWRILFLVAAATGAHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMSWVRQAPGK
GLEWVADIKNDGSYTNYAPSLTNRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARELT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="84">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>109</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..109</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q168">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSSGNQKNYLWYQ
QKPGQPPKLLIYYASTRQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="85">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>277</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..277</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q170">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNT
VCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACK
PWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLG
LVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="86">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>272</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..272</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q172">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYVWVQQPTALLLLGLTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHP
CETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDCVPCPPGHFSPGNNQACKPW
TNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTPEGPAFAVLLGLGLG
LLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNSFRTPIQEEHTDAHFTLAKI</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="87">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q174">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPS
LKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
```

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="88">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q176">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="89">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>

```
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q178">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPS
LKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLVT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="90">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q180">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="91">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q182">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GSFSSGYWN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="92">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q184">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>YIGYISYNGITYH</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="93">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q186">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RYKYDYDGGHAMDY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="94">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q188">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QDISNYLN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="95">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q190">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>LLIYYTSKLHS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="96">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q192">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQGSALPW</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="97">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>444</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..444</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q194">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIDYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCV
ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV
LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequence
>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="98">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q196">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="99">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q198">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIDYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="100">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q200">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="101">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q202">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SYSMN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="102">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q204">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>YISSSSSTIDYADSVKG</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="103">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>33</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..33</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q206">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SEQIDNOHEAVYCHAINCDRFORDESGWYLFDY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="104">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q208">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>RASQGISSWLA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="105">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q210">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>AASSLQS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="106">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q212">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQYNSYPPT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="107">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>450</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..450</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q214">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDQSTADYYFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST
SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_se
quence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="108">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>213</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..213</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q216">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="109">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>35</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..35</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q218">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SEQIDNOHEAVYCHAINVARIABLEREGIONFORD</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="110">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>106</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..106</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q220">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="111">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q222">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>DYAMH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="112">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q224">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GISWNSGSIGYADSVKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="113">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q226">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DQSTADYYFYYGMDV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="114">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q228">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASQSVSSYLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="115">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q230">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DASNRAT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="116">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q232">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>QQRSNWPT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="117">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q234">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYEFPSHDMSWVRQAPGKGLELVAAINSDGGSTYYPD
TMERRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYDDYYAWFAYWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="118">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q236">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGV
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRELPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="119">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q238">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SHDMS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="120">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q240">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AINSDGGSTYYPDTMER</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="121">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q242">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>HYDDYYAWFAY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="122">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q244">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>RASKSVSTSGYSYMH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="123">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q246">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>LASNLES</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="124">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q248">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QHSRELPLT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="125">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q250">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHWVRQAPGQGLKWMGWINTETGEPTYAD
DFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCANPYYDYVSYYAMDYWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="126">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q252">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYLYTGVPSRF
SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYSTPRTFGQGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="127">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q254">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DYSMH</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="128">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q256">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>WINTETGEPTYADDFKG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="129">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q258">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>PYYDYVSYYAMDY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="130">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q260">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KASQDVSTAVA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="131">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q262">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SASYLYT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="132">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q264">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQHYSTPRT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="133">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>183</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..183</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q266">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSI
KVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVAS
LTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="134">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>131</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..131</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q268">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>SHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVN
ISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL</INSDSeq_s
equence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="135">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>128</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..128</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q270">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISL
HYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL</INSDSeq_sequ
ence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="136">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q272">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYTMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRYSQVHYALDYWGQGTLVTVS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="137">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q274">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKAGQSPQLLIYLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNHPTTFGQGTK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="138">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q276">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYTMNWVRQAPGKGLEWVSSISGGSTYYADSR
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNNLRAEDTAVYYCARDRYFRQQNAFDYWGQGTLVTVSSA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="139">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q278">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPDSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKAGQSPQLLIYLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYYNHPTTFGQGTK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="140">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q280">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRYITLPNALDYWGQGTLVTVS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="141">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q282">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPVSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQYKSNPPTFGQGTK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="142">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q284">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIGTGGGTYYADS
VMGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDNVMGLYWFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="143">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q286">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGGGTKVEIKR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="144">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>31</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..31</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q288">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SEQIDNOHEAVYCHAINVARIABLEREGION</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="145">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q290">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIKR</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="146">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q292">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFKDYTMHWVKQSHGKSLEWIGGIYPNNGGSTYNQ
NFKDKATLTVDKSSSTAYMEFRSLTSEDSAVYYCARMGYHGPHLDFDVWGAGTTVTVSP</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="147">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q294">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSITCKASQDVGAAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRF
TGGGSGTDFTLTISNVQSEDLTDYFCQQYINYPLTFGGGTKLEIKR</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="148">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q296">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCANPYYDYVSYYAMDYWGHGTSVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="149">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>122</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..122</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q298">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDYSMHWVRQAPGQGLKWMGWINTETGEPTYAD
DFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCANPYYDYVSYYAMDYWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="150">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q300">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSVRDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYLYTGVPDRF
TGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="151">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q302">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSHKFMSTSVRDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYLYTGVPDRF
TGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="152">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q304">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGESLKLSCESNEYEFPSHDMSWVRKTPEKRLELVAAINSDGGSTYYPD
TMERRFIISRDNTKKTLYLQMSSLRSEDTALYYCARHYDDYYAWFAYWGQGTLVTVSA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="153">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q306">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEYEFPSHDMSWVRQAPGKGLELVAAINSDGGSTYYPD
TMERRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYDDYYAWFAYWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="154">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q308">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV
PARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="155">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q310">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGV
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRELPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="156">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>138</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..138</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q312">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYLGLNYVFIVFLLNGVQSEVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEK
GLEWVAEIRSKANNHATYYAESVNGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTWGEVFYFDYWGQGTTLTVSS</IN
SDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="157">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>126</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..126</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q314">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MRPSIQFLGLLLFWLHGAQCDIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKSSQDINKYIAWYQHKPGK
GPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYCLQYDNLLTFGAGTKLELK</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="158">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>440</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..440</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q316">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="159">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>26</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..26</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q318">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>SEQIDNONIVOLUMABLIGHTCHAIN</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="160">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q320">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="161">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q322">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="162">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q324">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>NSGMH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="163">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q326">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>VIWYDGSKRYYADSVKG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="164">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>4</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..4</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q328">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>NDDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="165">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q330">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASQSVSSYLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="166">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q332">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DASNRAT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="167">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q334">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
```

```
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>QQSSNWPRT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="168">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>447</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..447</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q336">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNE
KFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</INSDSeq_seque
nce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="169">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>218</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..218</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q338">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGV
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</IN
SDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="170">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q340">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNE
KFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="171">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q342">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGV
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="172">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>111</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..111</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q344">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESGV
PARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="173">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q346">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GINPSNGGTNFNEKFK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="174">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q348">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RDYRFDMGFDY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="175">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q350">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASKGVSTSGYSYLH</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="176">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q352">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>LASYLES</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="177">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q354">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QHSRDLPLT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="178">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q356">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="179">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>265</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..265</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q358">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANEIVLTQSPGTLS
LSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY
GSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="180">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>121</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..121</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q360">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="181">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q362">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="182">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q364">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>RYWMS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="183">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q366">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>NIKQDGSEKYYVDSVKG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="184">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q368">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>EGGWFGELAFDY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="185">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q370">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASQRVSSSYLA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="186">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q372">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DASSRAT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="187">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q374">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQYGSLPWT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="188">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>450</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..450</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q376">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYAD
TVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_se
quence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="189">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>216</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..216</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q380">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD
FYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</INSD
Seq_sequence>
   </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="190">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q382">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYAD
TVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="191">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>110</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..110</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q384">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRPSGVSN
RFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="192">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q386">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SYIMM</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="193">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q388">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SIYPSGGITFYADTVKG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="194">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q390">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>IKLGTVTTVDY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="195">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q392">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TGTSSDVGGYNYVS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="196">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q394">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DVSNRPS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="197">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q396">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SSYTSSSTRV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="198">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q398">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="199">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q400">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="200">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q402">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYAD
SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="201">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q404">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR</INSDSeq_sequence>
```

```
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="202">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q406">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GFTFSDSWIH</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="203">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q408">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>AWISPYGGSTYYADSVKG</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="204">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q410">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RHWPGGFDY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="205">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q412">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASQDVSTAVA</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="206">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q414">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>SASFLYS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="207">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q416">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQYLYHPAT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="208">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>225</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..225</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q418">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTH</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="209">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>215</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..215</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q420">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDS
eq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="210">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q422">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="211">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q424">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="212">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q426">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GFTFSSYT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="213">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q428">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>TFISYDGNNK</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="214">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q430">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARTGWLGPFDY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="215">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q432">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QSVGSSY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="216">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="217">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q436">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
```

```
    <INSDSeq_sequence>QQYGSSPWT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="218">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>451</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..451</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q438">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS
TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKT
VERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_s
equence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="219">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q440">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="220">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>167</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..167</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q442">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="221">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>139</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..139</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q444">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>PSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV</I
NSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="222">
```

```
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q446">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GFTFSSYGMH</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="223">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>15</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..15</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q448">
```

```
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>VIWYDGSNKYYADSV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="224">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q450">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DPRGATLYYYYYGMDV</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="225">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q452">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RASQSINSYLD</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="226">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q454">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>AASSLQS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="227">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q456">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QQYYSTPFT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="228">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>448</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
```

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..448</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q458">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="229">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>214</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..214</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q460">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRF
SGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="230">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>118</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..118</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q462">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="231">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q464">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRF
SGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="232">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q466">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>GFTFSSYS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="233">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q468">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ISSSSSYI</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="234">
 <INSDSeq>
```

```
  <INSDSeq_length>11</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..11</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q470">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>ARVGLMGPFDI</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="235">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q472">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>QSVSRY</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="236">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length/>
  <INSDSeq_moltype/>
  <INSDSeq_division/>
  <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="237">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q476">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>QQYGSSPWT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="238">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q478">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="239">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>46</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..46</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q480">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="240">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length/>
   <INSDSeq_moltype/>
   <INSDSeq_division/>
   <INSDSeq_sequence>000</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="241">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q484">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGGSN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="242">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q486">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGGSN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="243">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q488">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GGGGSN</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="244">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q490">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGGGGSN</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="245">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q492">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGGGGGSN</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="246">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
```

```
      <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q494">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="247">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q496">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

```
  <INSDSeq_sequence>GDVEXINPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="248">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q498">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="249">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q500">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="250">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q502">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
<SequenceData sequenceIDNumber="251">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q504">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="252">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>18</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..18</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q506">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="253">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>27</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..27</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q508">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
   <INSDSeq_sequence>NIKGSPWKGSLLLLLVSNLLLCQSVAP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="254">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
```

```
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q510">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
     </INSDQualifier>
    </INSDFeature_quals>
   </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>MYRMQLLSCIALSLALVTNS</INSDSeq_sequence>
 </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="255">
 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>396</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
   <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..396</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
     <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
     </INSDQualifier>
     <INSDQualifier id="q512">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>TCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGA
AGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCA
ATTGGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAG
GCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTGGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATATTTT
TCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAAGAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTC
AACTCCTGGCCACC</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="256">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q514">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="257">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q516">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CATTTTGACACCCCCATAATATTTTTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAA
GAGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="258">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>114</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..114</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q518">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="259">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>297</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..297</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q520">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK
CIREPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</INS
DSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="260">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>65</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..65</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q522">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK
CIR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="261">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>135</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..135</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q524">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MVLGTIDLCSCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMK
CFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</INSDS
eq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="262">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>162</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..162</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q526">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIED
LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEK

NIKEFLQSFVHIVQMFINTS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="263">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>114</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..114</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q528">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="264">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>92</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..92</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q530">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK
CIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVSEQIDNO</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="265">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>182</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..182</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q532">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLK
CIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAATTAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSH
```

GTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTST</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="266">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>267</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..267</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q534">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSG
FKRKAGTSSLTECVLNKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRPAPPSTVTTAGVTPQPESLSPSGKEPAASSPSSNNTAAT
TAAIVPGSQLMPSKSPSTGTTEISSHESSHGTPSQTTAKNWELTASASHQPPGVYPQGHSDTTVAISTSTVLLCGLSAVS
LLACYLKSRQTPPLASVEMEAMEALPVTWGTSSRDEDLENCSHHL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="267">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>197</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```
      <INSDFeature_location>1..197</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q536">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEA
CLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVID
ELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="268">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>306</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..306</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q538">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGD
AGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSD
PQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLK
PLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWAS
VPCS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="269">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q540">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="270">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q542">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDE
LGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="271">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>133</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..133</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q544">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGN
NERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS</INSDSeq
_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="272">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>153</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..153</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q546">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI
TFCQSIISTLT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
```

<SequenceData sequenceIDNumber="273">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>261</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..261</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q548">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHED
FVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAE
KGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS
IHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="274">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q550">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTNYSAS
WAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="275">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>108</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..108</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q552">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="276">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>248</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..248</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q554">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQAPGKGLEWIACIYTGDGTNYSAS
WAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED
VATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="277">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q556">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKF
KGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="278">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q558">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="279">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>244</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..244</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q560">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVARVIPNAGGTSYNQKF
KGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT
YFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="280">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>120</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..120</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q562">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="281">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>112</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..112</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q564">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
```

```
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="282">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>252</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..252</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q566">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI
VMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR
VEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="283">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>126</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..126</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q568">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQ
KFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSS</INSDSeq_sequen
ce>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="284">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>107</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..107</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q570">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

```
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="285">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>253</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..253</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q572">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQ
KFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="286">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>49</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..49</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q574">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttca</INSDSeq_seq
uence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="287">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>49</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..49</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q576">
```

```
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tacctctgtggggccatctccctggccccaaggcgcagatcaaagaga</INSDSeq_seq
uence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="288">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>530</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..530</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q578">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
LCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQV
VAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC
QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVA
IASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALE
TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE</INSDSeq_se
```

quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="289">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>529</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..529</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q580">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPV
LCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQV
VAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQ
AHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAI
ASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALET
VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE</INSDSeq_seq
uence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="290">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>2814</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..2814</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q582">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgatcctaaaaagaaacgtaaggtcatcgattacccatacgatgttccagattacgc
tatcgatatcgccgatctacgcacgctcggctacagccagcagcaacaggagaagatcaaaccgaaggttcgttcgacag
tggcgcagcaccacgaggcactggtcggccacgggtttacacacgcgcacatcgttgcgttaagccaacacccggcagcg
ttagggaccgtcgctgtcaagtatcaggacatgatcgcagcgttgccagaggcgacacacgaagcgatcgttggcgtcgg
caaacagtggtccggcgcacgcgctctggaggccttgctcacggtggcgggagagttgagaggtccaccgttacagttgg
acacaggccaacttctcaagattgcaaaacgtggcggcgtgaccgcagtggaggcagtgcatgcatggcgcaatgcactg
acgggtgccccgctcaacttgaccccccagcaggtggtggccatcgccagcaatggcggtggcaagcaggcgctggagac
ggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatg
gcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtg
gtggccatcgccagcaatggcggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggccca
cggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgt
tgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcg
ctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccag
ccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccgg
agcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgc
caggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagcaatattggtggcaagcaggcgctggagacggtgca
ggcgctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaataatggtggca
agcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggcc
atcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggctt
gaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccgg
tgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggag
acggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaatgg
```

cggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccagcagg
tggtggccatcgccagcaataatggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcc
cacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggct
gttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccctcagcaggtggtggccatcgccagcaatggcggcggcaggccgg
cgctggagagcattgttgcccagttatctcgccctgatccggcgttggccgcgttgaccaacgaccacctcgtcgccttg
gcctgcctcggcgggcgtcctgcgctggatgcagtgaaaaagggattgggggatcctatcagccgttcccagctggtgaa
gtccgagctggaggagaagaaatccgagttgaggcacaagctgaagtacgtgccccacgagtacatcgagctgatcgaga
tcgcccggaacagcacccaggaccgtatcctggagatgaaggtgatggagttcttcatgaaggtgtacggctacaggggc
aagcacctgggcggctccaggaagcccgacggcgccatctacaccgtgggctcccccatcgactacggcgtgatcgtgga
caccaaggcctactccggcggctacaacctgcccatcggccaggccgacgaaatgcagaggtacgtggaggagaaccaga
ccaggaacaagcacatcaaccccaacgagtggtggaaggtgtacccctccagcgtgaccgagttcaagttcctgttcgtg
tccggccacttcaagggcaactacaaggcccagctgaccaggctgaaccacatcaccaactgcaacggcgccgtgctgtc
cgtggaggagctcctgatcggcggcgagatgatcaaggccggcaccctgaccctggaggaggtgaggaggaagttcaaca
acggcgagatcaacttcgcggccgactgataa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="291">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>2829</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..2829</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q584">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgatcctaaaaagaaacgtaaggtcatcgataaggagaccgccgctgccaagttcga
gagacagcacatggacagcatcgatatcgccgatctacgcacgctcggctacagccagcagcaacaggagaagatcaaac

cgaaggttcgttcgacagtggcgcagcaccacgaggcactggtcggccacgggtttacacacgcgcacatcgttgcgtta
agccaacacccggcagcgttagggaccgtcgctgtcaagtatcaggacatgatcgcagcgttgccagaggcgacacacga
agcgatcgttggcgtcggcaaacagtggtccggcgcacgcgctctggaggccttgctcacggtggcgggagagttgagag
gtccaccgttacagttggacacaggccaacttctcaagattgcaaaacgtggcggcgtgaccgcagtggaggcagtgcat
gcatggcgcaatgcactgacgggtgccccgctcaacttgacccccccagcaagtcgtcgcaatcgccagcaataacggagg
gaagcaagccctcgaaaccgtgcagcggttgcttcctgtgctctgccaggcccacggccttacccctgagcaggtggtgg
ccatcgcaagtaacattggaggaaagcaagccttggagacagtgcaggccctgttgcccgtgctgtgccaggcacacggc
ctcacaccagagcaggtcgtggccattgcctccaacatcgggggggaaacaggctctggagaccgtccaggccctgctgcc
cgtcctctgtcaagctcacggcctgactccccaacaagtggtcgccatcgcctctaataacggcgggaagcaggcactgg
aaacagtgcagagactgctccctgtgctttgccaagctcatgggttgacccccccaacaggtcgtcgctattgcctcaaac
aacgggggcaagcaggcccttgagactgtgcagaggctgttgccagtgctgtgtcaggctcacgggctcactccacaaca
ggtggtcgcaattgccagcaacggcggcggaaagcaagctcttgaaaccgtgcaacgcctcctgcccgtgctctgtcagg
ctcatggcctgacaccacaacaagtcgtggccatcgccagtaataatggcgggaaacaggctcttgagaccgtccagagg
ctgctcccagtgctctgccaggcacacgggctgacccccccagcaggtggtggctatcgccagcaataatgggggcaagca
ggccctggaaacagtccagcgcctgctgccagtgctttgccaggctcacgggctcactcccgaacaggtcgtggcaatcg
cctccaacggagggaagcaggctctggagaccgtgcagagactgctgcccgtcttgtgccaggcccacggactcacacct
cagcaggtcgtcgccattgcctctaacaacgggggcaaacaagccctggagacagtgcagcggctgttgcctgtgttgtg
ccaagcccacggcttgactcctcaacaagtggtcgccatcgcctcaaatggcggcggaaaacaagctctggagacagtgc
agaggttgctgcccgtcctctgccaagcccacggcctgactccccaacaggtcgtcgccattgccagcaacggcggagga
aagcaggctctcgaaactgtgcagcggctgcttcctgtgctgtgtcaggctcatgggctgacccccccagcaagtggtggc
tattgcctctaacaatggaggcaagcaagcccttgagacagtccagaggctgttgccagtgctgtgccaggcccacgggc
tcacaccccagcaggtggtcgccatcgccagtaacggcgggggcaaacaggcattggaaaccgtccagcgcctgcttcca
gtgctctgccaggcacacggactgacacccgaacaggtggtggccattgcatcccatgatgggggcaagcaggccctgga
gaccgtgcagagactcctgccagtgttgtgccaagctcacggcctcacccctcagcaagtcgtggccatcgcctcaaacg
gggggggccggcctgcactggagagcattgttgcccagttatctcgccctgatccggcgttggccgcgttgaccaacgac
cacctcgtcgccttggcctgcctcggcgggcgtcctgcgctggatgcagtgaaaaagggattgggggatcctatcagccg
ttcccagctggtgaagtccgagctggaggagaagaaatccgagttgaggcacaagctgaagtacgtgccccacgagtaca
tcgagctgatcgagatcgcccggaacagcacccaggaccgtatcctggagatgaaggtgatggagttcttcatgaaggtg
tacggctacaggggcaagcacctgggcggctccaggaagcccgacggcgccatctacaccgtgggctcccccatcgacta
cggcgtgatcgtggacaccaaggcctactccggcggctacaacctgcccatcggccaggccgacgaaatgcagaggtacg
tggaggagaaccagaccaggaacaagcacatcaaccccaacgagtggtggaaggtgtacccctccagcgtgaccgagttc
aagttcctgttcgtgtccggccacttcaagggcaactacaaggcccagctgaccaggctgaaccacatcaccaactgcaa
cggcgccgtgctgtccgtggaggagctcctgatcggcggcgagatgatcaaggccggcaccctgaccctggaggaggtga
ggaggaagttcaacaacggcgagatcaacttcgcggccgactgataa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="292">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>530</INSDSeq_length>

<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..530</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q586">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
LCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQV
VAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC
QAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA
IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALE
TVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE</INSDSeq_se
quence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="293">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>529</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..529</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q588">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPV
LCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQV
VAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQA
LETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLC
QAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVA
IASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALET
VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNGGGRPALE</INSDSeq_seq
uence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="294">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>2814</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..2814</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q590">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
```

<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgatcctaaaaagaaacgtaaggtcatcgattacccatacgatgttccagattacgc
tatcgatatcgccgatctacgcacgctcggctacagccagcagcaacaggagaagatcaaaccgaaggttcgttcgacag
tggcgcagcaccacgaggcactggtcggccacgggtttacacacgcgcacatcgttgcgttaagccaacacccggcagcg
ttagggaccgtcgctgtcaagtatcaggacatgatcgcagcgttgccagaggcgacacacgaagcgatcgttggcgtcgg
caaacagtggtccggcgcacgcgctctggaggccttgctcacggtggcgggagagttgagaggtccaccgttacagttgg
acacaggccaacttctcaagattgcaaaacgtggcggcgtgaccgcagtggaggcagtgcatgcatggcgcaatgcactg
acgggtgccccgctcaacttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagcaatattggtggcaagcaggcgctggagac
ggtgcaggcgctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatg
gcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtg
gtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccca
cggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaatggcggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgt
tgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcg
ctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccag
caatggcggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccc
agcaggtggtggccatcgccagcaataatggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgc
caggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaatggcggtggcaagcaggcgctggagacggtcca
gcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaataatggtggca
agcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggcc
atcgccagcaataatggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggctt
gacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaataatggtggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccgg
tgctgtgccaggcccacggcttgacccccccagcaggtggtggccatcgccagcaataatggtggcaagcaggcgctggag
acggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagccacga
tggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgaccccggagcagg
tggtggccatcgccagccacgatggcggcaagcaggcgctggagacggtccagcggctgttgccggtgctgtgccaggcc
cacggcttgaccccggagcaggtggtggccatcgccagcaatattggtggcaagcaggcgctggagacggtgcaggcgct
gttgccggtgctgtgccaggcccacggcttgacccctcagcaggtggtggccatcgccagcaatggcggcggcaggccgg
cgctggagagcattgttgcccagttatctcgccctgatccggcgttggccgcgttgaccaacgaccacctcgtcgccttg
gcctgcctcggcgggcgtcctgcgctggatgcagtgaaaaagggattgggggatcctatcagccgttcccagctggtgaa
gtccgagctggaggagaagaaatccgagttgaggcacaagctgaagtacgtgccccacgagtacatcgagctgatcgaga
tcgcccggaacagcacccaggaccgtatcctggagatgaaggtgatggagttcttcatgaaggtgtacggctacaggggc
aagcacctgggcggctccaggaagcccgacggcgccatctacaccgtgggctcccccatcgactacggcgtgatcgtgga
caccaaggcctactccggcggctacaacctgcccatcggccaggccgacgaaatgcagaggtacgtggaggagaaccaga
ccaggaacaagcacatcaaccccaacgagtggtggaaggtgtacccctccagcgtgaccgagttcaagttcctgttcgtg
tccggccacttcaagggcaactacaaggcccagctgaccaggctgaaccacatcaccaactgcaacggcgccgtgctgtc
cgtggaggagctcctgatcggcggcgagatgatcaaggccggcaccctgaccctggaggaggtgaggaggaagttcaaca

acggcgagatcaacttcgcggccgactgataa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="295">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>2829</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..2829</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q592">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcgatcctaaaaagaaacgtaaggtcatcgataaggagaccgccgctgccaagttcga
gagacagcacatggacagcatcgatatcgccgatctacgcacgctcggctacagccagcagcaacaggagaagatcaaac
cgaaggttcgttcgacagtggcgcagcaccacgaggcactggtcggccacgggtttacacacgcgcacatcgttgcgtta
agccaacacccggcagcgttagggaccgtcgctgtcaagtatcaggacatgatcgcagcgttgccagaggcgacacacga
agcgatcgttggcgtcggcaaacagtggtccggcgcacgcgctctggaggccttgctcacggtggcgggagagttgagag
gtccaccgttacagttggacacaggccaacttctcaagattgcaaaacgtggcggcgtgaccgcagtggaggcagtgcat
gcatggcgcaatgcactgacgggtgccccgctcaacttgacccccgagcaagtcgtcgcaatcgccagccatgatggagg
gaagcaagccctcgaaaccgtgcagcggttgcttcctgtgctctgccaggcccacggccttacccctcagcaggtggtgg
ccatcgcaagtaacggaggaggaaagcaagccttggagacagtgcagcgcctgttgcccgtgctgtgccaggcacacggc
ctcacaccagagcaggtcgtggccattgcctcccatgacgggggaaacaggctctggagaccgtccagaggctgctgcc
cgtcctctgtcaagctcacggcctgactccccaacaagtggtcgccatcgcctctaatggcggcgggaagcaggcactgg
aaacagtgcagagactgctccctgtgctttgccaagctcatgggttgacccccaacaggtcgtcgctattgcctcaaac
ggggggggcaagcaggcccttgagactgtgcagaggctgttgccagtgctgtgtcaggctcacgggctcactccacaaca
ggtggtcgcaattgccagcaacggcggcggaaagcaagctcttgaaaccgtgcaacgcctcctgcccgtgctctgtcagg
ctcatggcctgacaccacaacaagtcgtggccatcgccagtaataatggcgggaaacaggctcttgagaccgtccagagg

ctgctcccagtgctctgccaggcacacgggctgacccccgagcaggtggtggctatcgccagcaatattgggggcaagca
ggccctggaaacagtccaggccctgctgccagtgctttgccaggctcacgggctcactccccagcaggtcgtggcaatcg
cctccaacggcggagggaagcaggctctggagaccgtgcagagactgctgcccgtcttgtgccaggcccacggactcaca
cctgaacaggtcgtcgccattgcctctcacgatgggggcaaacaagccctggagacagtgcagcggctgttgcctgtgtt
gtgccaagcccacggcttgactcctcaacaagtggtcgccatcgcctcaaatggcggcggaaaacaagctctggagacag
tgcagaggttgctgcccgtcctctgccaagcccacggcctgactccccaacaggtcgtcgccattgccagcaacaacgga
ggaaagcaggctctcgaaactgtgcagcggctgcttcctgtgctgtgtcaggctcatgggctgacccccgagcaagtggt
ggctattgcctctaatggaggcaagcaagcccttgagacagtccagaggctgttgccagtgctgtgccaggcccacgggc
tcacaccccagcaggtggtcgccatcgccagtaacaacgggggcaaacaggcattggaaaccgtccagcgcctgcttcca
gtgctctgccaggcacacggactgacacccgaacaggtggtggccattgcatcccatgatgggggcaagcaggccctgga
gaccgtgcagagactcctgccagtgttgtgccaagctcacggcctcacccctcagcaagtcgtggccatcgcctcaaacg
ggggggccggcctgcactggagagcattgttgcccagttatctcgccctgatccggcgttggccgcgttgaccaacgac
cacctcgtcgccttggcctgcctcggcgggcgtcctgcgctggatgcagtgaaaaagggattgggggatcctatcagccg
ttcccagctggtgaagtccgagctggaggagaagaaatccgagttgaggcacaagctgaagtacgtgccccacgagtaca
tcgagctgatcgagatcgcccggaacagcacccaggaccgtatcctggagatgaaggtgatggagttcttcatgaaggtg
tacggctacaggggcaagcacctgggcggctccaggaagcccgacggcgccatctacaccgtgggctcccccatcgacta
cggcgtgatcgtggacaccaaggcctactccggcggctacaacctgcccatcggccaggccgacgaaatgcagaggtacg
tggaggagaaccagaccaggaacaagcacatcaaccccaacgagtggtggaaggtgtacccctccagcgtgaccgagttc
aagttcctgttcgtgtccggccacttcaagggcaactacaaggcccagctgaccaggctgaaccacatcaccaactgcaa
cggcgccgtgctgtccgtggaggagctcctgatcggcggcgagatgatcaaggccggcaccctgaccctggaggaggtga
ggaggaagttcaacaacggcgagatcaacttcgcggccgactgataa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="296">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>615</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..615</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q594">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggt
caacgtgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccg
atgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgac
gccagcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacggcaatgtgaccgagag
cggctgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgt
tcatcaacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcggaggttccggc
ggaggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcac
gtactgtttcgctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtg</INSDS
eq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="297">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>735</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..735</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q596">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggcca
agaccggcacatgatccggatgagacagctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctg
agttcctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaattgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaa
agcgccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgc
cggaagaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcctccaaaagagttcctggaac
ggttcaagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattctagcggaggc
ggaggaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggtgg
aagcggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacac
tgatctccgtgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaac
gagcggctgagaagagaatctgtgcggcctgtt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="298">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1431</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1431</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q598">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggcca
agaccggcacatgatccggatgagacagctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctg
agttcctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaattgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaa
agcgccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgc
cggaagaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcctccaaaagagttcctggaac
ggttcaagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattctagcggaggc

ggaggaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggtgg
aagcggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacac
tgatctccgtgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaac
gagcggctgagaagagaatctgtgcggcctgttagagccaagagatctggaagcggcgccaccaactttagcctgctgaa
acaggctggcgacgtggaagagaaccctggacctatggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacggg
tgcactctaattgggtcaacgtgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccaca
ctgtacaccgagtccgatgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcag
cctggaaagcggcgacgccagcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacg
gcaatgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtc
cacatcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcagg
cggcggaggttccggcggaggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttg
tcatctgttgtctcacgtactgtttcgctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtc
agacccgtg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="299">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>2202</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..2202</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q600">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacaga
aggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtca
attggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaag

gcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttt
tccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctc
aactcctggccaccatggattggacctggattctgttcctcgtggccgccgctacccgcgtgcactccatctgggagctg
aagaaagacgtgtacgtggtggaattggattggtaccccgacgccccaggcgagatggtggttctgacttgcgacacgcc
ggaggaggacggcatcacctggacgctggaccagagcagcgaagtgctgggctctggtaagaccttaaccatccaggtca
aggagttcggtgatgcaggacagtacacgtgtcacaagggcggggaggtcttgtcccatagcctgctgctcctgcacaag
aaggaagacggcatctggtctacggatatccttaaagaccagaaggagcccaagaacaaaaccttcctgcgatgcgaggc
taagaattactccgggcgctttacctgttggtggctcacaaccatctcgaccgacctgaccttctccgtgaagtcttcca
ggggatcttctgatccgcaaggcgttacctgcggggccgctaccctgtcggctgagcgcgtccgtggtgacaacaaggag
tacgagtactcggtggaatgccaggaggacagcgcctgcccagcggccgaagagtccttgcccatcgaggtgatggtgga
cgctgtacacaagctcaagtacgagaactacacctcctccttctttatacgcgacatcatcaagcctgacccccctaaaa
acctgcagctgaagcccccttaaaaactctcgacaggtcgaggtatcctgggagtaccccgacacctggtctactcctcat
tcgtatttcagcctgaccttctgcgtgcaggtgcagggcaagtccaagcgcgagaagaaggaccgcgtgttcaccgacaa
aaccagcgcgactgtcatttgtcggaagaacgcgagcatctccgtacgggcacaggatcgctattactccagcagttggt
cagagtgggcttcggttccgtgttctggaggaggtggcggcggctcacgcaacctgcccgtggcgacgccggacccgggt
atgtttccttgtctgcaccactctcagaacttgctccgtgccgtctcgaatatgctgcagaaggcccgccagactctgga
gttctatccatgcactagtgaggagatcgatcatgaggacatcaccaaggacaagacatccaccgtggaggcttgtctgc
cgctggagttgacaaagaacgagagctgcctcaatagccgcgagacttccttcatcaccaacggctcctgcctcgcgagc
cgtaagacctcctttatgatggcgctgtgcctgtcaagtatctacgaagatctgaaaatgtatcaggtggagttcaaaac
tatgaacgcaaaactcctgatggatcccaagcgccaaattttcttggaccagaacatgcttgccgtgatcgacgagctga
tgcaggccctgaacttcaactccgagaccgtccctcagaagtcgtctctggaggaacccgacttttacaagacaaagatc
aagctgtgcatcctgctacacgcgttccgcattcgggccgtgaccattgaccgcgtgatgtcctacctgaatgcctcgtc
cggcgggggggggctccggtgggggcggctctggcggaggcggctcaggtggcggcggctccggcggaggttcgcttcagc
ttctgcccagttgggcaatcactctgatttccgtcaacggaatcttcgtcatctgctgcctgacctactgctttgctccc
agatgtagagagcgccgccgcaacgagcgcctgcgtcgtgagagcgtgaggcctgtgtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="300">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1014</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1014</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q602">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacaga
aggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtca
attggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaag
gcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttt
tccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctc
aactcctggccaccatggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgcactctaattgggtcaac
gtgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgtacaccgagtccgatgt
gcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctggaaagcggcgacgcca
gcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacggcaatgtgaccgagagcggc
tgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgttcat
caacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggcggaggttccggcggag
gatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcatctgttgtctcacgtac
tgtttcgctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagacccgtgtga</INSDSe
q_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="301">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1134</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1134</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q604">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacaga
aggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtca
attggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaag
gcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttt
tccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctc
aactcctggccaccatggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagac
cggcacatgatccggatgagacagctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagtt
cctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaattgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcg
ccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccgga
agaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcctccaaaagagttcctggaacggtt
caagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattctagcggaggcggag
gaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggtggaagc
ggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacactgat
ctccgtgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaacgagc
ggctgagaagagaatctgtgcggcctgtttaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="302">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1830</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1830</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q606">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tcgaggtcgacggtatcgataagcttgatatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacaga
aggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtca
attggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaag
gcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccgggacattttgacacccccataatatttt
tccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaagagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctc
aactcctggccaccatggattggacctggattctgttcctggtggccgctgccacaagagtgcatagccagggccaagac
cggcacatgatccggatgagacagctgatcgacatcgtggaccagctgaagaactacgtgaacgacctggtgcctgagtt
cctgcctgctcctgaggacgtggaaacaaattgcgagtggtccgccttcagctgcttccagaaggcccagctgaaaagcg
ccaacaccggcaacaacgagcggatcatcaacgtgtccatcaagaagctgaagcggaagcctcctagcaccaatgccgga
agaaggcagaagcacagactgacctgtcctagctgcgacagctacgagaagaagcctccaaaagagttcctggaacggtt
caagagcctgctgcagaagatgatccaccagcacctgagcagcagaacccacggctctgaagattctagcggaggcggag
gaagtggtggcggaggttctggtggcggtggatcaggcggtggcggatctggcggcggaggcagtggcggaggtggaagc
ggtggtggtggctctggcggaggcggtagcggcggaggcggatctcttcaattgctgcctagctgggccatcacactgat
ctccgtgaacggcatcttcgtgatctgctgcctgacctactgcttcgcccctagatgcagagagcggagaagaaacgagc
ggctgagaagagaatctgtgcggcctgttagagccaagagatctggaagcggcgccaccaactttagcctgctgaaacag
gctggcgacgtggaagagaaccctggacctatggactggacttggatactctttctggtcgctgccgccacacgggtgca
ctctaattgggtcaacgtgatcagcgacctgaagaagatcgaggacctgatccagagcatgcacatcgacgccacactgt
acaccgagtccgatgtgcaccctagctgcaaagtgaccgccatgaagtgctttctgctggaactgcaagtgatcagcctg
gaaagcggcgacgccagcatccacgataccgtggaaaatctgatcatcctggccaacaacagcctgtccagcaacggcaa
tgtgaccgagagcggctgcaaagagtgcgaggaactggaagaaaagaacatcaaagagtttctgcagagcttcgtccaca
tcgtgcagatgttcatcaacacctcatcaggtggcggtggaagcggaggtggcggtagtggcggcggaggctcaggcggc
ggaggttccggcggaggatctcttcagctcctgccatcttgggctatcaccctgattagtgtgaatgggatctttgtcat
ctgttgtctcacgtactgtttcgctccccggtgcagagagagaaggcgcaacgaaagactgcggagagaaagcgtcagac
ccgtgtaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="303">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>601</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..601</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q608">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS
EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT
TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS
FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI
SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHED
ITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQI
FLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="304">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1803</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1803</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q610">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggattctgttcctcgtggccgccgctacccgcgtgcactccatctggga
gctgaagaaagacgtgtacgtggtggaattggattggtaccccgacgccccaggcgagatggtggttctgacttgcgaca
cgccggaggaggacggcatcacctggacgctggaccagagcagcgaagtgctgggctctggtaagaccttaaccatccag
gtcaaggagttcggtgatgcaggacagtacacgtgtcacaagggcggggaggtcttgtcccatagcctgctgctcctgca
caagaaggaagacggcatctggtctacggatatccttaaagaccagaaggagcccaagaacaaaaccttcctgcgatgcg
aggctaagaattactccgggcgctttacctgttggtggctcacaaccatctcgaccgacctgaccttctccgtgaagtct
tccaggggatcttctgatccgcaaggcgttacctgcggggccgctaccctgtcggctgagcgcgtccgtggtgacaacaa
ggagtacgagtactcggtggaatgccaggaggacagcgcctgcccagcggccgaagagtccttgcccatcgaggtgatgg
tggacgctgtacacaagctcaagtacgagaactacacctcctccttctttatacgcgacatcatcaagcctgacccccct
aaaaacctgcagctgaagcccctaaaaactctcgacaggtcgaggtatcctgggagtaccccgacacctggtctactcc
tcattcgtatttcagcctgaccttctgcgtgcaggtgcagggcaagtccaagcgcgagaagaaggaccgcgtgttcaccg
acaaaaccagcgcgactgtcatttgtcggaagaacgcgagcatctccgtacgggcacaggatcgctattactccagcagt
tggtcagagtgggcttcggttccgtgttctggaggaggtggcggcggctcacgcaacctgcccgtggcgacgccggaccc
gggtatgtttccttgtctgcaccactctcagaacttgctccgtgccgtctcgaatatgctgcagaaggcccgccagactc
tggagttctatccatgcactagtgaggagatcgatcatgaggacatcaccaaggacaagacatccaccgtggaggcttgt
ctgccgctggagttgacaaagaacgagagctgcctcaatagccgcgagacttccttcatcaccaacggctcctgcctcgc
gagccgtaagacctcctttatgatggcgctgtgcctgtcaagtatctacgaagatctgaaaatgtatcaggtggagttca
aaactatgaacgcaaaactcctgatggatcccaagcgccaaattttcttggaccagaacatgcttgccgtgatcgacgag
ctgatgcaggccctgaacttcaactccgagaccgtccctcagaagtcgtctctggaggaacccgacttttacaagacaaa
gatcaagctgtgcatcctgctacacgcgttccgcattcgggccgtgaccattgaccgcgtgatgtcctacctgaatgcct
cgtccggcgggggggctccggtgggggcggctctggcggaggcggctcaggtggcggcggctccggcggaggttcgctt
cagcttctgcccagttgggcaatcactctgatttccgtcaacggaatcttcgtcatctgctgcctgacctactgctttgc
tcccagatgtagagagcgccgccgcaacgagcgcctgcgtcgtgagagcgtgaggcctgtg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="305">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>248</INSDSeq_length>
```

```
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..248</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q612">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPR
TIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYF
LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICC
LTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="306">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>744</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..744</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q614">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggattttgttcctggtggctgcagccactcgggtccacagctacttcgg
caagctggagagtaaactttccgtgatccgcaacctcaacgaccaagtgctgttcattgaccagggcaaccgccccctct
ttgaagacatgaccgacagcgattgtcgtgacaatgcgccccgcaccatctttataatttccatgtacaaggatagccag
ccgcggggaatggcggtaacgatctcggtgaagtgtgaaaaaatctcgaccctgtcatgcgagaacaagatcatttcctt
caaagagatgaatccacccgacaacatcaaggacaccaagtccgacatcatcttcttccagcgcagcgtgcctgggcatg
acaacaagatgcagttcgagagctcgtcttacgagggctatttcctggcctgcgagaaggagcgtgacctgttcaagctt
atcctgaagaaggaggacgagctgggggaccgcagcatcatgtttacagtgcagaacgaggattctggtggcggcggtag
cgggggcgggggttctggcggcggaggctccggtggaggaggctccggcggcggttcgttgcagctgctgcccagttggg
ccatcactctaatctccgtcaacggcatcttcgtcatctgttgcctgacctactgctttgctccgaggtgtagagagcga
cgccgcaacgagcgcctccgccgtgagtccgtgcgccctgtt</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="307">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>247</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..247</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q616">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPR
TIFIISKYSDSRARGLAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARVPGHGRKTQFESSSYEGYFL
ACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCL
TYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="308">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>741</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..741</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q618">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggatcctgttcctggtggcggcggcaactcgcgtacatagctatttcgg
caagctggagagcaaactatcagtgatccgcaacctcaacgaccaggtcttgtttattgaccagggcaaccgccccctgt
tcgaagacatgacagacagcgattgtcgcgacaatgctcctcgcaccatctttatcatctccaagtactccgattctcga
gccagaggtctcgccgtgaccatctccgtgaagtgcgagaagatatccactctttcatgcgagaacaagatcatttcctt
caaggagatgaatccacccgacaacatcaaggacaccaagtccgacatcatcttcttcgctcgtgtgcctggccacggcc
gcaagacccagttcgagagttccagctacgagggctacttcctggcctgtgagaaagagcgggacctttttcaaattgatt
ctgaagaaggaggacgagctgggcgaccgtagcatcatgtttacggtgcagaacgaggattctggcgggggcggttctgg
agggggtgggtcgggcggtggtggctccgggggaggcggctccggaggaggctcgctgcagctgctgcccagttgggcca
tcacgctcatttctgtcaacggcatcttcgtcatctgttgcctgacctactgctttgctccgaggtgtagggaacgtcgt
```

cgcaacgagcgcctgcgccgcgagtctgttcggccggtg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="309">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>833</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..833</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q620">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS
EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT
TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS
FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI
SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHED
ITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQI
FLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDV
EENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGD
ASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG
GGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="310">

```
<INSDSeq>
 <INSDSeq_length>2499</INSDSeq_length>
 <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
 <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
 <INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
   <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
   <INSDFeature_location>1..2499</INSDFeature_location>
   <INSDFeature_quals>
    <INSDQualifier>
     <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
     <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q622">
     <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
     <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
     <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
   </INSDFeature_quals>
  </INSDFeature>
 </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggattctgtttttggtggcggccgccacccgcgtccattccatatggga
attaaagaaggacgtgtacgtggtggagcttgactggtaccctgacgctcccggcgagatggtggtcctgacctgcgata
cccccgaggaggacggcatcacctggaccctggaccagagctccgaggtgctgggaagcggtaaaaccctcaccatacag
gtgaaggagttcggtgatgctggccagtacacctgtcacaaaggcggggaggtactttcccattcgctgctcctgcttca
caagaaggaagacggcatttggtcgaccgatattctgaaggaccagaaggaaccaaaaaacaagacctttttgcgttgcg
aggccaagaactattccggccgcttcacctgctggtggctaacgaccatctcaaccgacctgaccttctccgttaagtct
agccgtggtagctccgaccctcaggggtaacctgcggggctgcgacgctgagtgcggagcgggtacgcggcgacaacaa
ggagtacgagtactccgtggaatgtcaggaggatagtgcctgcccagcggccgaggagtccctgcccatcgaggtaatgg
tggacgcggtccacaagctgaagtacgagaactacactagctccttctttattagagacatcatcaagcccgacccgcct
aagaacctgcagctgaaacctctcaaaaactcccgccaggttgaagtgtcgtgggagtaccctgacacctggtctacacc
gcacagctatttctcgcttacattctgcgtgcaggtgcagggcaaatccaagcgcgagaagaaagaccgcgtgttcaccg
acaaaacctctgctacagtgatctgccgaaagaatgcttctatctccgtgcgtgctcaggaccgctactactcatcaagc
tggagtgagtgggcctccgtgccatgttccgggggggggcggcggtggctcccgcaacctgcccgttgcaacgcccgaccc
gggtatgttcccatgcctgcaccactcccagaatctgttacgtgctgtaagcaatatgcttcagaaggctcgccagactc
tggagttctacccctgcacttcggaggagatcgaccacgaagacatcaccaaggacaagacatccaccgtggaggcgtgc
ctccctttggagctcacaaagaacgagtcctgtctaaactcaagggagactagcttcatcactaatggatcgtgtctggc
gtcgcgcaagacctctttcatgatggccctgtgcctgtccagcatctatgaggaccttaaaatgtatcaggtcgagttca
agactatgaacgcaaagctgctgatggatcccaagcggcaaattttcctggaccagaacatgctggcggtgatcgacgag
ctgatgcaggccctcaacttcaacagcgaaactgttcctcagaagtcctccctggaggagccggacttttacaagaccaa
```

gatcaagctatgtattttgttacacgccttccgcatccgcgctgtcactattgaccgcgtgatgtcttacctgaacgcat
ctagtgggggcggaggttccgggggaggcggctctggcggtggcggctctggcggtggtggttcaggaggcgggtcccctt
cagctgctcccgtcgtgggccatcacactgatctctgtgaacggcatcttcgtcatctgttgtcttacttactgctttgc
ccccaggtgtagggagagacgccgcaatgaacggctgaggcgtgagagcgtgcgcccggtgagggctaagcgcagcggct
ccggcgcgaccaacttttcgctgctgaagcaggccggggacgtggaggagaatccaggcccgatggattggacctggatc
ctgttcttggtggccgcggctactcgggtgcactctaattgggtcaacgtgatctccgacttgaaaaagatcgaggatct
gatccagagcatgcatatcgacgccacgctgtacaccgagagcgatgtgcacccctcttgcaaggtgaccgccatgaagt
gctttctgctggagctgcaggtcatctctcttgagtcgggcgatgcatctattcatgacaccgtcgagaacctaatcatc
ctggccaacaactcactgtcttcaaacggcaacgtgacggagtctgggtgcaaggaatgtgaggaattggaggagaaaaa
catcaaggagttcctgcagtccttcgtccacatcgtgcagatgtttattaacacgagtagtggcggaggtggcagcggag
gcggcggctccggcggtggaggaagtggaggcggcggctctggtggcggttccctacaattgcttccctcttgggctatc
accctcatcagcgtcaacggtatcttcgtcatctgttgtctgacctactgctttgcccctcgatgccgagagcgccgtcg
caacgagcgcctgcgccgggagtccgtgcgccccgtt</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="311">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>480</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..480</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q624">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPR
TIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYF
LACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICC

LTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDL
KKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECE
ELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPR
CRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="312">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1440</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1440</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q626">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggatcctttcttggtggcggctgcaacccgggttcatagctatttcgg
caagctggagtccaagctctccgtgatccgcaacctcaacgaccaggtgctgttcatcgaccagggcaaccgccccctgt
ttgaggacatgacagattctgattgccgcgacaacgcgccgcgcaccatcttcattatctctatgtacaaggactcccag
ccacgtggtatggccgtcacgatcagcgtgaagtgcgagaagatttctaccctgtcctgcgagaacaagatcatctcgtt
caaggagatgaaccctcccgacaatatcaaggacaccaagtccgacatcatcttcttccagcgatcagtgccaggccacg
acaacaagatgcagttcgagagcagcagctacgagggctacttccttgcgtgcgagaaagagcgcgatctgttcaaactg
atcctcaagaaggaagacgagctcggggaccgcagcatcatgtttaccgtacagaacgaggacagcggcggcggcggctc
cggtggaggcggtagtggcggaggcggctcaggcggcggcggctccggaggtgggtcgttgcagctcttgccgagttggg
ctatcactcttatctccgtaaacggcatcttcgtgatatgctgcctgacgtactgttttgctcctaggtgtcgcgagcgc
cgccggaacgagagactgcgacgggaatccgtgcgcccggtccgcgcgaagcgtagtggctccggtgctaccaacttttc
tctgctgaagcaggccggcgacgtggaggagaatcccggccctatggactggacatggatcctgttcctggtggctgcgg
ccacccgcgtccactcaaattgggtcaatgtgatttctgacctgaagaaaattgaggatctcatccagtccatgcacatt

gacgccactctgtacaccgagagcgatgttcacccctcttgtaaggtgaccgccatgaaatgtttcctgttggagctgca
ggtcatttcgctcgagtctggcgacgcatcgatccatgacaccgtggagaacctgattatcctggccaacaactcccttt
cttcaaatggcaacgtgactgaaagcgggtgcaaagagtgtgaggagctggaagaaaagaacatcaaagagttcctgcaa
tctttcgtccacattgtgcagatgtttattaacacgtcctcgggtggcgggggtcgggcgggggtggttccggcggagg
cgggtccggaggaggggctctggtgggggatccctacagctactgccctcttgggccatcacccttatctccgtcaacg
gtatcttcgtgatctgttgcctgacttactgctttgccccgagatgtcgtgagcgtaggaggaacgagcgcctgcgccgc
gagagcgtgcgtcccgtg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="313">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>339</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..339</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q628">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQAPGKG
LEWIACIYTGDGTNYSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARPDITYGFAINFWGPGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITL
ISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="314">

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1017</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1017</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q630">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggatcctgttcctggtggcggccgctacacgagtccacagccaggtcca
gctcgtggagagcggaggcggcgtggtgcagccaggccgctcgctgcgcctgtcatgcgcagcgtccggtttctccttct
cgtcgacctacgtgtgctgggtccgccaggcccctggcaaaggcctggagtggattgcttgtatttataccggcgacggc
accaactacagcgcaagttgggccaagggccgtttcaccatctccaaggatagtagcaagaacacggtatacctgcagat
gaactctcttcgcgccgaggacaccgccgtgtatttctgtgcccggcccgacatcacttatggcttcgcgattaacttttt
ggggccctggaaccctggtgaccgtgtcctccggcggcggtggctctgggggggggcgggtccggcggaggcggcagcgga
ggcggcggctccgacatccagatgacccagtcgcccagttctttgtccgcttccgtgggggacagggtcaccataaagtg
ccaggcttctcagagcatctcgtcccgcctggcgtggtaccagcagaagcccgggaagccccccaaagctgctcatctacc
gggcttccactctggccagcggtgttccttcccgcttctctggctccgggtcgggcactgactttacattgacgatctct
tcgcttcagccggaagatgtagctacttactactgtcaatgcactggctacggcatcagttggcccatcggtggaggcac
caaggtggagatcaaaagcgggggaggcggttctggcggtggagggtctggcgggggtggctccgggggcggtggtagcg
gtggtggatccctacagctgctgccctcttgggccatcacgctcatttcagttaatggcatcttcgtcatctgctgcctg
acctactgctttgcgccgaggtgtagagagcggcgtcgcaacgagcgcctgcgtcgcgagagcgtgcgcccggtg</INS
DSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="315">
  <INSDSeq>
```

<INSDSeq_length>337</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..337</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q632">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKG
LEWVARVIPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIYWWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLIS
VNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="316">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1011</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1011</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q634">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggatcctgttcctggtggcggcggctacacgtgtgcactccgaggtgca
gttggtggagagcggcggtggtctggtgcagccgggcgggagcctgcgcctgtcgtgcgccgcttccggctactccttca
ccggttattacatccactgggtgcgacaggccccgggcaaaggcctggagtgggtcgctcgcgtaattcctaacgcgggt
ggcaccagctacaaccagaaatttaagggcagattcaccctcagcgttgacaactccaagaacacggcctacctgcagat
gaactcccttcgcgccgaggacaccgccgtgtactactgtgctcgcgagggcatctattggtggggccagggaactctag
ttaccgtgtcctccggcggcggcggctcgggcggcgggggttctggtgggggcggttccggagggggagggtccgacatc
cagatgacccagagcccctctagtctgagcgcatccgtgggggacagggtcaccatcacctgccgctcgtcacaatcgct
tgtccactcaaatggcaacactttcctgcattggtaccagcagaagcccggcaaggcgcccaagctgctcatctacaccg
tgagcaaccgcttttcaggcgtgccatcccgcttctctggctccggctccggtacagatttcacccttaccattagctcg
ttgcagccagaagactttgccacctatttctgttctcagacgactcacgtcccgtggaccttcggacagggcaccaaggt
ggagatcaagagcggcggaggtgggagtggaggcggcgggtccggagggggcggttctggcggcggtggttctggcggag
gtctctgcagctgctacccagttgggccatcactctcatttctgtcaacggcatcttcgtcatatgttgcctgacctac
tgctttgctcctaggtgtcgtgagcgccgccgcaacgagcggttgcggcgtgaatccgtgcgccctgta</INSDSeq_s
equence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="317">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>343</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..343</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q636">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKG
LEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIRSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSW
AITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="318">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1029</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1029</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q638">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggactggacctggatcctgttcctggtcgcagcggccacccgcgtacattctcaggtgca
gctggtggaatccgggggtggcgtggtgcaaccaggccgtagcctgcgcctgagctgtgctgcgtccggctttacttttt
```

cgtcttacggcatgcactgggtgcgccaggccccgggtaaaggcttggagtgggtcgcggttatcagctatgaggagagc
aaccgctaccacgcggactccgtgaagggccgattcaccatctcgcgggacaactccaagataaccctgtacctgcagat
gaactctctgcggactgaagacaccgccgtgtactactgtgcccgcgatggcggaatcgccgctcccgggcccgactatt
ggggccagggcacactcgttaccgtctcctcgggaggcggcggcagtggtggtggaggttccggcggcgggggctccggg
ggtggcggctctgacatcgtgatgacgcagagccctttgagcctaacagttacccccggggagcccgcttcgatttcatg
ccgctcctcccagagcctgctgtactcaaatggctacaactacctggactggtacctccagaagccgggtcagtcccctc
aggtgctcatctcgttgggcagcaacagggcctctggcgtgccagaccgcttctccggatctggcagcggaaccgatttc
accctgaagatctctagagtggaggctgaggacgtgggcgtgtattactgtatgcaggcccgacagactcccttcacctt
cggccccgggaccaaggtggatatccgctcgggaggcggcggcagcggtgggggaggcagcggtggtggcggatccgggg
ggggcggctctggtggcggatccctccagctgctgccgagttgggctatcactcttatttccgtaaatgggattttcgtc
atctgctgccttacctactgctttgcacctagatgtcgcgagcgtaggcgcaacgagcggcttcgtcgcgagtccgtccg
ccctgtc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="319">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>344</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..344</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q640">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQG
LEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTV
SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPS

WAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="320">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1032</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..1032</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q642">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggatcctgttcctggtggctgctgccacccgtgtgcacagccaggtgca
gctggtgcaatccggcgccgaggtgaagaagcccggcgccagcgtgaaggtatcgtgtaaggcttcgggctacacgttca
ccggctactacatgcattgggtccgccaggcccccggacagggcctggagtggatgggctggattaaccccgactccggc
ggcaccaactacgcgcagaaatttcaggggcgagtgactatgacaagggacacttccatctccacagcctacatggagct
caaccgcctgcgcagcgatgacaccgcagtgtactattgtgctcgcgaccagcctctaggttactgcactaatggcgtat
gtagctatttcgactattggggccagggcaccctggtcaccgtgtccagcggcggaggggggctcaggcggaggtggctca
ggaggtggcggctcgggggggcggtgggtccgacattcagatgacccagtccccgagctcggtctctgcttctgtgggaga
ccgcgtgacgataacctgccgtgcctcccagggcatctacagttggcttgcgtggtaccagcagaagccaggcaaggcgc
caaacctgctgatttacaccgcatccactcttcagtcaggcgttccttcccgcttcagtggctctggttctggcaccgat
ttcacgctgaccatctcctccttgcagccggaagactttgccacttactactgccaacaggccaacatcttccctctgac
cttcggcggtggcaccaaggtggagatcaaatctggcggaggggctcgggcgggggtggttctggcggcgggggaagtg
gtgggggcggatctggtggtggtagcctgcagctcttgccctcctgggcgatcaccctcatcagcgtcaatggcatcttc
gtcatctgttgcctgacctactgctttgcgccgagatgtcgagagcgccggcgcaacgagcgcctgcgtcgggagtccgt
gcgccccgtg</INSDSeq_sequence>

</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="321">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>783</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..783</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q644">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgatcgagacctacaaccagacttccccacgtagcgccgccactggtctacccatctcgat
gaaaatcttcatgtatctgctgaccgtgttcctgatcacccagatgattggctccgctctgtttgccgtgtacttgcacc
gccgcctggacaaaattgaggacgagcggaatctgcacgaagatttcgtatttatgaagaccatccagaggtgtaacact
ggcgagcgttctctttcgttgcttaactgcgaagagatcaagagccagttcgagggcttcgtcaaggacatcatgctcaa
caaggaggagactaagaaggagaactcctttgagatgcagaagggtgatcagaaccccccaaattgcagcgcatgtgataa
gcgaggcttcctccaagacaaccagtgtgctgcagtgggcggagaagggctactacaccatgtcaaataacctggtgacc
ctggagaacggcaagcagctgacggtgaagcgccaggggctctattacatctacgcgcaggtcacgttctgttcgaaccg
cgaagcctcctctcaggctcccttcatcgcctcactgtgcctgaaatctccgggacgcttcgagcgaatcctgctccgcg
ccgccaacacgcactcctccgccaagccttgcgggcagcagagcatccaccttggtggggtttttgagctgcagcctggc
gcgtccgtgttcgtcaacgtgaccgacccgtcccaggtctctcatggaaccggcttcacctccttcggcctgctcaagtt
g</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="322">
<INSDSeq>

```
    <INSDSeq_length>566</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..566</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q646">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHED
FVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAE
KGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQS
IHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKLSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNG
IFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWV
NVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES
GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLT
YCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="323">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1698</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1698</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q648">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgatcgaaacttacaaccagacgagcccgcgctccgccgccaccgggctgcccatctctat
gaaaatcttcatgtatctgctgaccgtgtttctgatcacccagatgatcggttccgcgctgtttgccgtgtacctgcacc
gccgcctggacaagatagaagacgagcgcaacctgcacgaagatttcgtcttcatgaagaccatccagcggtgtaatacc
ggcgagaggagcctgagcttgctcaactgcgaggagatcaaaagtcagttcgagggcttcgttaaggacatcatgctcaa
caaggaggagaccaagaaggagaactccttcgagatgcaaaaggggggaccagaaccctcagatcgccgcgcatgtaattt
ccgaggcctcatccaagacgacttctgtcctacagtgggcagagaagggctactacaccatgtctaataacctggtcacc
cttgagaacggcaagcaactgacagtgaagcgccagggcctctactacatctacgcgcaggtgaccttctgcagcaaccg
cgaggcttcctcccaagctcccttcatcgcatctctgtgcctgaaaagccctggccgcttcgagcggattctccttcgtg
cagcaaacactcactcgtccgccaagccctgtggacagcagagcatccacctgggcggcgtgttcgagctgcagccaggc
gcctccgtgttcgtcaatgtgaccgacccgtcccaggtgtcccatggcactggcttcacctccttcggcctcctcaaact
gtccggcggcggtggcagtggtggcgggggatcaggtggcggcggctccggaggtggcgggtccgggggaggttctcttc
agcttctgcctagctgggcgatcaccctgatctccgttaatggcatcttcgtcatttgttgtttgacctattgctttgcc
ccgagatgtcgagagcgtagacgcaacgagcgcctgcgccgtgaaagcgtgcgacctgtgcgcgctaagcgcagcggctc
cggcgctaccaacttctcattactcaagcaggctggagatgtagaggagaatccagggccaatggattggacctggatcc
tgttcctggtggccgccgcgactcgcgtccacagtaattgggtcaacgtgatctctgacctgaaaaagattgaggacttg
atccagagcatgcacattgacgctaccctgtacacggagagtgacgtgcacccctcgtgcaaggtgacagccatgaagtg
ctttttgctggagttgcaggtcatctctctagagagcggtgatgcctccatccatgacaccgtggagaaccttatcatcc
tggccaacaacagcctgtcgagcaacggcaacgtgaccgagtccgggtgcaaggaatgtgaggagctggaggagaaaaac
atcaaggagttcctgcagtcgtttgtgcacatcgtgcagatgtttattaacacctcttctggcggtgggggatcgggggg
gggcggctccggcggtggcggttctggaggcggtggttctggcgggggatctttacagctgctgcccagttgggcgatca
ctctcatttccgtgaacggcattttcgtcatttgctgtttgacctactgctttgctccgaggtgtcgcgagcgtcgccgc
aacgagcgcctacggcgggaatcggtgaggcccgtg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="324">
  <INSDSeq>
```

```
    <INSDSeq_length>226</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..226</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q650">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI
TFCQSIISTLTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRES
VRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="325">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>681</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..681</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q652">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgtatcggatgcagctgctgtcttgtattgctctatcactggcgctggtgaccaactccgc
tcctacttccagctcgaccaagaagacccagctccaacttgagcacctgctgcttgatcttcagatgatcctgaacggca
tcaacaactacaaaaaaccccaagctgacccgcatgctcactttcaagttctacatgcctaaaaaggccaccgagctcaag
cacttgcagtgcctggaggaggagttgaagccgttggaagaggtgctcaacctggcccagtccaagaatttccatctaag
accccgcgacctgatctctaacatcaacgtgattgtactggagctgaagggctccgagaccaccttcatgtgcgagtacg
cggacgagactgcaaccatcgtggagttcctgaaccgctggatcacgttctgtcagagcatcatctcgacccttacatct
ggcggcgggggtcgggcggtgggggctctggaggaggcggtagtgggggtggcggctccggtggaggcagcctgcagct
gctcccaagttgggccatcaccctgattagcgtcaatggcatcttcgtcatatgttgtctgacctactgctttgccccc
gctgccgagaacgtcgccgcaacgagcggctgcgcagggagtccgtgcgcccggtgtga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="326">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>601</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..601</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q654">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSS
EVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLT
TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSS
FFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASI
SVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHED
ITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQI
FLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="327">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>681</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..681</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q656">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgtatcggatgcagctgctgtcttgtattgctctatcactggcgctggtgaccaactccgc
tcctacttccagctcgaccaagaagacccagctccaacttgagcacctgctgcttgatcttcagatgatcctgaacggca
tcaacaactacaaaaaccccaagctgacccgcatgctcactttcaagttctacatgcctaaaaaggccaccgagctcaag
cacttgcagtgcctggaggaggagttgaagccgttggaagaggtgctcaacctggcccagtccaagaatttccatctaag
accccgcgacctgatctctaacatcaacgtgattgtactggagctgaagggctccgagaccaccttcatgtgcgagtacg
```

cggacgagactgcaaccatcgtggagttcctgaaccgctggatcacgttctgtcagagcatcatctcgacccttacatct
ggcggcgggggtcgggcggtgggggctctggaggaggcggtagtgggggtggcggctccggtggaggcagcctgcagct
gctcccaagttgggccatcaccctgattagcgtcaatggcatcttcgtcatatgttgtctgacctactgctttgccccc
gctgccgagaacgtcgccgcaacgagcggctgcgcagggagtccgtgcgcccggtgtga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="328">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>205</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..205</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q658">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFL
LELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGG
SGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequenc
e>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="329">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>618</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..618</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q660">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggatcctgttcctggtggctgcggccacccgtgtacacagcaactgggt
caatgtgatctccgacctgaagaagattgaggacctcatccagtctatgcacattgacgcaacactttacaccgagagcg
atgtgcacccctcttgcaaggtgactgccatgaaatgtttcttgctcgaattgcaggtcatctctctggagagtggggac
gcttccatacatgacaccgtggagaacctgatcatcctggccaacaacagcctctcgtcaaatggcaacgtgactgagag
cgggtgcaaagagtgtgaggagctggaggagaagaacatcaaggagttcctgcagagcttcgtccacatcgtgcagatgt
ttattaacacgtcgtccggaggcgggggctctggtggcggcggctccgggggaggcggctccggtggcggtggttccggc
ggaggctcgctacagctgctgcccagttgggccatcacccttatttctgtcaacggcatcttcgttatctgttgcctgac
ctactgctttgcgccgaggtgtcgcgagcggcgtcgcaacgagcgcctgcgccgagaatccgtgcgccctgtgtga</IN
SDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="330">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>717</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..717</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
```

```
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q662">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctggacggcga
cgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatct
gcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgcttcagccgctac
cccgaccacatgaagcagcacgacttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaa
ggacgacggcaactacaagacccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggca
tcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggcc
gacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccgacca
ctaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcacccagtccgccctga
gcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccgccgggatcactcacggcatggac
gagctgtacaagtga</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="331">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q664">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKSEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="332">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q666">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKGEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="333">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q668">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKAEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="334">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q670">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKVEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="335">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q672">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKDEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="336">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q674">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKEEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="337">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>144</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..144</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q676">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDSRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKNEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
EL</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="338">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q678">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="339">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q680">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRAKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="340">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q682">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="341">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q684">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="342">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q686">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESQLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRTKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRRVPGHHNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="343">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q688">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYKDKQPRAQAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="344">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>158</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..158</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q690">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISDYKDKQPRAXAA
VTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKE
DELGDRSIMFTIQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="345">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q692">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHNNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTTQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="346">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q694">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYKDKQPRAQAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRKVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="347">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q696">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDRQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHHHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="348">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q698">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTTQHED</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="349">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q700">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKIESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRAKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRRVPGHHHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="350">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q702">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKIESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDKQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHDYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="351">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q704">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>YFGKYESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHEHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="352">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q706">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>HFGKYESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHHNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="353">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q708">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRAKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTAQKED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="354">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q710">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISDYRDSQPRGRAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFKRNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQHED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="355">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q712">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISNYRDSQPRGQAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFKRRVPGHNHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="356">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q714">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="357">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q716">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="358">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>194</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..194</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q718">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRAKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQXEDSEQIDNOXANYNATURALLYOCCURINGAMINOACID</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="359">

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q720">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRTKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRNVPGHHDKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQHED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="360">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q722">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRAKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHQHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTIQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="361">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q724">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKHESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRGKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERNVPGHKYKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="362">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q726">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKYESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYKDSQPRTKAV
TISVKCEKISTLSCDNKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHKHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="363">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q728">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RFGKLESRLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISTYRDSQPRTKAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRKVPGHNHKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQKED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="364">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q730">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISEYKDSELRGRAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFPRAVPGHNRKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="365">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q732">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYKDSAGRGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHSNKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="366">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q734">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSAARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHKRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="367">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q736">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSRGRGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHNSKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="368">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q738">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSVPRGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARAVPGHSRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="369">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q740">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSGARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARAVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="370">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q742">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSKARGMAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARDVPGHSSKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="371">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q744">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="372">

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q746">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRNVPGHGRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="373">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q748">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="374">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q750">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARDVPGHSGKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
```

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="375">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q752">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYTDSRPRGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHSSKKQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="376">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
```

```
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q754">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYTDSRARGMAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHNDKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="377">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q756">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISRYKDSGKRGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFRRSVPGHSRKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="378">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q758">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSGARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFERDVPGHSGKVQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="379">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

```
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q760">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSRPRGMAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRAVPGHNRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="380">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q762">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSLARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRDVPGHSRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="381">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>156</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..156</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q764">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNE</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="382">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q766">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRNVPGHGRKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="383">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q768">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYGDSVPRGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARAVPGHSRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="384">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q770">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARSVPGHGRKTQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="385">
```

```
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>157</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..157</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q772">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISKYSDSRARGLAV
TISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFARDVPGHSGKRQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKED
ELGDRSIMFTVQNED</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="386">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>199</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..199</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
```

```
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q774">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EGIKSNISLLKDELRGQISHISHEYLSLIDLAFDSKQNRLFEMKVLELLVNEYGFKGRHLGG
SRKPDGIVYSTTLEDNFGIIVDTKAYSEGYSLPISQADEMERYVRENSNRDEEVNPNKWWENFSEEVKKYYFVFISGSFK
GKFEEQLRRLSMTTGVNGSAVNVVNLLLGAEKIRSGEMTIEELERAMFNNSEFILKY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="387">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>594</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..594</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q776">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDTEEAFIDEVHEVQPTSSGSE
ILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTSKSTRRSRVSALNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCFKLFFTDE
IISEIVKWTNAEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFDRSLSMVYVSVMSRDRFDFLIR
CLRMDDKSIRPTLRENDVFTPVRKIWDLFIHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIKILMMCDSG
```

TKYMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCRNITCDNWFTSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVL
KNSRSRPVGTSMFCFDGPLTLVSYKPKPAKMVYLLSSCDEDASINESTGKPQMVMYYNQTKGGVDTLDQMCSVMTCSRKT
NRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSKGEKVQSRKKFMRNLYMSLTSSFMRKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPG
TSDDSTEEPVMKKRTYCTYCPSKIRRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQSCF</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="388">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>340</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..340</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q778">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGKSKEISQDLRKKIVDLHKSGSSLGAISKRLKVPRSSVQTIVRKYKHHGTTQPSYRSGRRR
VLSPRDERTLVRKVQINPRTTAKDLVKMLEETGTKVSISTVKRVLYRHNLKGRSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHGDKD
RTFWRNVLWSDETKIELFGHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPTVKHGGGSIMLWGCFAAGGTGALHKIDGIMRKENYVDIL
KQHLKTSVRKLKLGRKWVFQMDNDPKHTSKVVAKWLKDNKVKVLEWPSQSPDLNPIENLWAELKKRVRARRPTNLTQLHQ
LCQEEWAKIHPTYCGKLVEGYPKRLTQVKQFKGNATKY</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="389">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>340</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..340</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q780">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGKSKEISQDLRKRIVDLHKSGSSLGAISKRLAVPRSSVQTIVRKYKHHGTTQPSYRSGRRR
VLSPRDERTLVRKVQINPRTTAKDLVKMLEETGTKVSISTVKRVLYRHNLKGHSARKKPLLQNRHKKARLRFATAHGDKD
RTFWRNVLWSDETKIELFGHNDHRYVWRKKGEACKPKNTIPTVKHGGGSIMLWGCFAAGGTGALHKIDGIMDAVQYVDIL
KQHLKTSVRKLKLGRKWVFQHDNDPKHTSKVVAKWLKDNKVKVLEWPSQSPDLNPIENLWAELKKRVRARRPTNLTQLHQ
LCQEEWAKIHPNYCGKLVEGYPKRLTQVKQFKGNATKY</INSDSeq_sequence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="390">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>239</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..239</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
```

```
      <INSDQualifier id="q782">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaag
gcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattggtcccatcgaattaggaggaaaaactgtttcata
cagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggcgtcaattaggaggaaaaactgtttcatacagaaggc
gtcaattggtcccggga</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="391">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q784">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cattttgacacccccataatatttttccagaattaacagtataaattgcatctcttgttcaa
gagttccctatcactctctttaatcactactcacagtaacctcaactcctg</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
```

```
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="392">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>1806</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..1806</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q786">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atggattggacctggattctgttcctcgtggccgccgctacccgcgtgcactccatctggga
gctgaagaaagacgtgtacgtggtggaattggattggtaccccgacgccccaggcgagatggtggttctgacttgcgaca
cgccggaggaggacggcatcacctggacgctggaccagagcagcgaagtgctgggctctggtaagaccttaaccatccag
gtcaaggagttcggtgatgcaggacagtacacgtgtcacaagggcggggaggtcttgtcccatagcctgctgctcctgca
caagaaggaagacggcatctggtctacggatatccttaaagaccagaaggagcccaagaacaaaaccttcctgcgatgcg
aggctaagaattactccgggcgctttacctgttggtggctcacaaccatctcgaccgacctgaccttctccgtgaagtct
tccaggggatcttctgatccgcaaggcgttacctgcggggccgctaccctgtcggctgagcgcgtccgtggtgacaacaa
ggagtacgagtactcggtggaatgccaggaggacagcgcctgcccagcggccgaagagtccttgcccatcgaggtgatgg
tggacgctgtacacaagctcaagtacgagaactacacctcctccttctttatacgcgacatcatcaagcctgacccccct
aaaaacctgcagctgaagcccccttaaaaactctcgacaggtcgaggtatcctgggagtaccccgacacctggtctactcc
tcattcgtatttcagcctgaccttctgcgtgcaggtgcagggcaagtccaagcgcgagaagaaggaccgcgtgttcaccg
acaaaaccagcgcgactgtcatttgtcggaagaacgcgagcatctccgtacgggcacaggatcgctattactccagcagt
tggtcagagtgggcttcggttccgtgttctggaggaggtggcggcggctcacgcaacctgcccgtggcgacgccggaccc
gggtatgtttccttgtctgcaccactctcagaacttgctccgtgccgtctcgaatatgctgcagaaggcccgccagactc
tggagttctatccatgcactagtgaggagatcgatcatgaggacatcaccaaggacaagacatccaccgtggaggcttgt
ctgccgctggagttgacaaagaacgagagctgcctcaatagccgcgagacttccttcatcaccaacggctcctgcctcgc
gagccgtaagacctcctttatgatggcgctgtgcctgtcaagtatctacgaagatctgaaaatgtatcaggtggagttca
```

aaactatgaacgcaaaactcctgatggatcccaagcgccaaattttcttggaccagaacatgcttgccgtgatcgacgag
ctgatgcaggccctgaacttcaactccgagaccgtccctcagaagtcgtctctggaggaacccgacttttacaagacaaa
gatcaagctgtgcatcctgctacacgcgttccgcattcgggccgtgaccattgaccgcgtgatgtcctacctgaatgcct
cgtccggcgggggggctccggtgggggcggctctggcggaggcggctcaggtggcggcggctccggcggaggttcgctt
cagcttctgcccagttgggcaatcactctgatttccgtcaacggaatcttcgtcatctgctgcctgacctactgctttgc
tcccagatgtagagagcgccgccgcaacgagcgcctgcgtcgtgagagcgtgaggcctgtgtga</INSDSeq_sequen
ce>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="393">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>574</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..574</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q788">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cccctctccctcccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgtg
cgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttcttg
acgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctct
ggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgtagcgacccctttgcaggcagcggaacccccccacctggcgacaggtgcctct
gcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgtg
gaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatc
tgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaaacgtctaggcccccgaaccacgggg
acgtggttttcctttgaaaaacacgatgataa</INSDSeq_sequence>

```
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="394">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>249</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..249</INSDFeature_location>
     <INSDFeature_quals>
      <INSDQualifier>
       <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q790">
       <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
       <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
       <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
      </INSDQualifier>
     </INSDFeature_quals>
    </INSDFeature>
   </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagagat
aattggaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagt
ttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggcttta
tatatcttgtggaaaggacgaaacacc</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
 <SequenceData sequenceIDNumber="395">
  <INSDSeq>
   <INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
   <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
   <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
   <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
     <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
     <INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
```

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q792">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggatttccagtggcgagagaactcgagttctctcgccactggaaatcc</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="396">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q794">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>cattgtctttcctagcggaatctcgagattccgctaggaaagacaatg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="397">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q796">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>caaggcgcagatcaaagagagctcgagctctctttgatctgcgccttg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="398">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q798">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>aaggcgcagatcaaagagagcctcgaggctctctttgatctgcgcctt</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="399">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q800">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>atcggagagcttcgtgctaaactcgagtttagcacgaagctctccgat</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="400">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q802">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtatgccaccattgtctttcctcgaggaaagacaatggtggcatact</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="401">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>48</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..48</INSDFeature_location>

```
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q804">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggatttccagtggcgagagaactcgagttctctcgccactggaaatcc</INSDSeq_sequ
ence>
   </INSDSeq>
  </SequenceData>
  <SequenceData sequenceIDNumber="402">
   <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>245</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
     <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..245</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_quals>
       <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
       </INSDQualifier>
       <INSDQualifier id="q806">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        <NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
       </INSDQualifier>
      </INSDFeature_quals>
     </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
```

<INSDSeq_sequence>MDWTWILFLVAAATRVHSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEW
SAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS
SRTHGSEDSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTY
CFAPRCRERRRNERLRRESVRPV</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
 </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，視情況其中該患者或個體已接受至少一種先前療法，

其中該等TIL群體中之一部分為經修飾之TIL，其各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物。

【請求項2】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與經修飾之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自該個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得及/或接受來源於自該個體或患者切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

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

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容

器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之該包含所收集之TIL群體之輸注袋；

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

(i) 在該投與步驟(h)之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項3】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自個體獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得來源於自該個體切除之腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將該等腫瘤片段添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3-11天以獲得該第二TIL群體，且其中

自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之該包含所收集之TIL群體之輸注袋；

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

(i) 在該投與步驟(h)之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項4】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或

其他用於獲得來自該患者或個體中之癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

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

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之該包含所收集之TIL群體之輸注袋；

(h) 向該個體投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之

該輸注袋之第三TIL群體；及

(i) 在該投與步驟(h)之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項5】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與經修飾之腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 自該個體或患者切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自該癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段進行；

(b) 將該腫瘤處理成多個腫瘤片段且將該等腫瘤片段添加至密閉系統中；

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

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之

轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；

(g) 使用冷凍保存過程冷凍保存來自步驟(f)之該包含所收集之TIL群體之輸注袋；

(h) 向該患有癌症之個體或患者投與治療有效劑量之來自步驟(g)中之該輸注袋之第三TIL群體；及

(i) 在該投與步驟(h)之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項6】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自該個體或患者之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體；

(c) 使該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(d) 在該第一細胞培養基中進行該第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中該第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中該啟始第一

擴增進行1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基中進行該第二TIL群體之快速第二擴增，以獲得第三TIL群體；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況該快速第二擴增可在該快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向該患有癌症之個體或患者投與治療有效部分之該第三TIL群體；及

(h) 在該投與步驟(g)之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項7】一種治療有需要之患者或個體中之癌症之方法，其包含投與腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)群體，該方法包含以下步驟：

(a) 自該個體或患者中之癌症切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自該癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段進行；

(b) 將該腫瘤片段化成腫瘤片段；

(c) 使該等腫瘤片段與第一細胞培養基接觸；

(d) 在該第一細胞培養基中進行該第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中該

第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中該啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基中進行該第二TIL群體之快速第二擴增，以獲得第三TIL群體；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況該快速第二擴增可在該快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(f) 收集該第三TIL群體；

(g) 向該患有癌症之個體或患者投與治療有效部分之該第三TIL群體；及

(h) 在該投與步驟(g)之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項8】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包含：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得及/或接受來源於自個體中之癌症切除之該腫瘤之第一TIL群體；

(b) 自步驟(a)中之該第一TIL群體選擇PD-1陽性TIL，以獲得富含PD-1之TIL群體；

(c) 藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第一細胞培養基中培養該富含PD-1之TIL群體來進行啟

始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中該啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體之數目大於該第一TIL群體；

(d) 藉由在包含IL-2、OKT-3及APC之第二培養基中培養該第二TIL群體來進行快速第二擴增，以產生治療性TIL群體，其中在該快速第二擴增中添加之APC之數目為在步驟(b)中添加之APC之數目之至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得該治療性TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該治療性TIL群體；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之TIL群體轉移至輸注袋，及

(g) 在該方法期間之任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項9】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得及/或接受來源於自個體或患者中之癌症切除之該腫瘤之第一TIL群體；

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

(c) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL

群體來進行第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該第一擴增係在提供第一透氣表面區域之密閉容器中進行，其中該第一擴增進行約3-14天以獲得該第二TIL群體，且其中自步驟(b)至步驟(c)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-14天以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之治療性TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至該輸注袋之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項10】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得來源於自個體中之癌症切除之該腫瘤之第一TIL

群體；

(b) 將該等腫瘤片段添加至密閉系統中；

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

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至該輸注袋之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項11】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自患者或個體中之癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體，

(b) 將該第一TIL群體添加至密閉系統中；

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

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至該輸注袋之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項12】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體或患者中之癌症切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自該癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段進行；

(b) 將該等腫瘤片段添加至密閉系統中；

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

(d) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)補充該第二TIL群體之細胞培養基來進行第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該第二擴增進行約7-11天以獲得該第三TIL群體，其中該第二擴增係在提供第二透氣表面區域之密閉容器中進行，且其中自步驟(c)至步驟(d)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(e) 收集自步驟(d)獲得之該第三TIL群體，其中自步驟(d)至步驟(e)之轉變係在不開放該系統之情況下進行；

(f) 將來自步驟(e)之該所收集之第三TIL群體轉移至輸注袋，其中自步驟(e)至(f)之轉移係在不開放該系統之情況下進行；及

(g) 在步驟(f)中之轉移至該輸注袋之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項13】如請求項9至12中任一項之方法，其中該第一擴增分成第一步驟及第二步驟，其中該方法進一步包含藉由在含有IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行該第一擴增之第一步驟，以產生由該等腫瘤片段或樣品釋放之TIL，分離該等腫瘤片段或樣品中殘留之TIL與由該等腫瘤片段或樣品釋放之TIL，視情況消化該等腫瘤片段或樣品以產生腫瘤消化物，及藉由在該細胞培養基中培養該等腫瘤片段或樣品或腫瘤消化物中之剩餘TIL來進行該第一擴增之第二步驟，以產生該第二TIL群體。

【請求項14】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得來自個體或患者中之癌症之含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣品之手段獲得及/或接受第一TIL群體；

(b) 使該第一TIL群體與第一細胞培養基接觸；

(c) 在該第一細胞培養基中進行該第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中該第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中該啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(d) 在第二細胞培養基中進行該第二TIL群體之快速

第二擴增，以獲得第三TIL群體；其中該第二細胞培養基包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況該快速第二擴增可在該快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(e) 收集該第三TIL群體；及

(f) 在步驟(e)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項15】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 自個體或患者中之癌症切除腫瘤，該腫瘤包含第一TIL群體，視情況藉由手術切除、穿刺生檢、芯針生檢、小型生檢或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的腫瘤樣品之手段進行；

(b) 將該腫瘤片段化成腫瘤片段；

(c) 使該等腫瘤片段與第一細胞培養基接觸；

(d) 在該第一細胞培養基中進行該第一TIL群體之初始擴增(或啟始第一擴增)，以獲得第二TIL群體，其中該第一細胞培養基包含IL-2、視情況選用之OKT-3(抗CD3抗體)及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)，其中該啟始第一擴增進行1至8天之時段；

(e) 在第二細胞培養基中進行該第二TIL群體之快速第二擴增，以獲得第三TIL群體；其中該第二細胞培養基

包含IL-2、OKT-3(抗CD3抗體)及APC；且其中該快速擴增進行14天或更短之時段，視情況該快速第二擴增可在該快速第二擴增起始之後進行1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天；

(f) 收集該第三TIL群體；及

(g) 在步驟(f)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項16】一種將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包含：

(a) 藉由將自腫瘤獲得之腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段來獲得及/或接受來源於自個體中之癌症切除之該腫瘤之第一TIL群體；

(b) 藉由在包含IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包含抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得第二TIL群體，其中該第二TIL群體之數目大於該第一TIL群體；

(c) 藉由使該第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；

(d) 收集自步驟(c)獲得之該治療性TIL群體；及

(e) 在步驟(d)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項17】如請求項16之方法，其中在步驟(b)中，該細胞培養基進一步包含抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中之該培養基中之APC之數目大於步驟(b)中之該培養基中之APC之數目。

【請求項18】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包含：

(a) 藉由在包含IL-2、視情況選用之OKT-3及視情況選用之抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，該第一TIL群體可藉由將來源於自個體中之癌症切除之腫瘤的腫瘤樣品處理成多個腫瘤片段而獲得，以產生第二TIL群體，其中該啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中該啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體之數目大於該第一TIL群體；

(b) 藉由使該第二TIL群體與該第二TIL群體之具有額外的IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增中之APC之數目為步驟(a)中之APC之數目之至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；

(c) 收集自步驟(b)獲得之該治療性TIL群體；及

(d) 在步驟(c)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項19】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包含：

(a) 藉由在包含IL-2、視情況選用之OKT-3且視情況包含抗原呈現細胞(APC)之細胞培養基中培養第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該啟始第一擴增進行約1至7/8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體之數目大於該第一TIL群體；

(b) 藉由使該第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三TIL群體，其中該快速第二擴增進行約1至11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；

(c) 收集自步驟(b)獲得之該治療性TIL群體；及

(d) 在步驟(c)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項20】如請求項19之方法，其中在步驟(a)中，該細胞培養基進一步包含抗原呈現細胞(APC)，且其中步驟(c)中之該培養基中之APC之數目大於步驟(b)中之該培養基中之APC之數目。

【請求項21】如請求項14至18中任一項之方法，其中該啟始第一擴增分成第一步驟及第二步驟，其中該方法進一步包含藉由在含有IL-2之細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行該啟始第一擴增之第一步驟，以產生由該等腫瘤片段或樣品釋放之TIL，分離該等腫瘤片段或樣品中殘留之TIL與由該等腫瘤片段或樣品釋放之TIL，視情況消化該等腫瘤片段或樣品以產生腫瘤消化物，及藉由在該細胞培養基中培養該等腫瘤片段或樣品或腫瘤消化物中之剩餘TIL來進行該啟始第一擴增之第二步驟，以產生該第二TIL群體。

【請求項22】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包含：

(a) 藉由將腫瘤樣品在包含IL-2之第一細胞培養基中培養約3天來獲得及/或接受來自該腫瘤樣品之第一TIL群體，該腫瘤樣品係由來自個體中之癌症之腫瘤之一或多次小型生檢、芯針生檢或穿刺生檢獲得；

(b) 藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該啟始第一擴增係在包含第一透氣表面區域之容器中進行，其中該啟始第一擴增進行約7或8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體之數目大於該第一TIL群體；

(c) 藉由用額外的IL-2、OKT-3及APC補充該第二TIL群體之第二細胞培養基來進行快速第二擴增，以產生第三

TIL群體，其中該快速第二擴增中添加之APC之數目為步驟(b)中添加之APC之數目之至少兩倍，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體，其中該快速第二擴增係在包含第二透氣表面區域之容器中進行；

(d) 收集自步驟(c)獲得之該治療性TIL群體；

(e) 將來自步驟(d)之該所收集之TIL群體轉移至輸注袋；及

(f) 在步驟(e)中之轉移至該輸注袋之前的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項23】一種用於將腫瘤浸潤性淋巴球(TIL)擴增成治療性TIL群體的方法，其包含：

(a) 藉由將腫瘤樣品在包含IL-2之第一細胞培養基中培養約3天來獲得及/或接受來自該腫瘤樣品之第一TIL群體，該腫瘤樣品係由來自個體中之癌症之腫瘤之一或多次小型生檢、芯針生檢或穿刺生檢獲得；

(b) 藉由在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)之第二細胞培養基中培養該第一TIL群體來進行啟始第一擴增，以產生第二TIL群體，其中該啟始第一擴增進行約7或8天之第一時段以獲得該第二TIL群體，其中該第二TIL群體之數目大於該第一TIL群體；

(c) 藉由使該第二TIL群體與包含IL-2、OKT-3及APC之第三細胞培養基接觸來進行快速第二擴增，以產生第三

TIL群體，其中該快速第二擴增進行約11天之第二時段以獲得該第三TIL群體，其中該第三TIL群體為治療性TIL群體；

(d) 收集自步驟(c)獲得之該治療性TIL群體；及

(e) 在步驟(d)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一、第二或第三TIL群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之TIL。

【請求項24】如請求項1至18及21至23中任一項之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、由人類乳頭狀瘤病毒引起之癌症、頭頸癌(包括頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。

【請求項25】一種擴增T細胞之方法，其包含：

(a) 藉由培養第一T細胞群體以實現生長及啟始該第一T細胞群體之活化來進行自供體獲得之該第一T細胞群體之啟始第一擴增；

(b) 在步驟(a)中啟始之該第一T細胞群體之活化開始衰減之後，藉由培養該第一T細胞群體以實現生長及增強該第一T細胞群體之活化來進行該第一T細胞群體之快速第二擴增，以獲得第二T細胞群體；

(c) 收集該第二T細胞群體；及

(d) 在步驟(c)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一或第二T細胞群體之一部分，以產生各自包含與其

表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之T細胞。

【請求項26】一種擴增T細胞之方法，其包含：

(a) 藉由培養第一T細胞群體以實現生長及啟始該第一T細胞群體之活化來進行來自腫瘤樣品之該第一T細胞群體之啟始第一擴增，該腫瘤樣品係由供體中之腫瘤之一或多次小型生檢、芯針生檢或穿刺生檢獲得；

(b) 在步驟(a)中啟始之該第一T細胞群體之活化開始衰減之後，藉由培養該第一T細胞群體以實現生長及增強該第一T細胞群體之活化來進行該第一T細胞群體之快速第二擴增，以獲得第二T細胞群體；

(c) 收集該第二T細胞群體；及

(d) 在步驟(e)中之該收集之前或之後的任何時間修飾該第一或第二T細胞群體之一部分，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之T細胞。

【請求項27】一種用於擴增來自周邊血液之周邊血液淋巴球(PBL)之方法，該方法包含以下步驟：

(a) 獲得來自患者之周邊血液之周邊血液單核細胞(PBMC)之樣品；

(b) 將該等PBMC在包含第一細胞培養基之培養物中培養選自由以下組成之群的時段：約9天、約10天、約11天、約12天、約13天及約14天，該第一細胞培養基具有IL-2、抗CD3/抗CD28抗體及第一抗生素組合，藉此實現來自該等PBMC之周邊血液淋巴球(PBL)之擴增；

(c) 自步驟(b)中之該培養物收集該等PBL；及

(d) 在步驟(c)中之該收集之前或之後的任何時間修飾一部分該等PBL，以產生各自包含與其表面膜結合之免疫調節組合物的經修飾之PBL。

【請求項28】如請求項27之方法，其中該患者預先用依魯替尼(ibrutinib)或另一種介白素-2誘導性T細胞激酶(ITK)抑制劑治療。

【請求項29】如請求項27或28之方法，其中該患者難以用依魯替尼或另一ITK抑制劑治療。

【請求項30】如請求項1至29中任一項之方法，其中該免疫調節組合物包含一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。

【請求項31】如請求項30之方法，其中該一或多種免疫調節劑包含一或多種細胞介素。

【請求項32】如請求項31之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。

【請求項33】如請求項32之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-12或其變異體。

【請求項34】如請求項33之方法，其中該IL-12包含連接至人類IL-12 p40子單元之人類IL-12 p35子單元。

【請求項35】如請求項34之方法，其中該人類IL-12 p35子單元具有SEQ ID NO:247之胺基酸序列且該人類IL-12 p40子單元具有SEQ ID NO:248之胺基酸序列。

【請求項36】如請求項32之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。

【請求項37】如請求項36之方法，其中該IL-15為人類IL-15。

【請求項38】如請求項37之方法，其中該人類IL-15具有SEQ ID NO:258之胺基酸序列。

【請求項39】如請求項32之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體。

【請求項40】如請求項39之方法，其中該IL-18為人類IL-18。

【請求項41】如請求項40之方法，其中該人類IL-18具有SEQ ID NO:269、270及331-385中之任一者之胺基酸序列。

【請求項42】如請求項32之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。

【請求項43】如請求項42之方法，其中該IL-21為人類IL-21。

【請求項44】如請求項43之方法，其中該人類IL-21具有SEQ ID NO:271之胺基酸序列。

【請求項45】如請求項30之方法，其中該一或多種免疫調節劑包含CD40促效劑。

【請求項46】如請求項45之方法，其中該CD40促效劑為抗CD40結合域或CD40L。

【請求項47】如請求項46之方法，其中該CD40促效

劑為包含可變重鏈域(VH)及可變輕鏈域(VL)之CD40結合域。

【請求項48】如請求項47之方法，其中該CD40結合域之VH及VL係選自以下：

a. 具有SEQ ID NO:274之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:275之胺基酸序列之VL；

b. 具有SEQ ID NO:277之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:278之胺基酸序列之VL；

c. 具有SEQ ID NO:280之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:281之胺基酸序列之VL；及

d. 具有SEQ ID NO:283之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:284之胺基酸序列之VL。

【請求項49】如請求項47或48之方法，其中該CD40結合域為scFv。

【請求項50】如請求項46之方法，其中該CD40促效劑為具有SEQ ID NO:273之胺基酸序列之人類CD40L。

【請求項51】如請求項30至50中任一項之方法，其中自N端至C端，該膜之錨定免疫調節融合蛋白質係根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。

【請求項52】如請求項51之方法，其中該細胞膜錨部分包含CD8a跨膜-細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。

【請求項53】如請求項52之方法，其中該細胞膜錨部

分包含B7-1跨膜域。

【請求項54】如請求項53之方法，其中該細胞膜錨部分具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【請求項55】如請求項30至54中任一項之方法，其中該免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其中該等不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質中之每一者各自包含不同的免疫調節劑。

【請求項56】如請求項55之方法，其中該等不同的免疫調節劑係選自：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體，及CD40促效劑。

【請求項57】如請求項56之方法，其中該等不同的免疫調節劑係選自：IL-12及IL-15、IL-15及IL-18、CD40L及IL-15、IL-15及IL-21、IL-2及IL-12及其變異體。

【請求項58】如請求項30至57中任一項之方法，其中該修飾包含將編碼該融合蛋白質之異源核酸引入該部分TIL中且在該等經修飾之TIL之表面上表現該融合蛋白質。

【請求項59】如請求項58之方法，其中該異源核酸包含腺病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺相關載體(AAV)或piggyBac轉位子。

【請求項60】如請求項58或59之方法，其中該異源核酸包含NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子。

【請求項61】如請求項1至29中任一項之方法，其中

免疫調節組合物包含融合蛋白質，其包含一或多種連接至TIL表面抗原結合域之免疫調節劑。

【請求項62】如請求項61之方法，其中該一或多種免疫調節劑包含一或多種細胞介素。

【請求項63】如請求項62之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。

【請求項64】如請求項63之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-12或其變異體。

【請求項65】如請求項63之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。

【請求項66】如請求項63之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。

【請求項67】如請求項63之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體。

【請求項68】如請求項67之方法，其中該一或多種細胞介素包含DR-IL-18。

【請求項69】如請求項61至68中任一項之方法，其中該TIL表面抗原結合域包含抗體可變重鏈域及可變輕鏈域。

【請求項70】如請求項61至69中任一項之方法，其中該TIL表面抗原結合域包含抗體或其片段。

【請求項71】如請求項43至50中任一項之方法，其中

該TIL表面抗原結合域對以下TIL表面抗原中之一或多者呈現親和力：CD45、CD4、CD8、CD3、CD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD25、CD127、CD19、CD20、CD22、HLA-DR、CD197、CD38、CD27、CD196、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CD84、CD229、CCR1、CCR5、CCR4、CCR6、CCR8、CCR10、CD16、CD56、CD137、OX40或GITR。

【請求項72】如請求項61至71中任一項之方法，其中該修飾包含將該融合蛋白質與該部分TIL一起在允許該融合蛋白質與該部分TIL結合之條件下培育。

【請求項73】如請求項1至29中任一項之方法，其中免疫調節組合物包含奈米粒子，其包含複數種免疫調節劑。

【請求項74】如請求項73之方法，其中該複數種免疫調節劑藉由可降解連接子共價連接在一起。

【請求項75】如請求項74之方法，其中該奈米粒子在該奈米粒子表面上包含至少一種聚合物、陽離子性聚合物或陽離子性嵌段共聚物。

【請求項76】如請求項73至75中任一項之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。

【請求項77】如請求項76之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-12或其變異體。

【請求項78】如請求項76之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。

【請求項79】如請求項76之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。

【請求項80】如請求項76之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體。

【請求項81】如請求項80之方法，其中該一或多種細胞介素包含DR-IL-18。

【請求項82】如請求項73至81中任一項之方法，其中該奈米粒子為脂質體、蛋白質奈米凝膠、核苷酸奈米凝膠、聚合物奈米粒子或固體奈米粒子。

【請求項83】如請求項82之方法，其中該奈米粒子為奈米凝膠。

【請求項84】如請求項73至83中任一項之方法，其中該奈米粒子進一步包含結合於以下抗原中之一或多者之抗原結合域：CD45、CD11a(整合素α-L)、CD18(整合素β-2)、CD11b、CD11c、CD25、CD8或CD4。

【請求項85】如請求項73至81中任一項之方法，其中該修飾包含將該免疫調節組合物連接至該部分TIL之表面。

【請求項86】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中對來自該第一擴增之TIL或來自該第二擴增之TIL或其兩者進行該修飾。

【請求項87】如請求項6至8或14至23中任一項之方

法，其中對來自該啟始第一擴增之TIL或來自該快速第二擴增之TIL或其兩者進行該修飾。

【請求項88】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中在該第一擴增之後且在該第二擴增之前進行該修飾。

【請求項89】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中在該啟始第一擴增之後且在該快速第二擴增之前或在此兩個時間點時進行該修飾。

【請求項90】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中在該第二擴增之後進行該修飾。

【請求項91】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中在該快速第二擴增之後進行該修飾。

【請求項92】如請求項2至72中任一項之方法，其中在該收集之後進行該修飾。

【請求項93】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中該第一擴增進行約11天之時段。

【請求項94】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該啟始第一擴增進行約11天之時段。

【請求項95】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中在該第一擴增中，該IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於該細胞培養基中。

【請求項96】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中在該啟始第一擴增中，該IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在於該細胞培養基中。

【請求項97】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中在該第二擴增步驟中，該IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且該OKT-3抗體係以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【請求項98】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中在該快速第二擴增步驟中，該IL-2係以1000 IU/mL與6000 IU/mL之間的初始濃度存在且該OKT-3抗體係以約30 ng/mL之初始濃度存在。

【請求項99】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中該第一擴增係使用透氣容器進行。

【請求項100】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該啟始第一擴增係使用透氣容器進行。

【請求項101】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中該第二擴增係使用透氣容器進行。

【請求項102】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該快速第二擴增係使用透氣容器進行。

【請求項103】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中該第一擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項104】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該啟始第一擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項105】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中該第二擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項106】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該快速第二擴增之細胞培養基進一步包含選自由以下組成之群之細胞介素：IL-4、IL-7、IL-15、IL-21及其組合。

【請求項107】如請求項1至8中任一項之方法，其進一步包含在向該患者投與該等TIL之前，用非清髓性淋巴球耗減療法治療該患者之步驟。

【請求項108】如請求項107之方法，其中該非清髓性淋巴球耗減療法包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱(fludarabine)持續三天。

【請求項109】如請求項107之方法，其中該非清髓性淋巴球耗減療法包括以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺且以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續三天。

【請求項110】如請求項107之方法，其中該非清髓性淋巴球耗減療法包含以下步驟：以60毫克/平方公尺/天之劑量投與環磷醯胺且以25毫克/平方公尺/天之劑量投與氟達拉濱持續兩天，接著以25毫克/平方公尺/天之劑量投與

氟達拉濱持續一天。

【請求項111】如請求項108至110中任一項之方法，其中該環磷醯胺係與美司鈉(mesna)一起投與。

【請求項112】如請求項1至7或107至111中任一項之方法，其進一步包含在向該患者投與該等TIL之後的第二天開始用IL-2療法治療該患者之步驟。

【請求項113】如請求項1至7或107至111中任一項之方法，其進一步包含在向該患者投與該等TIL之同一天開始用IL-2療法治療該患者之步驟。

【請求項114】如請求項112或113之方法，其中該IL-2方案為包含600,000或720,000 IU/kg之阿地介白素(aldesleukin)或其生物類似物或變異體之高劑量IL-2方案，其係以每八小時一次15分鐘推注型靜脈內輸注形式投與直至耐受。

【請求項115】如請求項1至7或107至114中任一項之方法，其中投與治療有效TIL群體且該群體包含約2.3×10^{10}至約13.7×10^{10}個TIL。

【請求項116】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該啟始第一擴增及快速第二擴增進行21天或更短之時段。

【請求項117】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該啟始第一擴增及快速第二擴增進行16或17天或更短之時段。

【請求項118】如請求項6至8或14至23中任一項之方

法，其中該啟始第一擴增進行7或8天或更短之時段。

【請求項119】如請求項6至8或14至23中任一項之方法，其中該快速第二擴增進行11天或更短之時段。

【請求項120】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，步驟(c)中之該第一擴增及步驟(d)中之該第二擴增係各自單獨地在11天之時段內進行。

【請求項121】如請求項2至5或9至13中任一項之方法，其中步驟(a)至(f)係在約10天至約22天內進行。

【請求項122】如請求項1至121中任一項之方法，其中該等經修飾之TIL進一步包含基因修飾，其引起至少一部分該治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之緘默或降低。

【請求項123】如請求項122之方法，其中該一或多種免疫檢查點基因係選自包含以下之群：PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11及BCOR。

【請求項124】如請求項122之方法，其中該一或多種免疫檢查點基因係選自包含以下之群：PD-1、TIGIT、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFβ及PKA。

【請求項125】如請求項1至124中任一項之方法，其中該等經修飾之TIL進一步包含基因修飾，其引起至少一部分該治療性TIL群體中之一或多種免疫檢查點基因之表現之增強，該一或多種免疫檢查點基因係選自包含以下之群：CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞內域(ICD)及/或NOTCH配位體mDLL1。

【請求項126】如請求項122至125中任一項之方法，其中使用可程式化核酸酶進行該基因修飾，該可程式化核酸酶介導該一或多種免疫檢查點基因處之雙股或單股斷裂之產生。

【請求項127】如請求項122至125中任一項之方法，其中使用一或多種選自以下之方法進行該基因修飾：RNA干擾方法(例如，shRNA)、CRISPR方法、TALE方法、鋅指方法、Cas-CLOVER方法及其組合。

【請求項128】如請求項127之方法，其中使用CRISPR方法進行該基因修飾。

【請求項129】如請求項128之方法，其中該CRISPR方法為CRISPR/Cas9方法。

【請求項130】如請求項127之方法，其中使用TALE

方法進行基因修飾。

【請求項131】如請求項127之方法，其中使用鋅指方法進行該基因修飾。

【請求項132】如請求項1至23或86至121中任一項之方法，其中該等經修飾之TIL在細胞表面上暫時表現該免疫調節組合物。

【請求項133】如請求項132之方法，其中該免疫調節組合物包含一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其中各融合蛋白質包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。

【請求項134】如請求項127之方法，其中該基因修飾係使用RNA干擾方法(例如，shRNA)產生。

【請求項135】如請求項134之方法，其中該一或多種免疫調節劑包含一或多種細胞介素。

【請求項136】如請求項135之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體中之一或多者。

【請求項137】如請求項136之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-2或其變異體。

【請求項138】如請求項137之方法，其中該IL-2為人類IL-2。

【請求項139】如請求項138之方法，其中該人類IL-2具有SEQ ID NO:272之胺基酸序列。

【請求項140】如請求項136之方法，其中該一或多種

細胞介素包含IL-12或其變異體。

【請求項141】如請求項140之方法，其中該IL-12包含連接至人類IL-12 p40子單元之人類IL-12 p35子單元。

【請求項142】如請求項141之方法，其中該人類IL-12 p35子單元具有SEQ ID NO:267之胺基酸序列且該人類IL-12 p40子單元具有SEQ ID NO:268之胺基酸序列。

【請求項143】如請求項136之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-15或其變異體。

【請求項144】如請求項143之方法，其中該IL-15為人類IL-15。

【請求項145】如請求項144之方法，其中該人類IL-15具有SEQ ID NO:258之胺基酸序列。

【請求項146】如請求項136之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-18或其變異體。

【請求項147】如請求項146之方法，其中該IL-18為人類IL-18。

【請求項148】如請求項147之方法，其中該人類IL-18具有SEQ ID NO:269、270及331-385中之任一者之胺基酸序列。

【請求項149】如請求項136之方法，其中該一或多種細胞介素包含IL-21或其變異體。

【請求項150】如請求項149之方法，其中該IL-21為人類IL-21。

【請求項151】如請求項150之方法，其中該人類IL-

21具有SEQ ID NO:271之胺基酸序列。

【請求項152】如請求項134之方法，其中該一或多種免疫調節劑包含CD40促效劑。

【請求項153】如請求項152之方法，其中該CD40促效劑為抗CD40結合域或CD40L。

【請求項154】如請求項153之方法，其中該CD40促效劑為包含可變重鏈域(VH)及可變輕鏈域(VL)之CD40結合域。

【請求項155】如請求項154之方法，其中該CD40結合域之VH及VL係選自以下：

a. 具有SEQ ID NO:274之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:275之胺基酸序列之VL；

b. 具有SEQ ID NO:277之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:278之胺基酸序列之VL；

c. 具有SEQ ID NO:280之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:281之胺基酸序列之VL；及

d. 具有SEQ ID NO:283之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:284之胺基酸序列之VL。

【請求項156】如請求項154或155之方法，其中該CD40結合域為scFv。

【請求項157】如請求項152之方法，其中該CD40促效劑為具有SEQ ID NO:273之胺基酸序列之人類CD40L。

【請求項158】如請求項134至157中任一項之方法，其中自N端至C端，該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋

白質係獨立地根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。

【請求項159】如請求項134至158中任一項之方法，其中該細胞膜錨部分包含CD8a跨膜-細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。

【請求項160】如請求項159之方法，其中該細胞膜錨部分包含B7-1跨膜域。

【請求項161】如請求項160之方法，其中該細胞膜錨部分具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【請求項162】如請求項134至161中任一項之方法，其中該免疫調節組合物包含兩種或更多種不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其中該等不同的膜錨定之免疫調節融合蛋白質中之每一者各自包含不同的免疫調節劑。

【請求項163】如請求項162之方法，其中該等不同的免疫調節劑係選自：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體，及CD40促效劑。

【請求項164】如請求項163之方法，其中該等不同的免疫調節劑係選自：IL-12及IL-15、IL-15及IL-18、CD40L及IL-15、IL-15及IL-21，以及IL-2及IL-12。

【請求項165】如請求項134至164中任一項之方法，其中該修飾包含將編碼該融合蛋白質之異源核酸引入該部分TIL中且在該等經修飾之TIL之表面上表現該融合蛋白質。

【請求項166】如請求項165之方法，其中該異源核酸包含腺病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺相關載體(AAV)或piggyBac轉位子。

【請求項167】如請求項165或166之方法，其中該異源核酸包含NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子。

【請求項168】如請求項134至167中任一項之方法，其中該等經修飾之TIL係藉由用編碼該融合蛋白質之核酸轉染該等TIL來修飾。

【請求項169】如請求項168之方法，其中該核酸為RNA。

【請求項170】如請求項169之方法，其中該RNA為mRNA。

【請求項171】如請求項170之方法，其中藉由電致孔來用該mRNA轉染該等TIL。

【請求項172】如請求項171之方法，其中在該第一擴增之後且在該第二擴增之前，藉由電致孔來用該mRNA轉染該等TIL。

【請求項173】如請求項171之方法，其中在該第一擴增之前，藉由電致孔來用該mRNA轉染該等TIL。

【請求項174】如請求項168之方法，其中藉由使用微流體裝置暫時破壞該等TIL之細胞膜，藉此實現該核酸之轉染而用該編碼融合蛋白質之核酸轉染該等經修飾之TIL。

【請求項175】如請求項171至174中任一項之方法，其中該方法進一步包含藉由在用該mRNA轉染該等TIL之前與抗CD3促效劑一起培育來活化該等TIL。

【請求項176】如請求項175之方法，其中該抗CD3促效劑為OKT-3。

【請求項177】如請求項175或176之方法，其中藉由在用該mRNA轉染該等TIL之前，將該等TIL與該抗CD3促效劑一起培育約1至3天來活化該等TIL。

【請求項178】一種組合物，其包含如請求項1至177及180至225中任一項之經修飾之TIL。

【請求項179】一種醫藥組合物，其包含如請求項1至177及180至225中任一項之經修飾之TIL及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項180】如請求項30至60及134至179中任一項之方法，其中自N端至C端，該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S1-IA1-L1-C1-L2-S2-IA2-L3-C2，其中S1及S2各自獨立地為信號肽，IA1及IA2各自獨立地為免疫調節劑，L1-L3各自獨立地為連接子，且C1及C2各自獨立地為細胞膜錨部分。

【請求項181】如請求項179之方法，其中S1與S2係相同的。

【請求項182】如請求項180或181之方法，其中C1與C2係相同的。

【請求項183】如請求項180至182中任一項之方法，

其中L2為可裂解連接子。

【請求項184】如請求項183之方法，其中L2為弗林蛋白酶(furin)可裂解連接子。

【請求項185】如請求項180至184中任一項之方法，其中IA1及IA2各自獨立地為細胞介素。

【請求項186】如請求項180至184中任一項之方法，其中IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。

【請求項187】如請求項180至184中任一項之方法，其中IA1及IA2係各自獨立地選自由IL-2及IL-12組成之群，限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-2且另一者為IL-12。

【請求項188】如請求項180至184中任一項之方法，其中IA1及IA2係各自獨立地選自由IL-15及IL-21組成之群，限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-15且另一者為IL-21。

【請求項189】如請求項1至177或180至188中任一項之方法，其中該等經修飾之TIL經基因修飾以在細胞表面上表現該免疫調節組合物。

【請求項190】如請求項189之方法，其中該免疫調節組合物包含一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質，其各自包含一或多種免疫調節劑及細胞膜錨部分。

【請求項191】如請求項190之方法，其中該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-2或其變異體。

【請求項192】如請求項190之方法，其中該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-15或其變異體。

【請求項193】如請求項190之方法，其中該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-18或其變異體。

【請求項194】如請求項190之方法，其中該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含DR-IL-18。

【請求項195】如請求項190之方法，其中該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-21或其變異體。

【請求項196】如請求項190之方法，其中該等經修飾之TIL包含第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質及第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【請求項197】如請求項196之方法，其中該第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-15或其變異體且該第二膜錨定之免疫調節融合蛋白質包含IL-21或其變異體。

【請求項198】如請求項196或197之方法，其中由該等經修飾之TIL中之NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子控制該第一膜錨定之免疫調節融合蛋白質及該第二免疫調節融合蛋白質之表現。

【請求項199】如請求項190之方法，其中自N端至C端，該一或多種膜之錨定免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S-IA-L-C，其中S為信號肽，IA為免疫調節劑，L為連接子且C為細胞膜錨部分。

【請求項200】如請求項199之方法，其中IA為細胞介素。

【請求項201】如請求項199之方法，其中IA係選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。

【請求項202】如請求項199之方法，其中IA為IL-2或其變異體。

【請求項203】如請求項199之方法，其中IA為IL-12或其變異體。

【請求項204】如請求項199之方法，其中IA為IL-15或其變異體。

【請求項205】如請求項199之方法，其中IA為IL-18或其變異體。

【請求項206】如請求項199之方法，其中IA為DR-IL-18。

【請求項207】如請求項199之方法，其中IA為IL-21或其變異體。

【請求項208】如請求項199至207中任一項之方法，其中L為CD8a跨膜-細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。

【請求項209】如請求項199至207中任一項之方法，其中L為B7-1跨膜域。

【請求項210】如請求項199至207中任一項之方法，

其中L具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【請求項211】如請求項190之方法，其中自N端至C端，該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質係獨立地根據下式：S1-IA1-L1-C1-L2-S2-IA2-L3-C2，其中S1及S2各自獨立地為信號肽，IA1及IA2各自獨立地為免疫調節劑，L1-L3各自獨立地為連接子，且C1及C2各自獨立地為細胞膜錨部分。

【請求項212】如請求項211之方法，其中S1與S2係相同的。

【請求項213】如請求項211或212之方法，其中C1與C2係相同的。

【請求項214】如請求項211至213中任一項之方法，其中L2為可裂解連接子。

【請求項215】如請求項214之方法，其中L2為弗林蛋白酶可裂解連接子。

【請求項216】如請求項211至215中任一項之方法，其中IA1及IA2各自獨立地為細胞介素。

【請求項217】如請求項211至216中任一項之方法，其中IA1及IA2係各自獨立地選自由以下組成之群：IL-2、IL-6、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFNγ、TNFa、IFNα、IFNβ、GM-CSF、GCSF或其變異體。

【請求項218】如請求項211至216中任一項之方法，其中IA1及IA2係各自獨立地選自由IL-2及IL-12組成之

群，限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-2且另一者為IL-12。

【請求項219】如請求項211至216中任一項之方法，其中IA1及IA2係各自獨立地選自由IL-15及IL-21組成之群，限制條件為IA1及IA2中之一者為IL-15且另一者為IL-21。

【請求項220】如請求項211至219中任一項之方法，其中C1及C2各自獨立地為CD8a跨膜-細胞內域、B7-1跨膜域、B7-2跨膜域或CD8a跨膜域。

【請求項221】如請求項211至219中任一項之方法，其中C1及C2各自為B7-1跨膜域。

【請求項222】如請求項211至219中任一項之方法，其中C1及C2各自具有SEQ ID NO:239之胺基酸序列。

【請求項223】如請求項190至222中任一項之方法，其中該等經修飾之TIL在NFAT啟動子、EF-1a啟動子、MND啟動子或SSFV啟動子之控制下表現該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【請求項224】如請求項190至223中任一項之方法，其中用反轉錄病毒載體轉導該等經修飾之TIL以表現該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【請求項225】如請求項190至223中任一項之方法，其中用腺病毒載體、反轉錄病毒載體、慢病毒載體、腺相關載體(AAV)或piggyBac轉位子轉導該等經修飾之TIL以表現該一或多種膜錨定之免疫調節融合蛋白質。

【發明名稱】

【摘要】本發明係關於一種[redacted]

1. 步驟A

選取用於前述樣品

2. 步驟B

片段化該第一基因3'末端10次

3. 步驟C

第一探針包含：探針之
單鏈核酸序及標記系統

4. 步驟D

第二探針
IL-2、OKT-3及抗CD3單株抗體細胞
標記系統

5. 步驟E

「[redacted]步驟D取得[redacted]
標記系統

6. 步驟F

[redacted]
(視情況)冷凍保存)

【圖1】

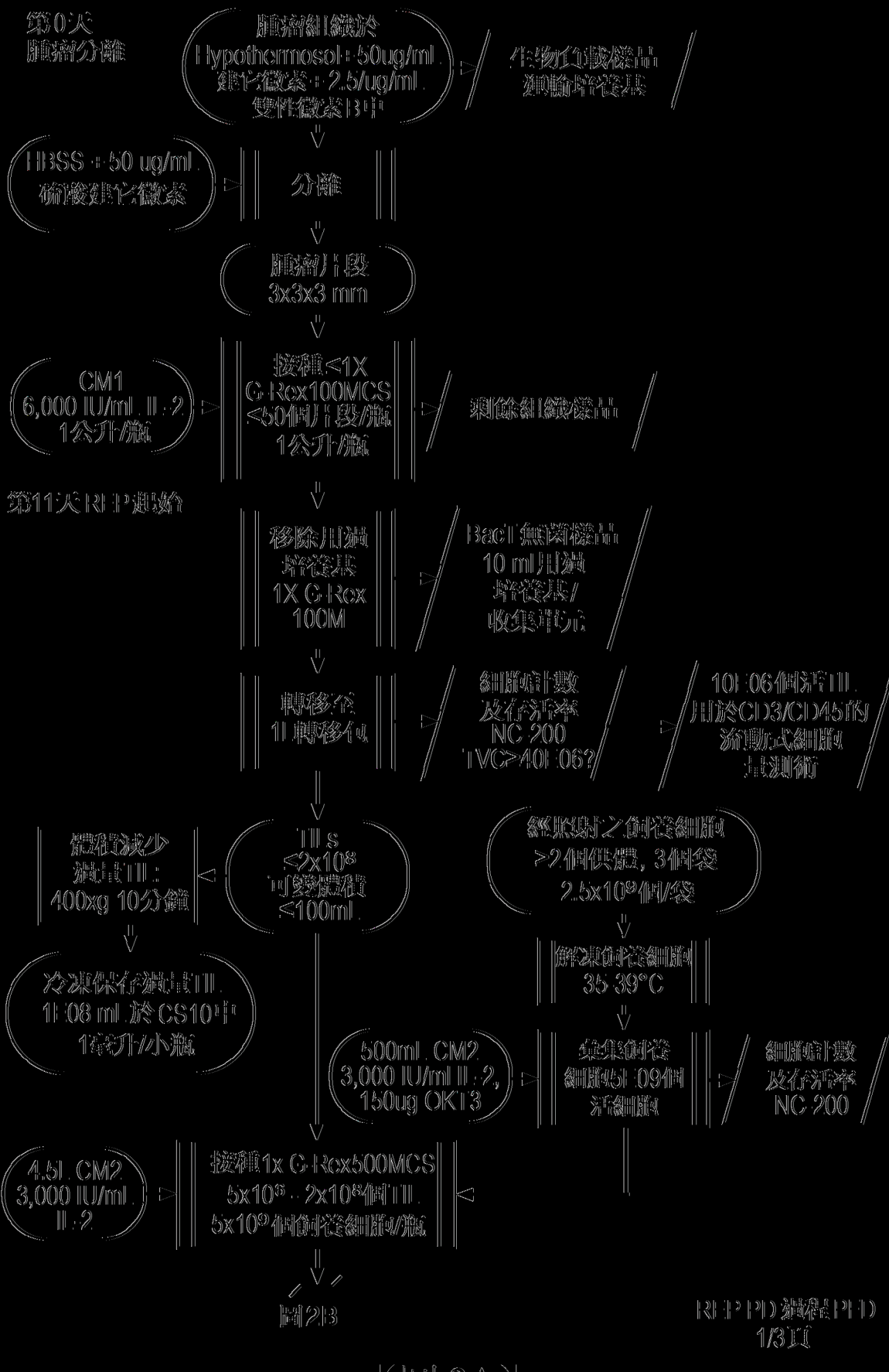
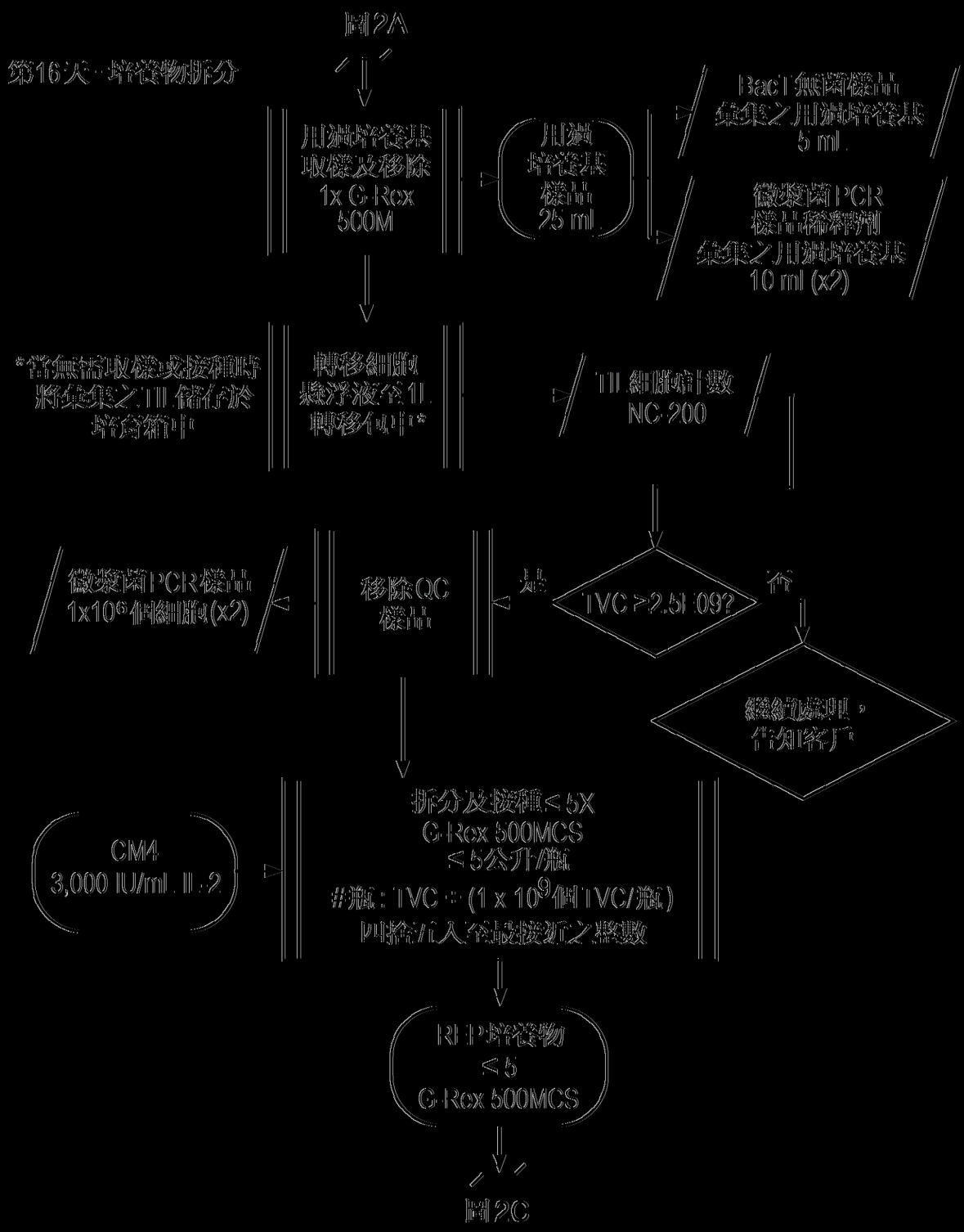
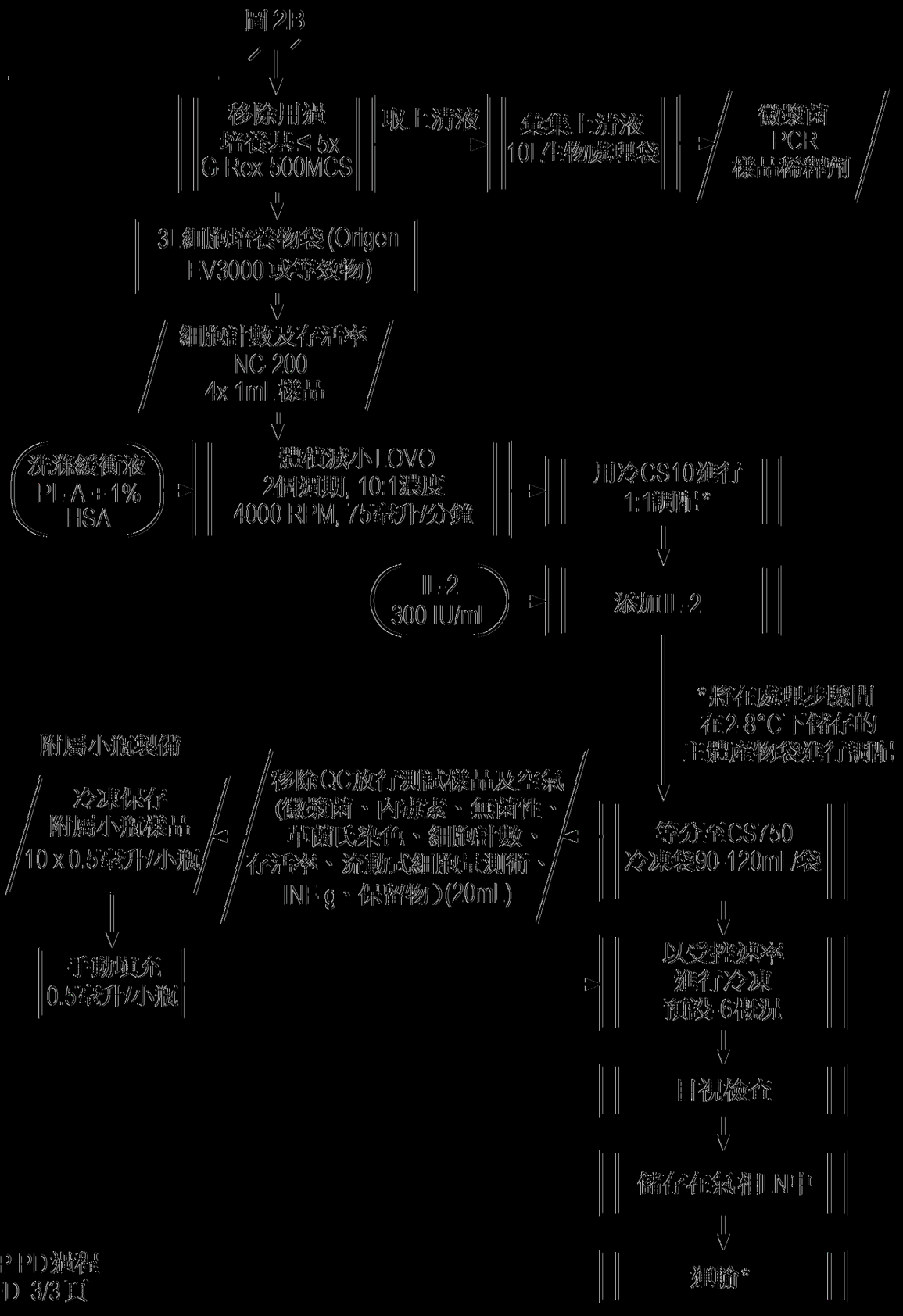

第0天
腫瘤分離
腫瘤組織於
Hypothermosol+50ug/ml
慶大黴素+2.5/ug/ml
雙性黴素B中
生物負載樣品
運輸培養基
HBSS+50 ug/ml
硫酸慶大黴素
分離
腫瘤片段
3x3x3 mm
CM1
6,000 IU/ml IL-2
1公升/瓶
接種<1X
G-Rex100MCS
<50個片段/瓶
1公升/瓶
剩餘組織樣品
第11天REP起始
移除用過
培養基
1X G-Rex
100M
Bact無菌樣品
10 ml用過
培養基/
收集管
轉移至
II轉移袋
細胞計數
及存活率
NC 200
TVC>40E06?
10E06個活TIL
用於CD3/CD45的
流動式細胞
量測術
TIL s
<2x10⁸
可變體積
<100ml
震盪減少
減量TIL
400xg 10分鐘
經照射之飼養細胞
>2個供體, 3個袋
2.5x10⁹個/袋
冷凍保存減量TIL
1E08 ml 於CS10中
1毫升/小瓶
解凍飼養細胞
35-39°C
500ml CM2
3,000 IU/ml IL-2,
150ug OKT3
集集飼養
細胞5E09個
活細胞
細胞計數
及存活率
NC 200
4.5l CM2
3,000 IU/ml
IL-2
接種1x G-Rex500MCS
5x10⁶ - 2x10⁸個TIL
5x10⁹個飼養細胞/瓶
圖2B
REP PD滿足PED
1/3T

圖 2A



REP PD減程
PD 2/3 頁

(圖 2B)


圖2B
移除用過
培養基< 5x
G-Rex 500MCS
取上清液
集集上清液
10l 生物處理袋
微生物
PCR
樣品稀釋劑
3l 細胞培養物袋 (Origen
IV3000 或等效物)
細胞計數及存活率
NC 200
4x 1ml 樣品
洗滌緩衝液
PI-A + 1%
HSA
體積減小 LOVO
2個週期, 10:1濃度
4000 RPM, 75毫升/分鐘
用冷CS10進行
1:1調配*
IL-2
300 IU/ml
添加IL-2
*將在處理步驟間
在2-8°C下儲存的
主體袋物袋進行調配
附屬小瓶製備
冷凍保存
附屬小瓶樣品
10 x 0.5毫升/小瓶
手動填充
0.5毫升/小瓶
移除QC放行測試樣品及空氣
(微生物、內毒素、無菌性、
革蘭氏染色、細胞計數、
存活率、流動式細胞計測術、
INF-g、保留物)(20ml)
等分至CS750
冷凍袋90-120ml/袋
以受控速率
進行冷凍
直接 6個孔
目視檢查
儲存在氣相LN2
運輸*
REPPD調整
PED 3/3頁

(圖 2C)

第三圖

圖 7
CMP 製造商 A
CMP 製造商 B
CMP 製造商 C
CMP 製造商 D
CMP 製造商 E
CMP 製造商 F
CMP 製造商 G
CMP 製造商 H
CMP 製造商 I
CMP 製造商 J
CMP 製造商 K
CMP 製造商 L
CMP 製造商 M
CMP 製造商 N
CMP 製造商 O
CMP 製造商 P
CMP 製造商 Q
CMP 製造商 R
CMP 製造商 S
CMP 製造商 T
CMP 製造商 U
CMP 製造商 V
CMP 製造商 W
CMP 製造商 X
CMP 製造商 Y
CMP 製造商 Z


流程1C：步驟A、C持續13-55天
1. 步驟A
獲得患者腫瘤樣品
2. 步驟B)
片段化及第一擴增11天至21天
3. 步驟C
第一擴增至第二擴增之轉變
視情況儲存自它選擇
4. 步驟D)
第二擴增
IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞
視情況重複一或多次
5. 步驟E
自步驟D收集TIL
6. 步驟F
最終調配及/或轉移至輸注袋
流程2A：步驟A、C持續約22天
1. 步驟A
獲得患者腫瘤樣品
2. 步驟B)
片段化及第一擴增3天至14天
3. 步驟C
第一擴增至第二擴增之轉變
無儲存及密閉系統
4. 步驟D)
第二擴增
IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞
密閉系統
5. 步驟E
自步驟D收集TIL
密閉系統
6. 步驟F
最終調配及/或轉移至輸注袋
(視情況冷凍保存)

圖5

製程步驟	製程1C實施例	製程2A實施例	優勢
預REP	○ 每10個GREX-10瓶4個片段 ○ 11-21天特定時間	○ 每1個GREX-100M瓶40個片段 ○ 11天特定時間	○ 每個瓶頭時片段增加 ○ 培養時間縮短 ○ 步驟數減少 ○ 適用於密閉系統
預REP至REP之轉變	○ 冷凍預REP TIL作全基因表現剖分析以供選擇，隨後解凍以進行至REP (約第30天) ○ REP擴增 >40×10⁹個TIL	○ 在第11天預REP TIL直接移至REP ○ REP擴增25-200×10⁹個TIL	○ 預REP至REP製程縮短 ○ 步驟數減少 ○ 消除表現剖分析選擇 ○ 適用於密閉系統
REP	○ 在REP第0天6個GREX-100M瓶 ○ 在REP第0天每個瓶5×10⁸個TIL及5×10⁸個PBMC餵養細胞 ○ 在REP第7天拆分為18-36個瓶 ○ 14天特定時間	○ 在第11天1個GREX-500M瓶 ○ 在第11天25-200×10⁹個TIL及5×10⁹個PBMC餵養細胞 ○ 在第16天拆分為≤6個GREX-500M瓶 ○ 11天特定時間	○ 步驟數減少 ○ REP特定時間縮短 ○ TIL在瓶間之密閉系統轉移 ○ 密閉系統培養基更換
收集	○ 經由離心收集TIL	○ 經由LOVO自動細胞洗滌系統收集TIL	○ 步驟數減少 ○ 自動細胞洗滌 ○ 密閉系統 ○ 洗滌期間產物損失減少
最終調配	○ 新鮮產物於Dyspothermosol中 ○ 單個輸注袋 ○ 有限運輸穩定性	○ 冷凍保存產物於PlasmaLyte A +1% HSA及CS10中，儲存於LN₂中 ○ 多個等分試樣 ○ 較長運輸穩定性	○ 運輸靈活性 ○ 靈活的患者排期 ○ 更及時的放行測試
整體療法之製程時間	○ 43-56天	○ 22天	○ 更快地周轉給患者

圖 6

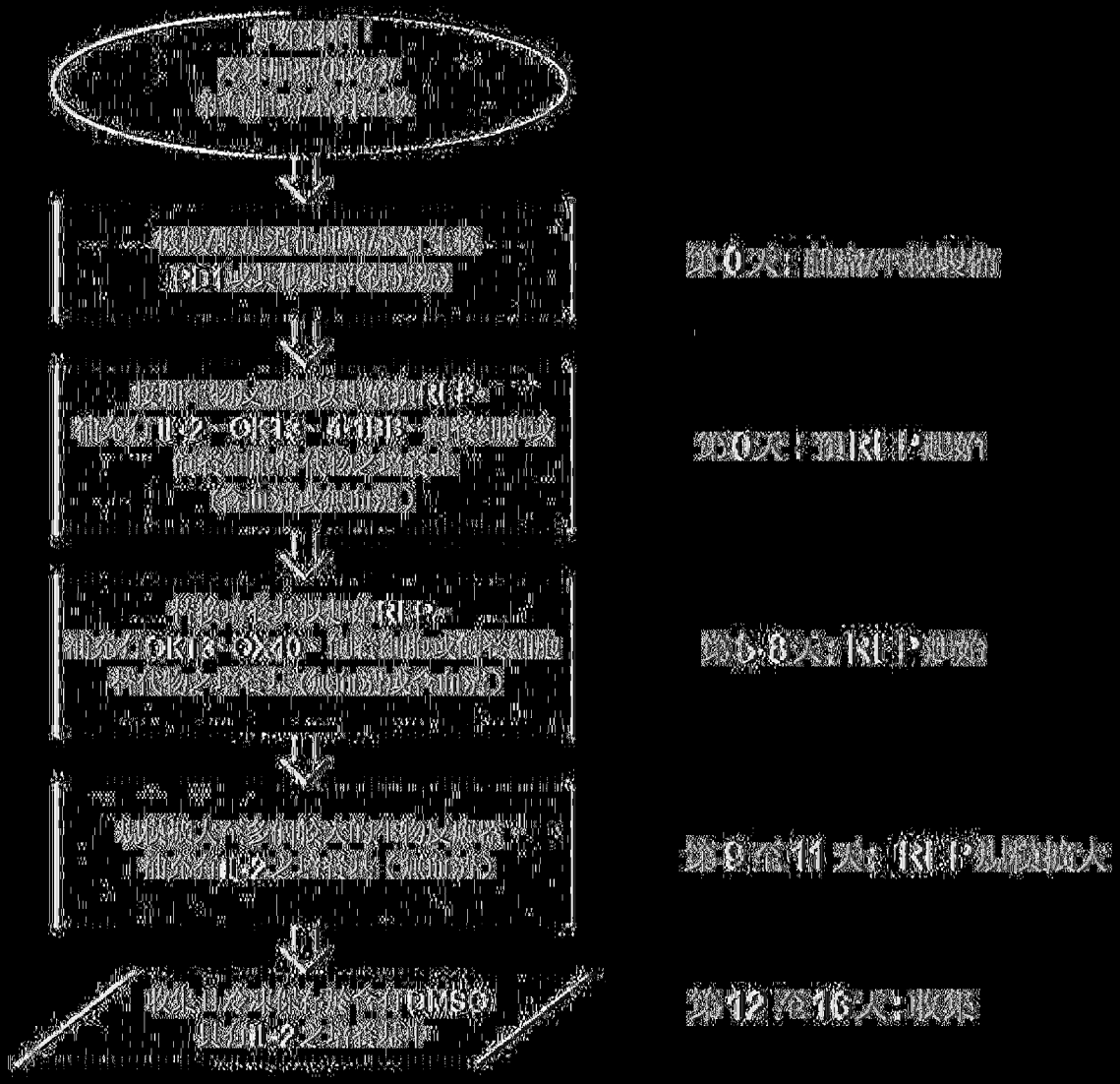


圖 7

步驟2A(Gen 2: 步驟A-E共計約22天)	步驟3A(Gen 3: 步驟A-E共計約14-18天)
步驟A 獲得患者腫瘤樣品 （視情況可在步驟B之前冷凍）	步驟A 獲得患者腫瘤樣品 （視情況可在步驟B之前冷凍）
步驟B 第一擴增 （物理片段化至每個容器中至少40個片段， 用包含IL-2之培養液生長約3天至14天）	步驟B 初始第一擴增 （物理片段化至每個容器中至多60個片段， 用包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之 培養液生長約1天至7天）
步驟C 第一擴增至第二擴增之轉變 （步驟B TIL直接移至步驟D， 視情況在步驟B第11天）	步驟C 初始第一擴增至快速第二擴增之轉變 （步驟B TIL在第7天直接移至步驟D）
步驟D 第二擴增 （TIL於密閉容器中生長在包含 IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之 生長培養基中）	步驟D 快速第二擴增 （TIL生長在包含IL-2、OKT-3及2X 抗原呈現飼養細胞之生長培養基中； 第10-11天規模擴大且添加額外IL-2）
步驟E 自步驟D收集TIL （經由密閉系統收集TIL）	步驟E 自步驟D收集TIL
步驟F 最終製劑及分裝轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟F 最終製劑及分裝轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）

圖 8A

過程 Gen 3：步驟A 10持續約14-18 天

步驟A

獲得患者腫瘤樣品

（視情況可在步驟B之前冷凍）

步驟B

初始第一擴增

(物理片段化至每個容器中至多60個片段，用含 IL-2、OKT-3 及抗原呈現飼養細胞之培養基生長約1天至7天）

步驟C

初始第一擴增至快速第二擴增之轉變

(步驟B TIL在第7天直接移至步驟D)

步驟D

快速第二擴增

(TIL生長在含 IL-2、OKT-3 及2X 抗原呈現飼養細胞之生長培養基中；第10-11天規模擴大且添加額外IL-2)

步驟E

自步驟D收集TIL

步驟F

最終調配及向臨床端注藥

(視情況冷凍保存)

|(圖 8B)|

實施例 Gen 3.0： 步驟 A－E持續約14-18天	實施例 Gen 3.1 對照： 步驟 A－E約14-18天	實施例 Gen 3.1 測試 #： 步驟 A－E持續約14-18天
步驟 A 獲得患者腫瘤樣品 （視情況可在步驟B之前冷凍）	步驟 A 獲得患者腫瘤樣品 （視情況可在步驟B之前冷凍）	步驟 A 獲得患者腫瘤樣品 （視情況可在步驟B之前冷凍）
步驟 B 初始第一擴增 （物理切片段作至每個容器中 至多 60 個片段，用包含 IL-2之 培養基作長約1天至7/8 天）	步驟 B 初始第一擴增 （物理切片段作至每個容器中 至多 60 個片段，用包含 IL-2及 OKT-3之培養基作長 約1天至7/8 天）	步驟 B 初始第一擴增 （物理切片段作至每個容器中 至多 60 個片段，用包含 IL-2、 OKT-3及抗原呈現飼養細胞之 培養基作長約1天至7/8 天）
步驟 C 初始第一擴增至 快速第二擴增之轉變 （步驟 B TIL 在第7/8天 直接移至步驟D）	步驟 C 初始第一擴增至 快速第二擴增之轉變 （步驟 B TIL 在第7/8天 直接移至步驟D）	步驟 C 初始第一擴增至 快速第二擴增之轉變 （步驟 B TIL 在第7/8天 直接移至步驟D）
步驟 D 快速第二擴增 （TIL 作長在包含 IL-2、 OKT-3及抗原呈現飼養 細胞之生長培養基中； 第 10-11 天規模擴大 且添加額外 IL-2）	步驟 D 快速第二擴增 （TIL 作長在包含 IL-2、 OKT-3及 2X 抗原呈現 飼養細胞之生長培養基中； 第 10-11 天規模擴大 且添加額外 IL-2）	步驟 D 快速第二擴增 （TIL 作長在包含 IL-2、 OKT-3及 2X 抗原呈現 飼養細胞之生長培養基中； 第 10-11 天規模擴大 且添加額外 IL-2）
步驟 E 自步驟D收集 TIL	步驟 E 自步驟D收集 TIL	步驟 E 自步驟D收集 TIL
步驟 F 最終調配及入或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟 F 最終調配及入或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）	步驟 F 最終調配及入或轉移至輸注袋 （視情況冷凍保存）

|（圖 8C）|

經修改之Gen 2標準程：步驟A－E共計約22天

步驟A
獲得患者腫瘤樣品
(視情況可在步驟B之前冷凍；
視情況腫瘤樣品可為活檢/小型生檢)

步驟B1
起始培養
物理片段化至每個容器中至多60個片多10個活檢/小型生檢，
TIL在包含IL-2之生長培養基中生長3天

步驟B2
初始第一擴增
TIL在包含IL-2、OKT-3及抗原呈現飼養細胞之
生長培養基中生長8天

步驟C
初始第一擴增至快速第二擴增之轉變
(步驟B TIL在第11天直接移至步驟D)

步驟D
快速第二擴增
(體積減小；TIL生長在包含IL-2、OKT-3及50X抗原呈現
飼養細胞之生長培養基中；第16天視需要大口添加額外IL-2)

步驟E
自步驟D收集TIL

步驟F
最終調配及/或轉移至輸注袋
(視情況冷凍保存)

|(圖 8D)|

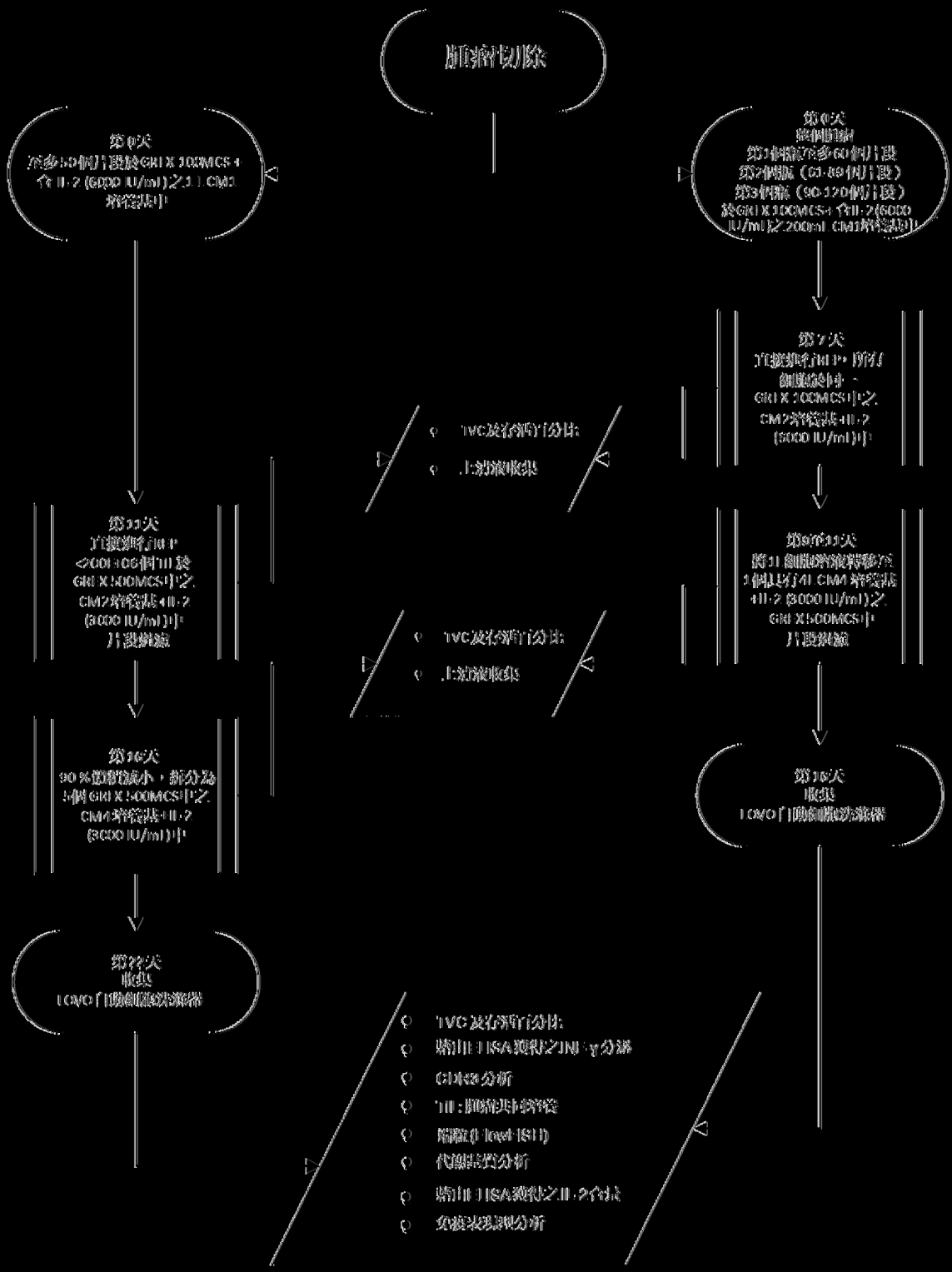

腫瘤切除
第0天
於多50個月發展GRI X 100MCS+
介 II-2 (6000 IU/ml)之21 CM1
培養基中
第0天
做細胞庫
第1個療程多60個月發
第2個療（61-89個月發）
第3個療（90-120個月發）
發GRI X 100MCS+介 II-2(6000
IU/ml)之200ml CM1培養基中
第7天
宜據病理HP，所有
細胞發中，
GRI X 100MCS中之
CM2培養基+II-2
(6000 IU/ml)中
第9/11天
將II 細胞培養轉移至
1個具有 CM4 培養基
+II-2 (6000 IU/ml)之
GRI X 100MCS中
月發擴增
第11天
宜據病理HP
<200+06個 III 發
GRI X 100MCS中之
CM2培養基+II-2
(6000 IU/ml)中
月發擴增
第16天
90 %細胞發小，新分為
3個 GRI X 100MCS中之
CM4培養基+II-2
(6000 IU/ml)中
第16天
收集
LOVO門動細胞發器器
第22天
收集
LOVO門動細胞發器器
TVC發名新行分出:
上清液收集
TVC發名新行分出:
上清液收集
TVC發名新行分出:
篩出HISA類程之NI-γ分泌
CDR3分析
TII:細胞非特異
篩選(Flow-ISH)
代謝組學分析
篩出HISA類程之II-2介素
免疫表現型分析

圖 9

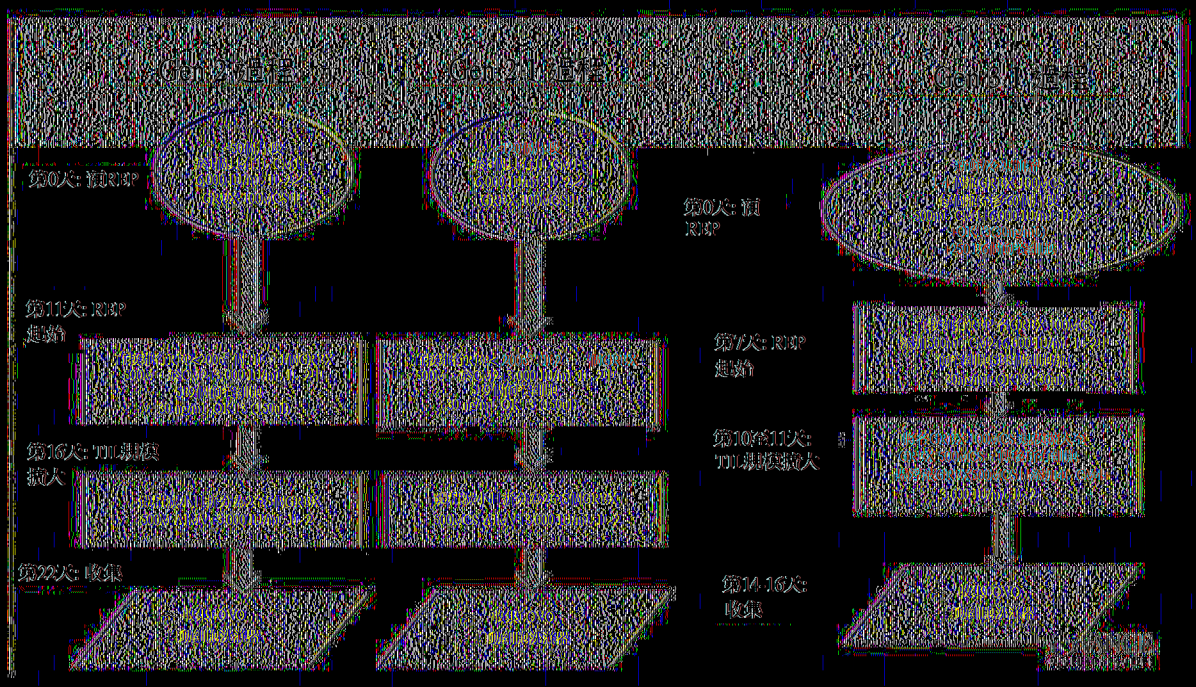
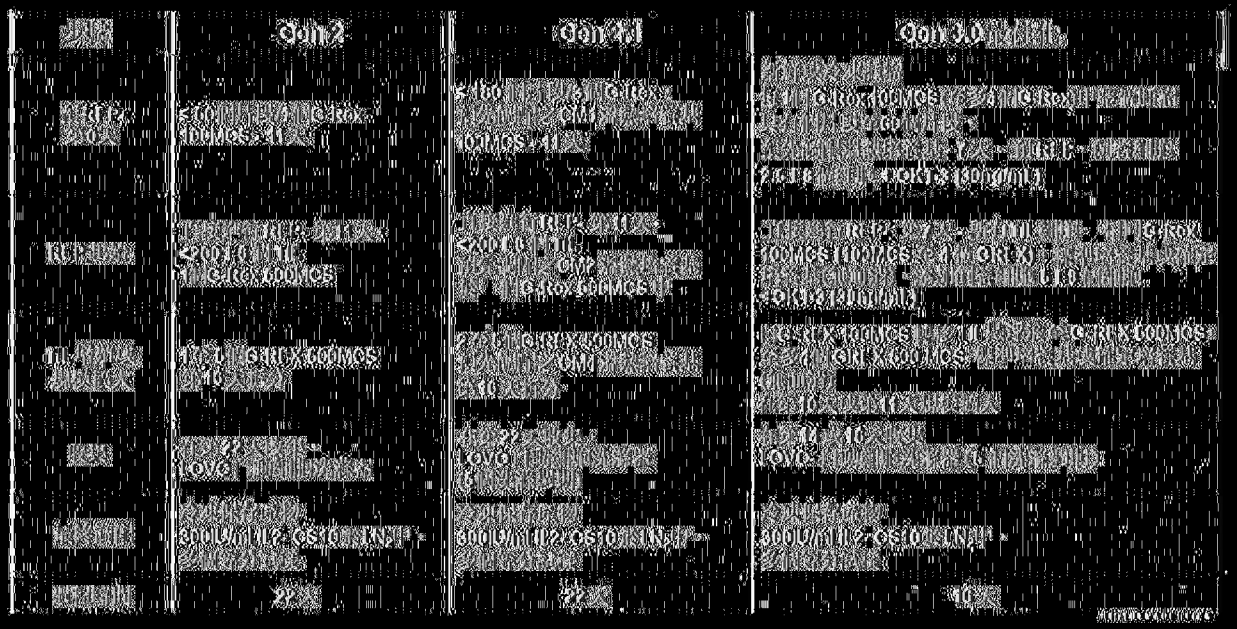

第0天: 植RIP
第11天: RIP
起始
第16天: TIL擴展
擴大
第22天: 收集
第0天: 植
RIP
第7天: RIP
起始
第10和11天:
TIL擴展擴大
第14-16天:
收集

圖 10



(圖 11)



圖 12

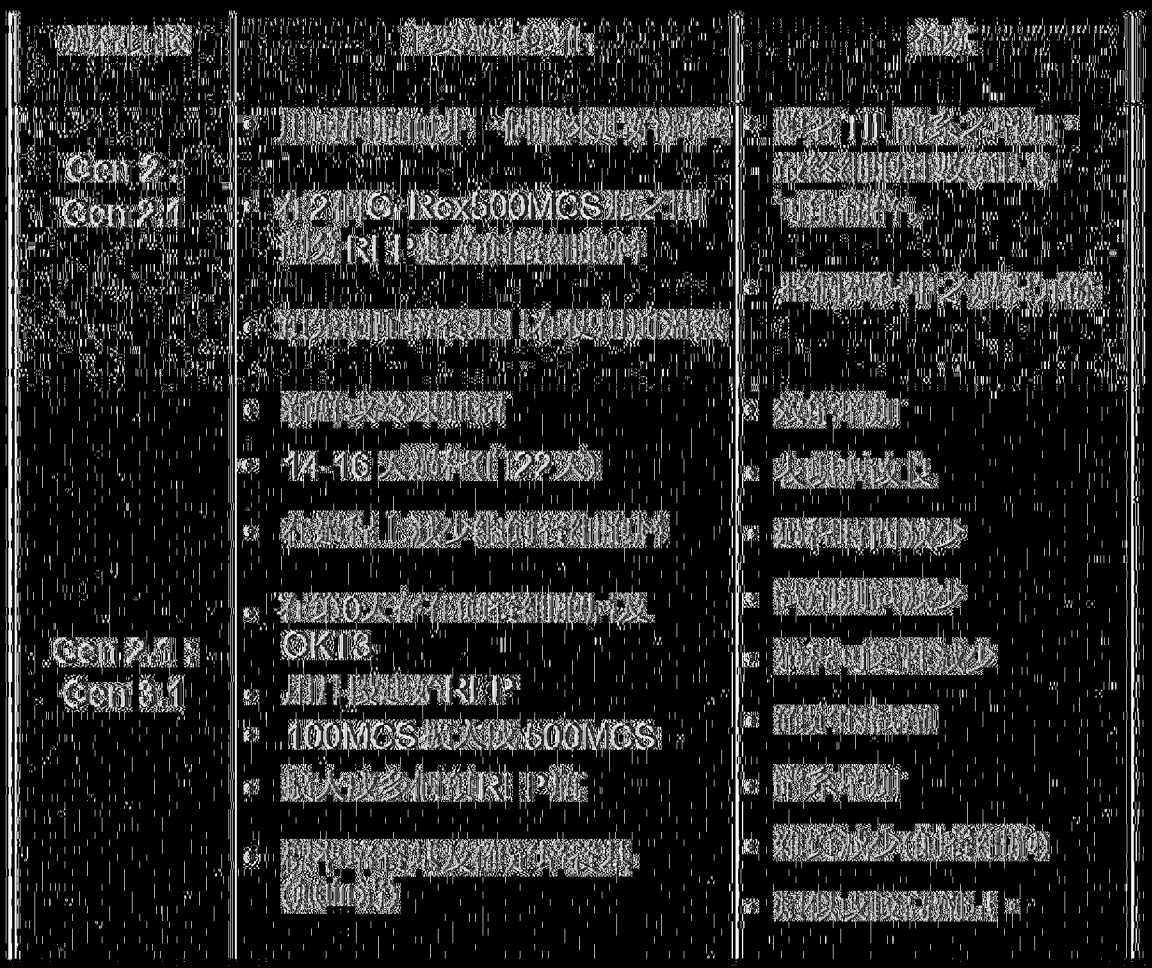
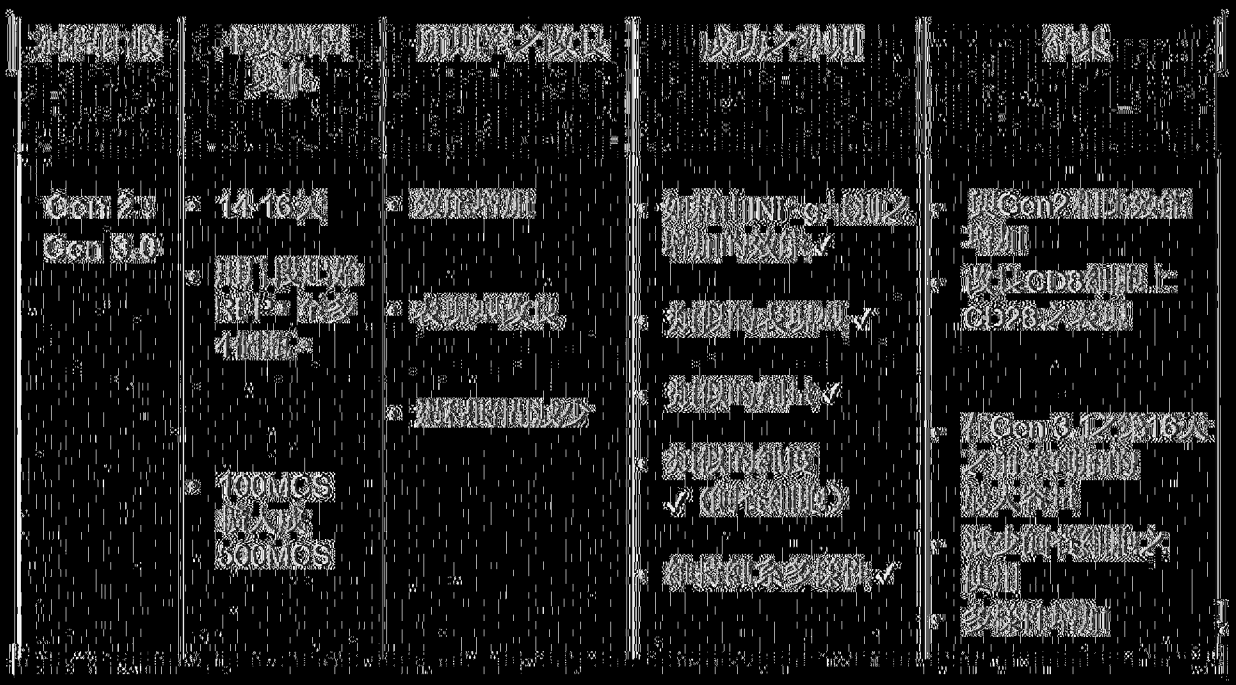


圖 13


連接介面
傳輸速率
所具有之技術
優於先前版
備註
Gen 2x2
Gen 3.0
14-16Gbps
100MOS
Gen 3.2
20Gbps
500MOS
與Gen2相比較前
一版
以下ODB相同上
CD2B之改良
Gen 3.2之16Gbps
Gen 4.0
32Gbps
1000MOS

(圖 14)

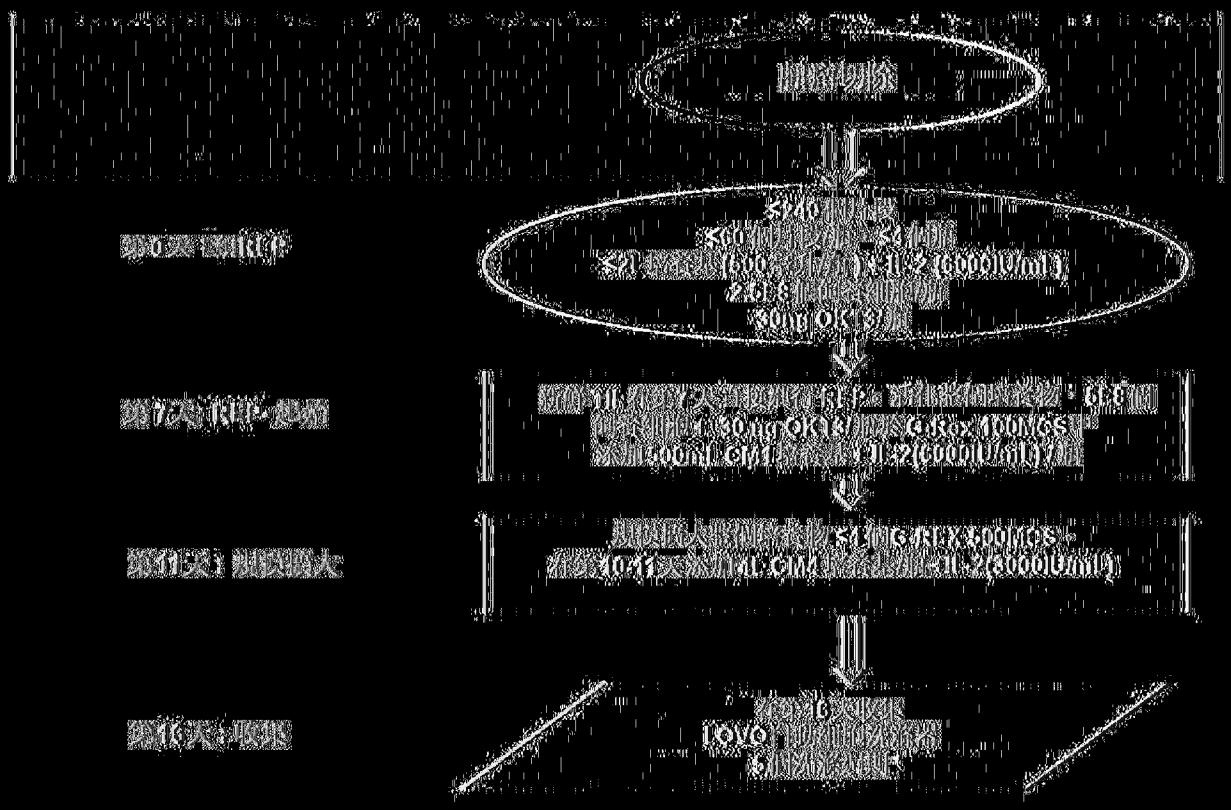
製程	Gen 2	Gen 3
14064	標準填塞法	標準填塞法
14065	標準填塞法	標準填塞法
M10861	標準填塞法	標準填塞法

標準填塞法：
預RLP: CM1
RLP複製: CM2
拆分或模擬大: CM4

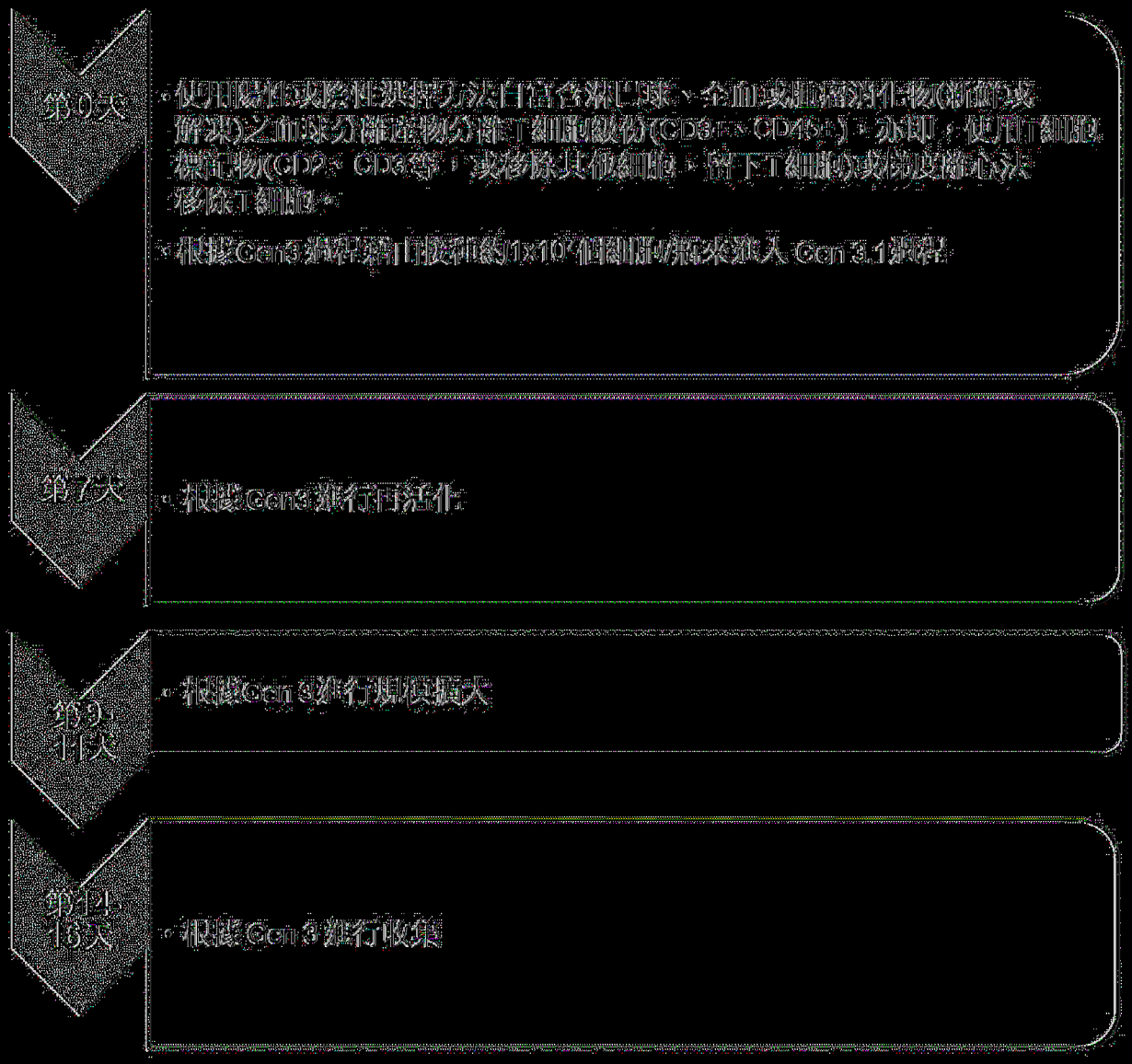
製程	Gen 3	Gen 3+	Gen 3#
14063	標準填塞法	標準填塞法	標準填塞法
14064	新型填塞法	新型填塞法	新型填塞法

確定填塞法：
C1S Optimizer (無加強填塞法)，製程中之每一次

|(附 15)|



(圖 16)


第0天
‧使用陽性或陰性選擇方法自白血球單采產品、全血或血液衍生物(新鮮或解凍)之血球分離產物分離T細胞微粒(CD8+、CD45+)，亦即，使用T細胞標記物(CD2、CD3等)，或移除其他細胞，留下T細胞的或陰性法去移除T細胞。
‧根據Gen3操作指引將約1x10⁸個細胞病毒載入Gen 3.1操作
第7天
‧根據Gen3進行門活化
第9-14天
‧根據Gen 3進行規模擴大
第12-16天
‧根據Gen 3進行收集

|(圖 17)|

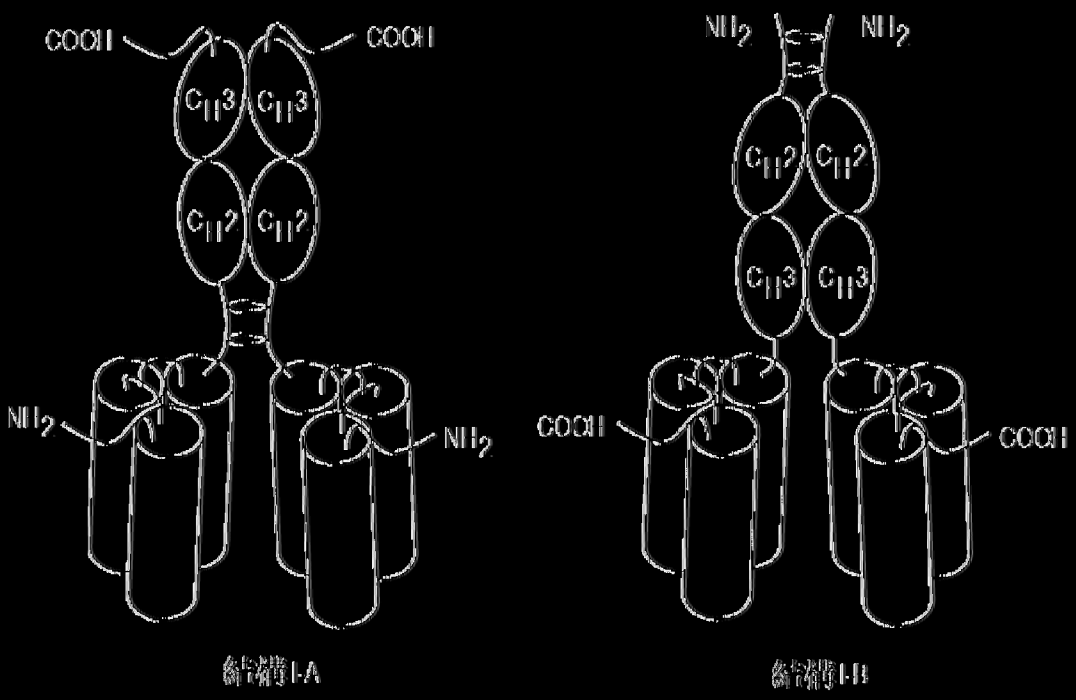

COOH
COOH
C_H3
C_H3
C_H2
C_H2
NH_2
NH_2
結構I-A
NH_2
NH_2
C_H2
C_H2
C_H3
C_H3
COOH
COOH
結構I-B

圖 18

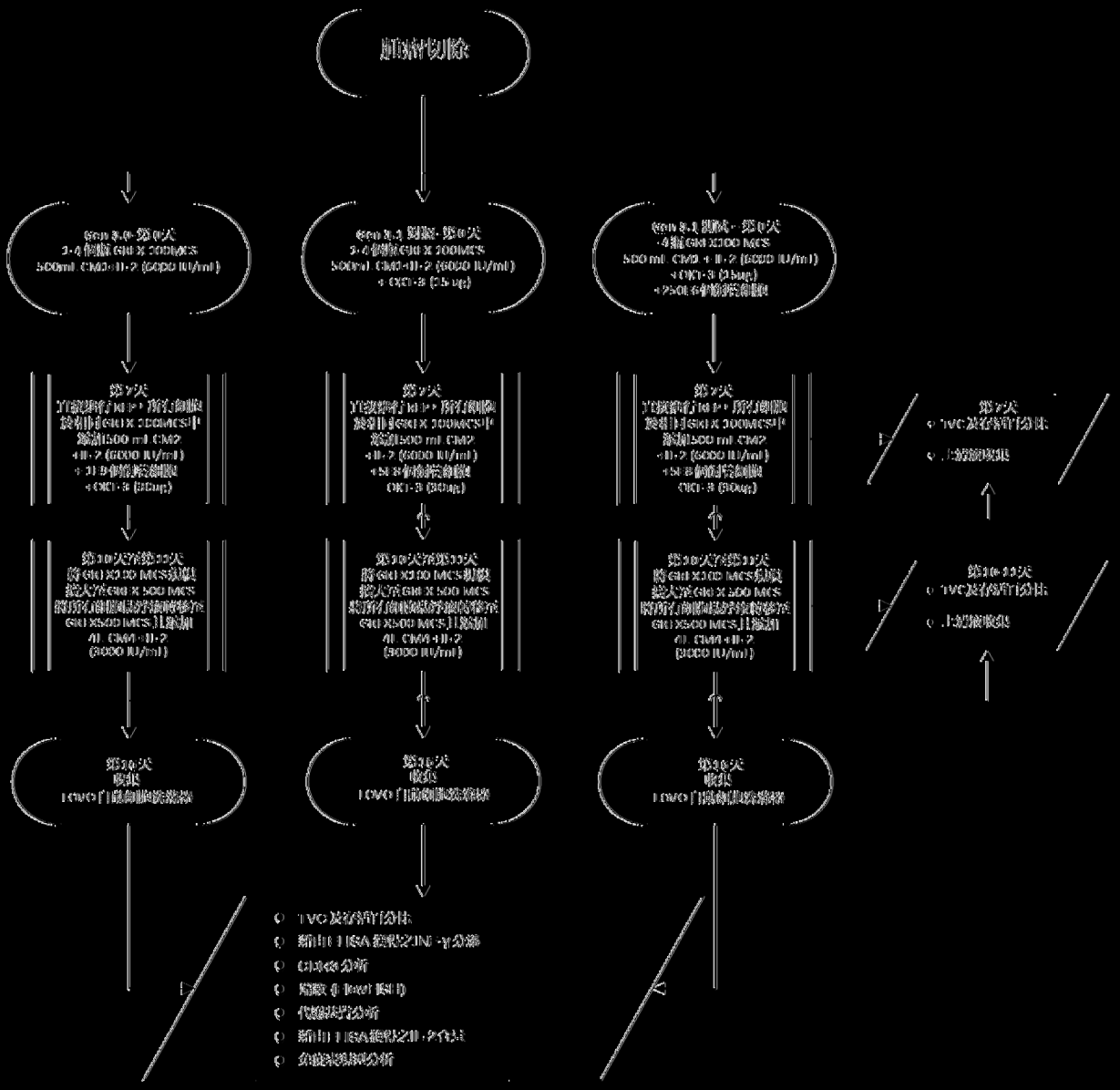

腫瘤切除
Gen 3.0 第0天
3-4個腫瘤@8 X 200MCS
500ml CM3+IL-2 (6000 IU/ml)
Gen 3.1 期間：第0天
3-4個腫瘤@8 X 200MCS
500ml CM3+IL-2 (6000 IU/ml)
+ OKT-3 (25 ug)
Gen 3.1 期間：第0天
-4個GM 2000 MCS
500 ml CM3 + IL-2 (6000 IU/ml)
+OKT-3 (25ug)
+250ml 4-1BB刺激細胞
第7天
T淋巴細胞計數>1E+9 /所有細胞
接種1@8X 200MCS於
第1500 ml CM3
+IL-2 (6000 IU/ml)
+4-1BB刺激細胞
OKT-3 (30ug)
第10天至第13天
將@8 X 200 MCS擴增
總大於@8 X 500 MCS
將所有細胞經淋巴球篩檢至
@8 X500 MCS 1L添加
AL CM3+IL-2
(6000 IU/ml)
第7天
• TVC及活存分析
• 上清液收集
第10-13天
• TVC及活存分析
• 上清液收集
第16天
收集
FACS「腫瘤細胞表現型
• TVC及活存分析
• 新抗原ELISA篩選2IN -γ分泌
• CD4/8 分析
• 殺傷 (Lactate release)
• 代謝研究分析
• 新抗原ELISA篩選2IL-2分泌
• 免疫表現型分析

圖 19



圖 2(b)

圖 2-7

圖 22

（附件23A）

圖 23(c)

圖 24

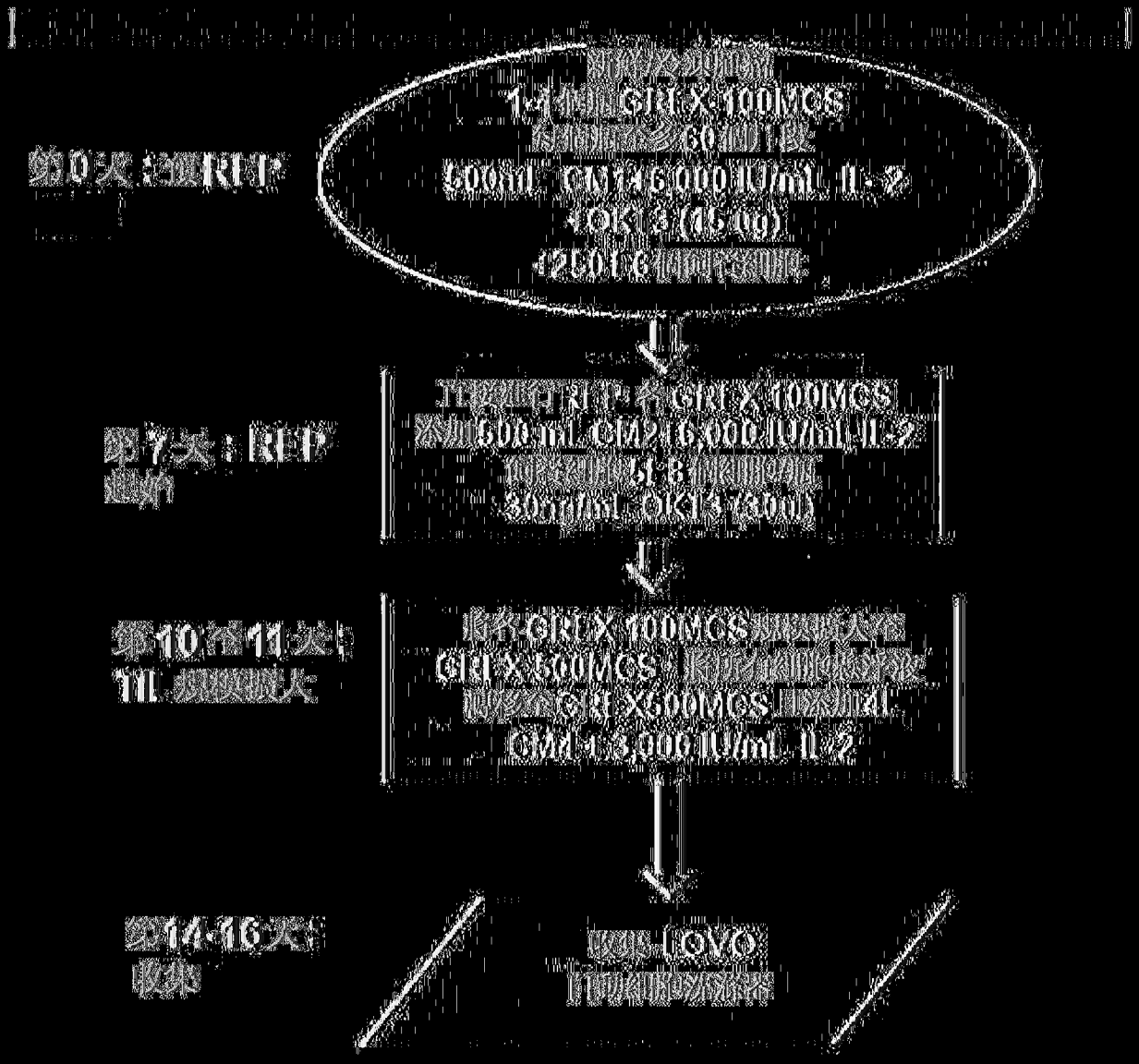
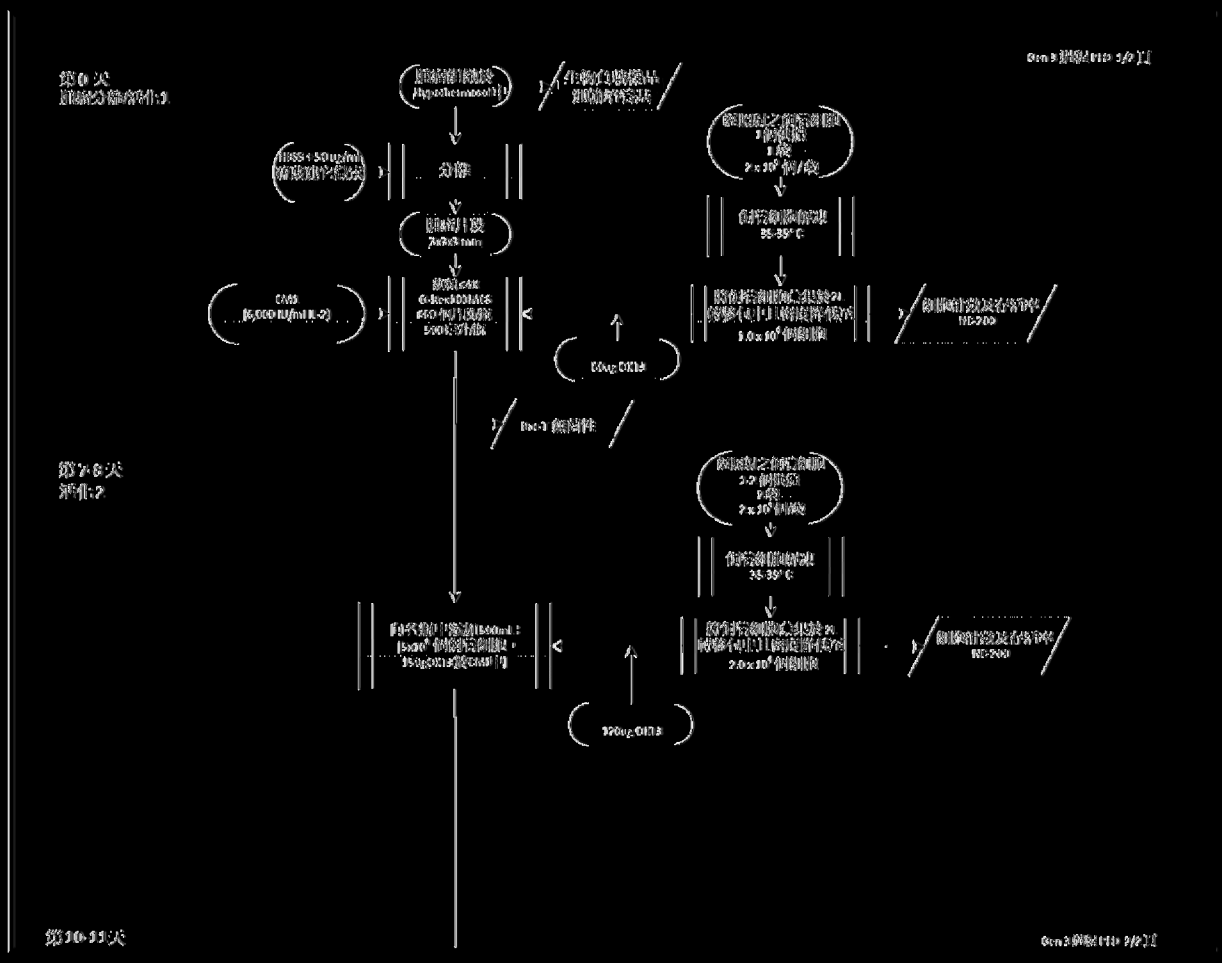


圖 25



(圖 26A)

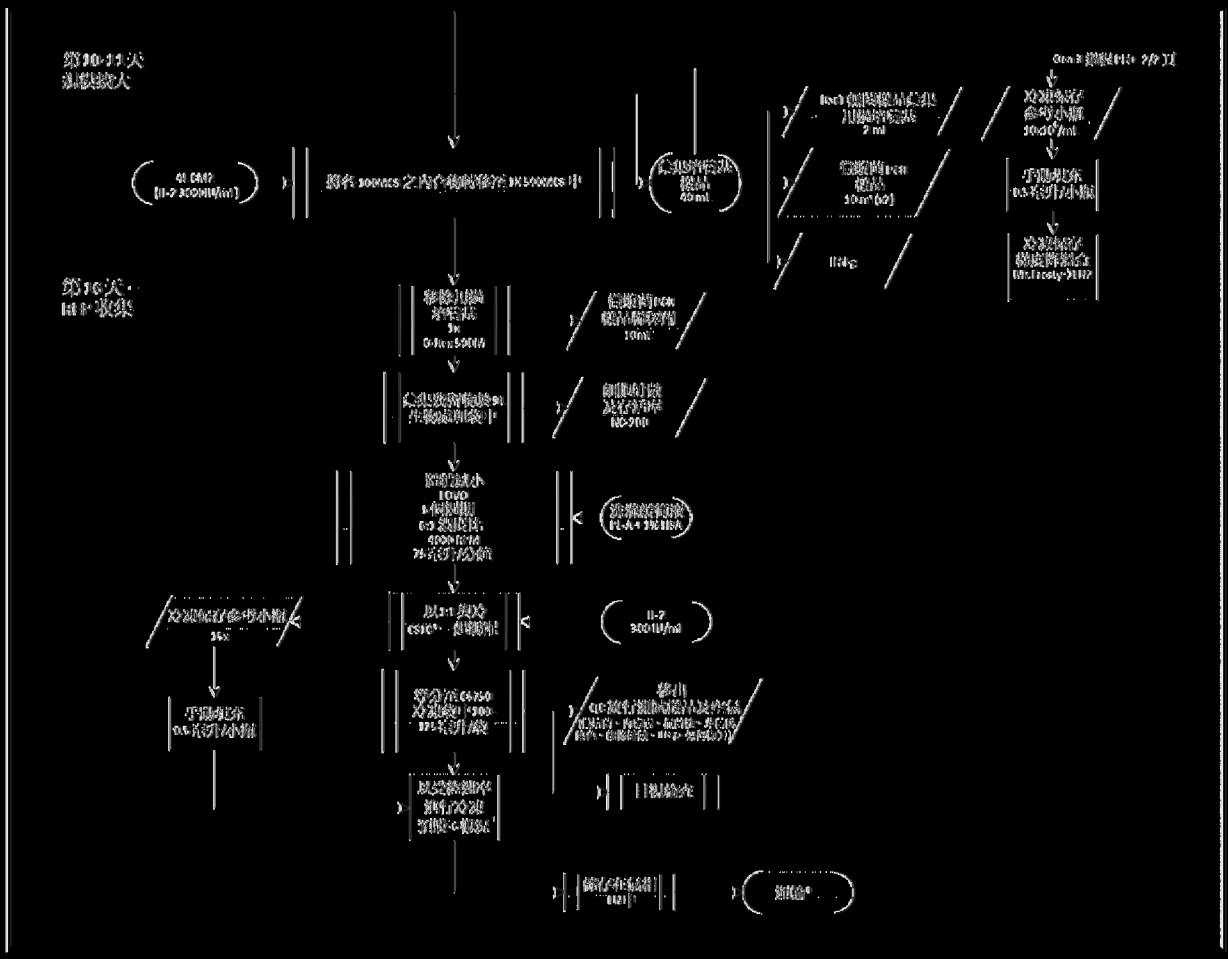

第10-11天
擴增與大
第16天，
回收與收集
0-n-1 擴增時間：2-7 天
4l CM2
(IL-2 3000IU/ml)
擴充 100mL 之內含細胞袋的 1L 500mL 培
IL-2 3000IU/ml
40ml
IL-15
IL-21
IL-2 3000IU/ml
IL-15
IL-21
IL-2 3000IU/ml
IL-15
IL-21
IL-2 3000IU/

圖 27

圖 28

圖 3

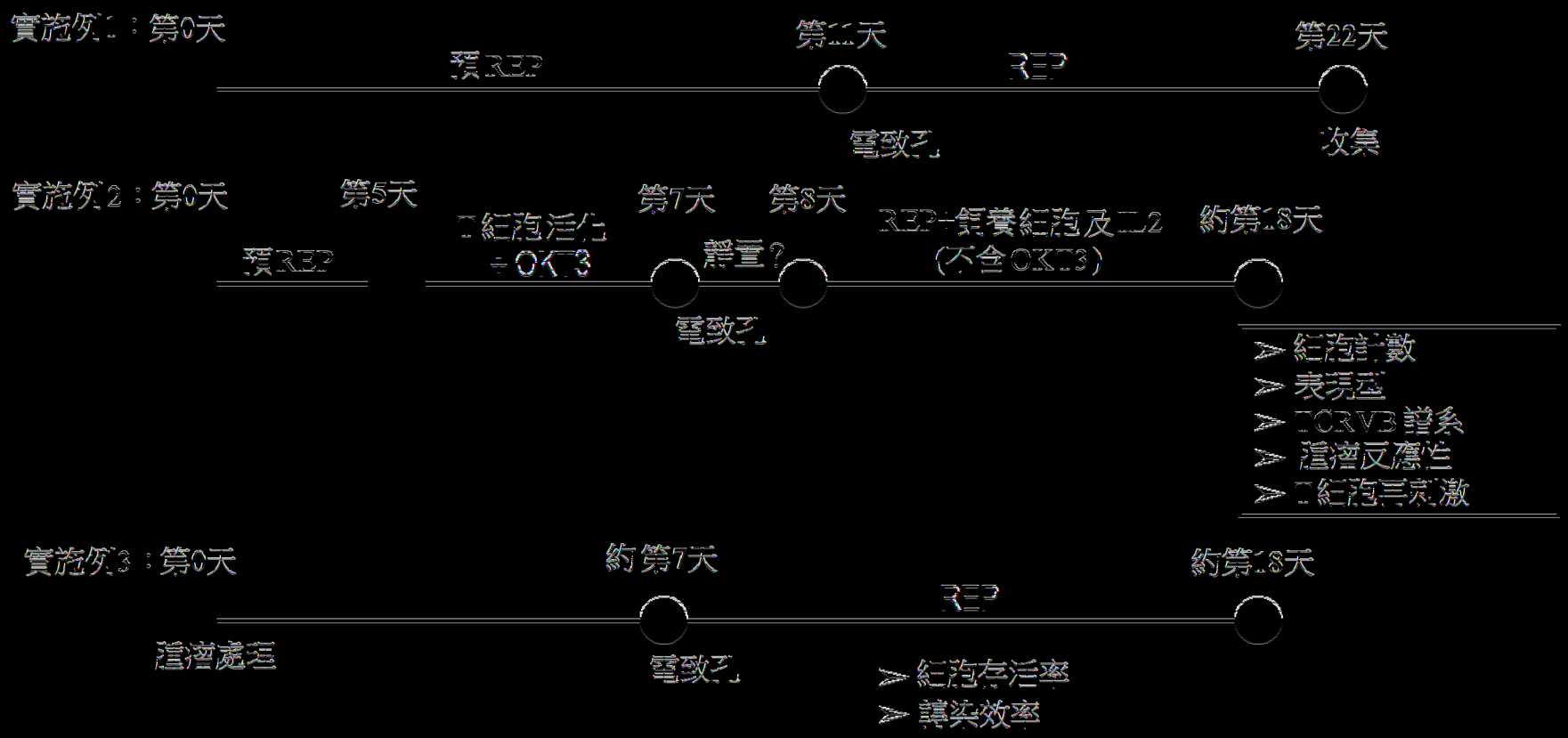
選定代表	案件	Ge-30	Ge-31	Ge-32	Ge-33
第5天： 前往高分子 設計	流程節點 (I)	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
	-2	600 J/mL	600 J/mL	600 J/mL	600 J/mL
	OKT-3	-	5.7	5.7	5.7
	位於前往	-	-	-	2.5–5
選定代表	案件	Ge-30	Ge-31	Ge-32	Ge-33
第7–8天： 前往高分子	流程節點 (I)	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL
	-2	600 J/mL	600 J/mL	600 J/mL	600 J/mL
	OKT-3	30.7	30.7	30.7	30.7
	位於前往	1–2 分鐘	500 公克	500 公克	500–600
第7天前往 設計		1–2 分鐘	500 公克	500 公克	700–800
選定代表	案件	Ge-30	Ge-31	Ge-32	Ge-33
第4–7天： 流程先前測試大	決策節點 (D) 前往高分子 GCR3X 的設計合約 2 (600 J/mL)。				
第4–7天： 決策先前設計	流程節點 (D) 前往先前 GCR3X 的設計合約 2 (600 J/mL)。				
選定代表	案件	Ge-30	Ge-31	Ge-32	Ge-33

(D) 前往高分子設計合約 GCR3X 的決策節點。

圖3-1

標示	第一次	第二次
第8天 晶核依賴 及產生	≤240度_真 ≤80度_氨作 ≤1小時 ≤1_光潔劑(500 奈米/毫) L-2 (6000 U/mL) 2.5x10⁸/盲腸_氨石英粉 15g OK3/毫	
第7 - 8天 導流	新鮮_工藝粒子_RP 產_超音波振動 5x10⁸/盲腸_台北 30 kg OK2/毫 G-Rex 100VCS 底_500mL_光潔劑：L-2(600 U/mL)	
第10 – 11天 浮游氣穴病 _骨骼_氨	4 G-REX 500VCS 浮游氣穴病_氨：三 GREX 100CS 轉錄_(三 GREX 500VCS 三底_4_光潔劑 IL-2 (600 U/mL) / 毫	
第16 -17天 灰塵	灰塵 LOVO_三重_氨_光潔劑 在 Plasmajet 1% HSA: CS10_二維_冷氨保存	

K3線
K2線
K1線
R線
K0線
R1線
R2線
K4線
K5線
K6線
K7線
K8線
K9線
K10線
K11線
K12線
K13線
K14線
K15線
K16線
K17線
K18線
K19線
K20線
K21線
K22線
K23線
K24線
K25線
K26線
K27線
K28線
K29線
K30線
K31線
K32線
K33線
K34線
K35線
K36線
K37線
K38線
K39線
K40線
K41線
K42線
K43線


實施例1：第0天
預REP
第11天
REP
第22天
電致孔
收集
實施例2：第0天
第5天
第7天
第8天
約第18天
預REP
T細胞活化+OKT3
靜置?
REP+未養細胞及IL2(不含OKT3)
電致孔
>細胞計數
>表現型
>TCRVβ譜系
>溫度反應性
>T細胞耗竭
實施例3：第0天
約第7天
約第18天
REP
溫度處理
電致孔
>細胞存活率
>轉染效率

信號序列 : MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO:252)
連接子(Lr1): SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO:246)
錨 (Ar2): (人類 B7.1 跨膜 分子內胺基酸序列)
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:239)
弗林蛋白酶 A-P2A 序列 : RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:251)

經栓繫之 IL-12-Lr1-Ar2
MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT
ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKT
SATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ
KARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE
DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRC
RERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:303)

經栓繫之IL-12-Lr1-Ar2
ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTCCTCGTGGCCGCCGCTACCCGCGTGCACTCCATCTGGGAGCTGAAGAAAGAC
GTGTACGTGGTGGAATTGGATTGGTACCCCGACGCCCCAGGCGAGATGGTGGTTCTGACTTGCGACACGCCGGA
GGAGGACGGCATCACCTGGACGCTGGACCAGAGCAGCGAAGTGCTGGGCTCTGGTAAGACCTTAACCATCCAGG
TCAAGGAGTTCGGTGATGCAGGACAGTACACGTGTCACAAGGGCGGGGAGGTCTTGTCCCATAGCCTGCTGCTCC
TGCACAAGAAGGAAGACGGCATCTGGTCTACGGATATCCTTAAAGACCAGAAGGAGCCCAAGAACAAAACCTTCC
TGCGATGCGAGGCTAAGAATTACTCCGGGGCGTTTACCTGTTGGTGGCTCACAACCATCTCGACCGACCTGACCTT
CTCCGTGAAGTCTTCCAGGGGATCTTCTGATCCGCAAGGCGTTACCTGCGGGGCCGCTACCCTGTCGGCTGAGCGC
GTCCGTGGTGACAACAAGGAGTACGAGTACTCGGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCAGCGGCCGAAGA
GTCCTTGCCCATCGAGGTGATGGTGGACGCTGTACACAAGCTCAAGTACGAGAACTACACCTCCTCTTTCTTTATAC
GCGACATCATCAAGCCTGACCCCCCTAAAAACCTGCAGCTGAAGCCCCTTAAAAACTCTCGACAGGTCGAGGTATC
CTGGGAGTACCCCGACACCTGGTCTACTCCTATTCGTATTTCAGCCTGACCTTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCAAG
TCCAAGCGCGAGAAGAAGGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCAGCGCGACTGTCATTGTCGGAAGAACGCGAG
CATCTCCGTACGGGCACAGGATCGCTATTACTCCAGCAGTTGGTCAGAGTGGGCTTCGGTTCCGTGTTCTGGAGGA
GGTGGCGGCGGCTCACGCAACCTGCCCGTGGCGACGCCGGACCCGGGTATGTTTCCTGTCTGCACCACTCTCAG
AACTTGCTCCGTGCCGTCTCGAATATGCTGCAGAAGGCCCGCCAGACTCTGGAGTTCTATCCATGCACTAGTGAGG
AGATCGATCATGAGGACATCACCAAGGACAAGACCATCCACCGTGGAGGCTTGTCTGCCGCTGGAGTTGACAAAGA
ACGAGAGCTGCCTCAATAGCCGCGAGACTTCCTTCATCACCAACGGCTCCTGCCTCGCGAGCCGTAAGACCTCCTT
TATGATGGCGCTGTGCCTGTCAAGTATCTACGAAGATCTGAAAATGTATCAGGTGGAGTTCAAAACTATGAACGC
AAAACTCCTGATGGATCCCAAGCGCCAAATTTTCTTGGACCAGAACATGCTTGCCGTGATCGACGAGCTGATGCAG
GCCCTGAACTTCAACTCCGAGACCGTCCCTCAGAAGTCGTCTCTGGAGGAACCCGACTTTTACAAGACAAAGATCA
AGCTGTGCATCCTGCTACACGCGTTCCGCATTCGGGCCGTGACCATTGACCGCGTGATGTCCTACCTGAATGCCTC
GTCCGGCGGGGGGGGCTCCGGTGGGGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCAGGTGGCGGCGGCTCCGGCGGAGG
TTCGCTTCAGCTTCTGCCCAGTTGGGCAATCACTCTGATTTCCGTCAACGGAATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTA
CTGCTTTGCTCCCAGATGTAGAGAGCGCCGCCGCAACGAGCGCCTGCGTCGTGAGAGCGTGAGGCCTGTG (SEQ
ID NO:304)

圖 36A

[illegible]

[illegible]

[illegible]

經栓繫之IL-12/IL-15

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKT
LTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTT
ISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYE
NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTS
ATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQ
QKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYE
DLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAF
RIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRC
RERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISD
LKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESG
CKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIF
VICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:309)

經栓繫之IL-12/IL-15

ATGGATTGGACCTGGATTCTGTTTTTGGTGGCGGCCGCCACCCGCGTCCATTCCATATGGGAATTAAAGAAGGACGTGTACGT
GGTGGAGCTTGACTGGTACCCTGACGCTCCCGGCGAGATGGTGGTCCTGACCTGCGATACCCCCGAGGAGGACGGCATCACC
TGGACCCTGGACCAGAGCTCCGAGGTGCTGGGAAGCGGTAAAACCCTCACCATACAGGTGAAGGAGTTCGGTGATGCTGGCC
AGTACACCTGTCACAAAGGCGGGGAGGTACTTCCCATTCGCTGCTCCTGCTTCACAAGAAGGAAGACGGCATTTGGTCGACC
GATATTCTGAAGGACCAGAAGGAACCAAAAAACAAGACCTTTTTGCGTTGCGAGGCCAAGAACTATTCCGGCCGCTTCACCTG
CTGGTGGCTAACGACCATCTCAACCGACCTGACCTTCTCCGTTAAGTCTAGCCGTGGTAGCTCCGACCCTCAGGGGGTAACCTG
CGGGGCTGCGACGCTGAGTGCGGAGCGGGTACGCGGCGACAACAAGGAGTACGAGTACTCCGTGGAATGTCAGGAGGATA
GTGCCTGCCCAGCGGCCGAGGAGTCCCTGCCCATCGAGGTAATGGTGGACGCGGTCCACAAGCTGAAGTACGAGAACTACAC
TAGCTCCTTCTTTATTAGAGACATCATCAAGCCCGACCCGCCTAAGAACCTGCAGCTGAAACCTCTCAAAAACTCCCGCCAGGT
TGAAGTGTCGTGGGAGTACCCTGACACCTGGTCTACACCGCACAGCTATTTCTCGCTTACATTCTGCGTGCAGGTGCAGGGCA
AATCCAAGCGCGAGAAGAAAGACCGCGTGTTCACCGACAAAACCTCTGCTACAGTGATCGCCGAAAGAATGCTTCTATCTCC
GTGCGTGCTCAGGACCGCTACTACTCATCAAGCTGGAGTGAGTGGGCCTCCGTGCCATGTTCCGGGGGGGGCGGCGGTGGCT
CCCGCAACCTGCCCGTTGCAACGCCCGACCCGGGTATGTTCCCATGCCTGCACCACTCCCAGAATCTGTTACGTGCTGTAAGCA
ATATGCTTCAGAAGGCTCGCCAGACTCTGGAGTTCTACCCCTGCACTTCGGAGGAGATCGACCACGAAGACATCACCAAGGAC
AAGACATCCACCGTGGAGGCGTGCCTCCCTTTGGAGCTCACAAAGAACGAGTCCTGTCTAAACTCAAGGGAGACTAGCTTCAT
CACTAATGGATCGTGTCTGGCGTCGCGCAAGACCTCTTTCATGATGGCCCTGTGCCTGTCCAGCATCTATGAGGACCTTAAAAT
GTATCAGGTCGAGTTCAAGACTATGAACGCAAAGCTGCTGATGGATCCCAAGCGGCAAATTTTCCTGGACCAGAACATGCTGG
CGGTGATCGACGAGCTGATGCAGGCCCTCAACTTCAACAGCGAAACTGTTCCTCAGAAGTCCTCCCTGGAGGAGCCGGACTTT
TACAAGACCAAGATCAAGCTATGTATTTTGTTACACGCCTTCCGCATCCGCGCTGTCACTATTGACCGCGTGATGTCTTACCTGA
ACGCATCTAGTGGGGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGCGGCTCTGGCGGTGGCGGCTCTGGCGGTGGTGGTTCAGGAGGCGGG
TCCCTCAGCTGCTCCGTCGTGGGCCATCACACTGATCTCTGTGAACGGCATCTTCGTCATCTGTTGTCTTACTTACTGCTTTGC
CCCCAGGTGTAGGGAGAGACGCCGCAATGAACGGCTGAGGCGTGAGAGCGTGCGCCCGGTGAGGGCTAAGCGCAGCGGCT
CCGGCGCGACCAACTTTCGCTGCTGAAGCAGGCCGGGGACGTGGAGGAGAATCCAGGCCCGATGGATTGGACCTGGATCCT
GTTCTTGGTGGCCGCGGCTACTCGGGTGCACTCTAATTGGGTCAACGTGATCTCCGACTTGAAAAAGATCGAGGATCTGATCC
AGAGCATGCATATCGACGCCACGCTGTACACCGAGAGCGATGTGCACCCCTCTTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTG
CTGGAGCTGCAGGTCATCTCTCTTGAGTCGGGCGATGCATCTATTCATGACACCGTCGAGAACCTAATCATCCTGGCCAACAAC
TCACTGTCTTCAAACGGCAACGTGACGGAGTCTGGGTGCAAGGAATGTGAGGAATTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCC
TGCAGTCCTTCGTCCACATCGTGCAGATGTTTATTAACACGAGTAGTGGCGGAGGTGGCAGCGGAGGCGGCGGCTCCGGCGG
TGGAGGAAGTGGAGGCGGCGGCTCTGGTGGCGGTTCCCTACAATTGCTTCCCTCTTGGGCTATCACCCTCATCAGCGTCAACG
GTATCTTCGTCATCTGTTGTCTGACCTACTGCTTTGCCCCTCGATGCCGAGAGCGCCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGGGAGT
CCGTGCGCCCCGTT (SEQ ID NO:310)

(附件 36C)

經枝聚之IL-18/IL-15

MDWTWILFLVAAATRVHSYFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQFESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNEDSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPVRAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:311)

經枝聚之IL-18/IL-15

ATGGATTGGACCTGGATCCTTTTCTTGGTGGCGGCTGCAACCCGGGTTCATAGCTATTTCGGCAAGCTGGAGTCCAAGCTCTCCGTGATCCGCAACCTCAACGACCAGGTGCTGTTCATCGACCAGGGCAACCGCCCCCTGTTTGAGGACATGACAGATTCTGATTGCCGCGACAACGCGCCGCGCACCATCTTCATTATCTCTATGTACAAGGACTCCCAGCCACGTGGTATGGCCGTCACGATCAGCGTGAAGTGCGAGAAGATTTCTACCCTGTCCTGCGAGAACAAGATCATCTCGTTCAAGGAGATGAACCCTCCCGACAATATCAAGGACACCAAGTCCGACATCATCTTCTTCCAGCGATCAGTGCCAGGCCACGACAACAAGATGCAGTTCGAGAGCAGCAGCTACGAGGGCTACTTCCTTGCGTGCGAGAAAGAGCGCGATCTGTTCAAACTGATCCTCAAGAAGGAAGACGAGCTCGGGGACCGCAGCATCATGTTTACCGTACAGAACGAGGACAGCGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGAGGCGGTAGTGGCGGAGGCGGCTCAGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGGTCGTTGCAGCTCTTGCCGAGTTGGGCTATCACTCTTATCTCCGTAAACGGCATCTTCGTGATATGCTGCCTGACGTACTGTTTTGCTCCTAGGTGTCGCGAGCGCCGCCGGAACGAGAGACTGCGACGGGAATCCGTGCGCCCGGTCCGCGCGAAGCGTAGTGGCTCCGGTGCTACCAACTTTCTCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTATGGACTGGACATGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCGGCCACCCGCGTCCACTCAAATTGGGTCAATGTGATTTCTGACCTGAAGAAAATTGAGGATCTCATCCAGTCCATGCACATTGACGCCACTCTGTACACCGAGAGCGATGTTCACCCCTCTTGTAAGGTGACCGCCATGAAATGTTTCCTGTTGGAGCTGCAGGTCATTTCGCTCGAGTCTGGCGACGCATCGATCCATGACACCGTGGAGAACCTGATTATCCTGGCCAACAACTCCCTTTCTTCAAATGGCAACGTGACTGAAAGCGGGTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAAGAAAAGAACATCAAAGAGTTCCTGCAATCTTTCGTCCACATTGTGCAGATGTTTATTAACACGTCCTCGGGTGGCGGGGGGGTCGGGCGGGGGTGGTTCCGGCGGAGGCGGGTCCGGAGGAGGGGGGCTCTGGTGGGGGATCCCTACAGCTACTGCCCTCTTGGGCCATCACCCTTATCTCCGTCAACGGTATCTTCGTGATCTGTTGCCTGACTTACTGCTTTGCCCCGAGATGTCGTGAGCGTAGGAGGAACGAGCGCCTGCGCCGCGAGAGCGTGCGTCCCGTG (SEQ ID NO:312)

(圖 36D)

經柞聚之抗CD40scFV (APX005M)
MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSTYVCWVRQAPGKGLEWVACIYI
GDGTNYSASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARPDTYGFAINLWGPGTLVTVSSGGGGS
GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIKCQASQSISSRLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQCTGYGISWPIGGGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGSLQLEPSWAITLSVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:313)

經柞聚之抗CD40scFV (APX005M)
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCCGCTACACGAGTCCACAGCCAGGTCCAGCTCGTG
GAGAGCGGAGGCGGCGTGGTGCAGCCAGGCCGCTCGCTGCGCCTGTCATGCGCAGCGTCCGGTTTCTC
CTTCTCGTCGACCTACGTGTGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGATTGCTTGTAT
TTATACCGGCGACGGCACCAACTACAGCGCAAGTTGGGCCAAGGGCCGTTTCACCATCTCCAAGGATAG
TAGCAAGAACACGGTATACCTGCAGATGAACTCTCTTCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTATTTCTGTGCC
CGGCCCGACATCACTTATGGCTTCGCGATTAACTTTGGGGCCCTGGAACCCTGGTGACCGTGTCCTCCG
GCGGCGGTGGCTCTGGGGGGGGCGGGTCCGGCGGAGGCGGCAGCGGAGGCGGCGGCTCCGACATCC
AGATGACCCAGTCGCCCAGTTCTTTGTCCGCTTCCGTGGGGGACAGGGTCACCATAAAGTGCCAGGCTT
CTCAGAGCATCTCGTCCCGCCTGGCGTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGAAGCCCCCAAAGCTGCTCATCT
ACCGGGCTTCCACTCTGGCCAGCGGTGTTCCTTCCCGCTTCTCTGGCTCCGGGTCGGGCACTGACTTTAC
ATTGACGATCTCTTCGCTTCAGCCGGAAGATGTAGCTACTTACTACTGTCAATGCACTGGCTACGGCATC
AGTTGGCCCATCGGTGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAAAGCGGGGGGAGGCGGTTCTGGCGGTGGAG
GGTCTGGCGGGGGTGGCTCCGGGGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGATCCCTACAGCTGCTGCCCTCTTGG
GCCATCACGCTCATTTCAGTTAATGGCATCTTCGTCATCTGCTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTG
TAGAGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGTCGCGAGAGCGTGCGCCCGGTG (SEQ ID NO:314)

(圖 36E)

經栓繫之抗CD40scFV（蘆丙珠單抗）
MDWTWILFLVAAATRVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVARVI
PNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGIYWWGQGTLVTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLIYTVSN
RFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGTKVEIKSGGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGSLQLEPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:315)

經栓繫之抗CD40scFV（蘆丙珠單抗）
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCGGCGGCTACACGTGTGCACTCCGAGGTGCAGTTGGTG
GAGAGCGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCGGGCGGGAGCCTGCGCCTGTCGTGCGCCGCTTCCGGCTACTC
CTTCACCGGTTATTACATCCACTGGGTGCGACAGGCCCCGGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTCGCTCGCGT
AATTCCTAACGCGGGTGGCACCAGCTACAACCAGAAATTTAAGGGCAGATTCACCCTCAGCGTTGACAA
CTCCAAGAACACGGCCTACCTGCAGATGAACTCCCTTCGCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCT
CGCGAGGGCATCTATTGGTGGGGCCAGGGAACTCTAGTTACCGTGTCCTCCGGCGGCGGCGGCTCGGG
CGGCGGGGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCCGGAGGGGGAGGGTCCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCC
TCTAGTCTGAGCGCATCCGTGGGGGACAGGGTCACCATCACCTGCCGCTCGTCACAATCGCTTGTCCACT
CAAATGGCAACACTTCCTGCATTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCGCCCAAGCTGCTCATCTACA
CCGTGAGCAACCGCTTTCAGGCGTGCCATCCCGCTTCTCTGGCTCCGGCTCCGGTACAGATTTCACCCTT
ACCATTAGCTCGTTGCAGCCAGAAGACTTTGCCACCTATTTCTGTTCTCAGACGACTCACGTCCCGTGGA
CCTTCGGACAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGCGGCGGAGGTGGGAGTGGAGGCGGCGGGTCCG
GAGGGGGCGGTTCTGGCGGCGGTGGTTCTGGCGGAGGGTCTCTGCAGCTGCTACCCAGTTGGGCCATC
ACTCTCATTTCTGTCAACGGCATCTTCGTCATATGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCTCCTAGGTGTCGTGA
GCGCCGCCGCAACGAGCGGTTGCGGCGTGAATCCGTGCGCCCTGTA (SEQ ID NO:316)

[(圖 36F)]

經栓繫之抗CD40scFV(犰卡珠單抗)
MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISL
GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIRSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGSLQLEPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:317)

經栓繫之抗CD40scFV(犰卡珠單抗)
ATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTCGCAGCGGCCACCCGCGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTG
GAATCCGGGGGTGGCGTGGTGCAACCAGGCCGTAGCCTGCGCCTGAGCTGTGCTGCGTCCGGCTTTAC
TTTTTCGTCTTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCGGGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGCGGTTAT
CAGCTATGAGGAGAGCAACCGCTACCACGCGGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCGCGGGACA
ACTCCAAGATAACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGCGGACTGAAGACACCGCCGTGTACTACTGTGC
CCGCGATGGCGGAATCGCCGCTCCCGGGCCCGACTATTGGGGCCAGGGCACACTCGTTACCGTCTCCTC
GGGAGGCGGCGGCAGTGGTGGTGGAGGTTCCGGCGGCGGGGGCTCCGGGGGTGGCGGCTCTGACAT
CGTGATGACGCAGAGCCCTTTGAGCCTAACAGTTACCCCCGGGGAGCCCGCTTCGATTTCATGCCGCTCC
TCCCAGAGCCTGCTGTACTCAAATGGCTACAACTACCTGGACTGGTACCTCCAGAAGCCGGGTCAGTCCC
CTCAGGTGCTCATCTCGTTGGGCAGCAACAGGGCCTCTGGCGTGCCAGACCGCTTCTCCGGATCTGGCA
GCGGAACCGATTTCACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGACGTGGGCGTGTATTACTGTATGC
AGGCCCCGACAGACTCCCTTCACCTTCGGCCCCGGGACCAAGGTGGATATCCGCTCGGGAGGCGGCGGC
AGCGGTGGGGGAGGCAGCGGTGGTGGCGGATCCGGGGGGGGCGGCTCTGGTGGCGGATCCCTCCAG
CTGCTGCCGAGTTGGGCTATCACTCTTATTCCGTAAATGGGATTTCGTCATCTGCTGCCTTACCTACTG
CTTGCACCTAGATGTCGCGAGCGTAGGCGCAACGAGCGGCTTCGTCGCGAGTCCGTCCGCCCTGTC
(SEQ ID NO:318)

(附36G)

經栓繫之抗CD40scFV(寨立路單抗)
MDWTWILFLVAAATRVHSQVQLVQSGALVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG
WINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPG
KAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIKSGGGGSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID
NO:319)

經栓繫之抗CD40scFV(寨立路單抗)
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCTGCCACCCGTGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGGTG
CAATCCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTATCGTGTAAGGCTTCGGGCTACAC
GTTCACCGGCTACTACATGCATTGGGTCCGCCAGGCCCCCGGACAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTGGA
TTAACCCCGACTCCGGCGGCACCAACTACGCGCAGAAATTTCAGGGGCGAGTGACTATGACAAGGGAC
ACTTCCATCTCCACAGCCTACATGGAGCTCAACCGCCTGCGCAGCGATGACACCGCAGTGTACTATTGTG
CTCGCGACCAGCCTCTAGGTTACTGCACTAATGGCGTATGTAGCTATTTCGACTATTGGGGCCAGGGCAC
CCTGGTCACCGTGTCCAGCGGCGGAGGGGGCTCAGGCGGAGGTGGCTCAGGAGGTGGCGGCTCGGGG
GGCGGTGGGTCCGACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCGGTCTCTGCTTCTGTGGGAGACCGCGTG
ACGATAACCTGCCGTGCCTCCCAGGGCATCTACAGTTGGCTTGCGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAG
GCGCCAAACCTGCTGATTTACACCGCATCCACTCTTCAGTCAGGCGTTCCTTCCCGCTTCAGTGGCTCTGG
TTCTGGCACCGATTTCACGCTGACCATCTCCTCCTTGCAGCCGGAAGACTTGCCACTTACTACTGCCAAC
AGGCCAACATCTTCCCTCTGACCTTCGGCGGTGGCACCAAGGTGGAGATCAAATCTGGCGGAGGGGGC
TCGGGCGGGGGTGGTTCTGGCGGCGGGGGAAGTGGTGGGGGCGGATCTGGTGGTGGTAGCCTGCAG
CTCTTGCCCTCCTGGGCGATCACCCTCATCAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATCTGTTGCCTGACCTACTG
CTTTGCGCCGAGATGTCGAGAGCGCCGGCGCAACGAGCGCCTGCGTCGGGAGTCCGTGCGCCCCGTG
(SEQ ID NO:320)

(共 360)

CD40L
MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTASVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO:273)

CD40L
ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTGTACTTGCAC
CGCCGCCTGGACAAAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAG
AGGTGTAACACTGGCGAGCGTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGAGATCAAGAGCCAGTTCGAGGGC
TTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGG
TGATCAGAACCCCCAAATTGCAGCGCATGTGATAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCA
GTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACCTGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGA
CGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACGTTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCT
CTCAGGCTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGAGCGAATCCTGCTCCGCGC
CGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGAGCATCCACCTTGGTGGGGTTTTTGAGCT
GCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGCTTCACC
TCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (SEQ ID NO:321)

經栓繫之CD40L/IL-15

MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNT
GERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYT
MSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQ
QSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLP
SWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMDW
TWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
GSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:322)

經栓繫之CD40L/IL-15

ATGATCGAAACTTACAACCAGACGAGCCCGCGCATCCGCCGCCACCGGGCTGCCCATCTCTATGAAAATCT
TCATGTATCTGCTGACCGTGTTTCTGATCACCCAGATGATCGGTTCCGCGCTGTTCGCCGTGTACCTGCAC
CGCCGCCTGGACAAGATAGAAGACGAGCGCAACCTGCACGAAGATTTCGTCTTCATGAAGACCATCCAG
CGGTGTAATACCGGCGAGAGGAGCCTGAGCTTGCTCAACTGCGAGGAGATCAAAAGTCAGTTCGAGGG
CTTCGTTAAGGACATCATGCTCAACAAGGAGGAGACCAAGAAGGAGAACTCCTTCGAGATGCAAAAGG
GGGACCAGAACCCTCAGATCGCCGCGCATGTAATTTCCGAGGCCTCATCCAAGACGACTTCTGTCCTACA
GTGGGGCAGAGAAGGGCTACTACACCATGTCTAATAACCTGGTCACCCTTGAGAACGGCAAGCAACTGAC
AGTGAAGCGCCAGGGCCTCTACTACATCTACGCGCAGGTGACCTTCTGCAGCAACCGCGAGGCTTCCTC
CCAAGCTCCCTTCATCGCATCTCTGTGCCTGAAAAGCCCTGGCCGCTTCGAGCGGATTCTCCTTCGTGCA
GCAAACACTCACTCGTCCGCCAAGCCCTGTGGACAGCAGAGCATCCACCTGGGCGGCGTGTTCGAGCTG
CAGCCAGGCGCCTCCGTGTTCGTCAATGTGACCGACCCGTCCCAGGTGTCCCATGGCACTGGCTTCACCT
CCTTCGGCCTCCTCAAACTGTCCGGCGGCGGTGGCAGTGGTGGCGGGGGATCAGGTGGCGGCGGCTCC
GGAGGTGGCGGGTCCGGGGGAGGTTCTCTTCAGCTTCTGCCTAGCTGGGCGATCACCCTGATCTCCGTT
AATGGCATCTTCGTCATTGTTGTTTGACCTATTGCTTTGCCCCGAGATGTCGAGAGCGTAGACGCAACG
AGCGCCTGCGCCGTGAAAGCGTGCGACCTGTGCGCGCTAAGCGCAGCGGCTCCGGCGCTACCAACTTCT
CATTACTCAAGCAGGCTGGAGATGTAGAGGAGAATCCAGGGCCAATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCC
TGGTGGCCGCCGCGACTCGCGTCCACAGTAATTGGGTCAACGTGATCTCTGACCTGAAAAAGATTGAGG
ACTTGATCCAGAGCATGCACATTGACGCTACCCTGTACACGGAGAGTGACGTGCACCCCTCGTGCAAGG
TGACAGCCATGAAGTGCTTTTTGCTGGAGTTGCAGGTCATCTCTCTAGAGAGCGGTGATGCCTCCATCCA
TGACACCGTGGAGAACCTTATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGTCGAGCAACGGCAACGTGACCGAGTC
CGGGTGCAAGGAATGTGAGGAGCTGGAGGAGAAAAACATCAAGGAGTTCCTGCAGTCGTTTGTGCACA
TCGTGCAGATGTTTATTAACACCTCTTCTGGCGGTGGGGGATCGGGGGGGGGCGGCTCCGGCGGTGGC
GGTTCTGGAGGCGGTGGTTCTGGCGGGGGATCTTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCGATCACTCTCATT
TCCGTGAACGGCATTTCGTCATTTGCTGTTGACCTACTGCTTTGCTCCGAGGTGTCGCGAGCGTCGCC
GCAACGAGCGCCTACGGCGGGAATCGGTGAGGCCCGTG (SEQ ID NO:323)

|(圖 36J)|

信號序列: MDWTWILFLVAAATRVHS (SEQ ID NO:252)
信號序列: MYRMQLLSCIALSLALVTNS (SEQ ID NO:254)
連接子(Lr1): SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ (SEQ ID NO:246)
錨(Ar2): (人類B7.1跨膜-分子內胺基酸序列)
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:239)
弗林蛋白酶A-P2A序列: RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:251)
)

經栓繫之II-2
MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTL
SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:324)

經栓繫之II-2
ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGTTGAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAATTTCCATCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTGGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGTCGGGCGGTGGGGGCTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTGCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGTGA (SEQ ID NO:325)

|(圖 3'A)|

經栓繫之IL-12

MDWTWILFLVAAATRVHSIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS
SDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQL
KPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEW
ASVPCSGGGGGGSRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPL
ELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELM
QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:326)

經栓繫之IL-12

ATGTATCGGATGCAGCTGCTGTCTTGTATTGCTCTATCACTGGCGCTGGTGACCAACTCCGCTCCTACTTCCAGCTC
GACCAAGAAGACCCAGCTCCAACTTGAGCACCTGCTGCTTGATCTTCAGATGATCCTGAACGGCATCAACAACTAC
AAAAACCCCAAGCTGACCCGCATGCTCACTTTCAAGTTCTACATGCCTAAAAAGGCCACCGAGCTCAAGCACTTGC
AGTGCCTGGAGGAGGAGTTGAAGCCGTTGGAAGAGGTGCTCAACCTGGCCCAGTCCAAGAATTTCCATCTAAGAC
CCCGCGACCTGATCTCTAACATCAACGTGATTGTACTGGAGCTGAAGGGCTCCGAGACCACCTTCATGTGCGAGTA
CGCGGACGAGACTGCAACCATCGTGGAGTTCCTGAACCGCTGGATCACGTTCTGTCAGAGCATCATCTCGACCCTT
ACATCTGGCGGCGGGGGGGTCGGGCGGTGGGGGCTCTGGAGGAGGCGGTAGTGGGGGTGGCGGCTCCGGTGGA
GGCAGCCTGCAGCTGCTCCCAAGTTGGGCCATCACCCTGATTAGCGTCAATGGCATCTTCGTCATATGTTGTCTGA
CCTACTGCTTTGCCCCCCGCTGCCGAGAACGTCGCCGCAACGAGCGGCTGCGCAGGGAGTCCGTGCGCCCGGTGTT
GA (SEQ ID NO:327)

|(圖 3'/B)|

經枝鍵之IL-15
MDWTWILFLVAAATRVHSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDT
VENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSLQ
LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:328)

經枝鍵之IL-15
ATGGATTGGACCTGGATCCTGTTCCTGGTGGCTGCGGCCACCCGTGTACACAGCAACTGGGTCAATGTGATCTCCG
ACCTGAAGAAGATTGAGGACCTCATCCAGTCTATGCACATTGACGCAACACTTTACACCGAGAGCGATGTGCACCC
CTCTTGCAAGGTGACTGCCATGAAATGTTTCTTGCTCGAATTGCAGGTCATCTCTCTGGAGAGTGGGGACGCTTCC
ATACATGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTCTCGTCAAATGGCAACGTGACTGAGAGC
GGGTGCAAAGAGTGTGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACATCAAGGAGTTCCTGCAGAGCTTCGTCCACATCGTGCA
GATGTTTATTAACACGTCGTCCGGAGGCGGGGGCTCTGGTGGCGGCGGCTCCGGGGGAGGCGGCTCCGGTGGC
GGTGGTTCCGGCGGAGGCTCGCTACAGCTGCTGCCCAGTTGGGCCATCACCCTTATTTCTGTCAACGGCATCTTCG
TTATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTTGCGCCGAGGTGTCGCGAGCGGCGTCGCAACGAGCGCCTGCGCCGAGAAT
CCGTGCGCCCTGTGTGA (SEQ ID NO:329)

CD40L
MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLL
NCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTASVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQ
LTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNV
TDPSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO:273)

CD40L
ATGATCGAGACCTACAACCAGACTTCCCCACGTAGCGCCGCCACTGGTCTACCCATCTCGATGAAAATCTTCATGTA
TCTGCTGACCGTGTTCCTGATCACCCAGATGATTGGCTCCGCTCTGTTTGCCGTGTACTTGCACCGCCGCCTGGACA
AAATTGAGGACGAGCGGAATCTGCACGAAGATTTCGTATTTATGAAGACCATCCAGAGGTGTAACACTGGCGAGC
GTTTCTCTTTCGTTGCTTAACTGCGAAGAGATCAAGAGCCAGTTCGAGGGCTTCGTCAAGGACATCATGCTCAACAA
GGAGGAGACTAAGAAGGAGAACTCCTTTGAGATGCAGAAGGGTGATCAGAACCCCCAAATTGCAGCGCATGTGA
TAAGCGAGGCTTCCTCCAAGACAACCAGTGTGCTGCAGTGGGCGGAGAAGGGCTACTACACCATGTCAAATAACC
TGGTGACCCTGGAGAACGGCAAGCAGCTGACGGTGAAGCGCCAGGGGCTCTATTACATCTACGCGCAGGTCACG
TTCTGTTCGAACCGCGAAGCCTCCTCTCAGGCTCCCTTCATCGCCTCACTGTGCCTGAAATCTCCGGGACGCTTCGA
GCGAATCCTGCTCCGCGCCGCCAACACGCACTCCTCCGCCAAGCCTTGCGGGCAGCAGAGCATCCACCTTGGTGG
GGTTTTTGAGCTGCAGCCTGGCGCGTCCGTGTTCGTCAACGTGACCGACCCGTCCCAGGTCTCTCATGGAACCGGC
TTCACCTCCTTCGGCCTGCTCAAGTTG (SEQ ID NO:321)

(圖 3/C)

GFP
ATGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCC
GACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCA
AGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCA
GCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACT
ACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA
CCGCCGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGA (SEQ ID NO:330)

經枝鑿之II-21
MDWTWILFLVAAATRVHSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQK
AQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRT
HGSEDSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQLLPSWAITLISVNGIFVICC
LTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO:402)

|(圖 3'/D)|

圖 38A7

圖3-3
第一層
第二層
第三層
第四層
第五層

圖 3C01
動態漸變
動態漸變
動態漸變

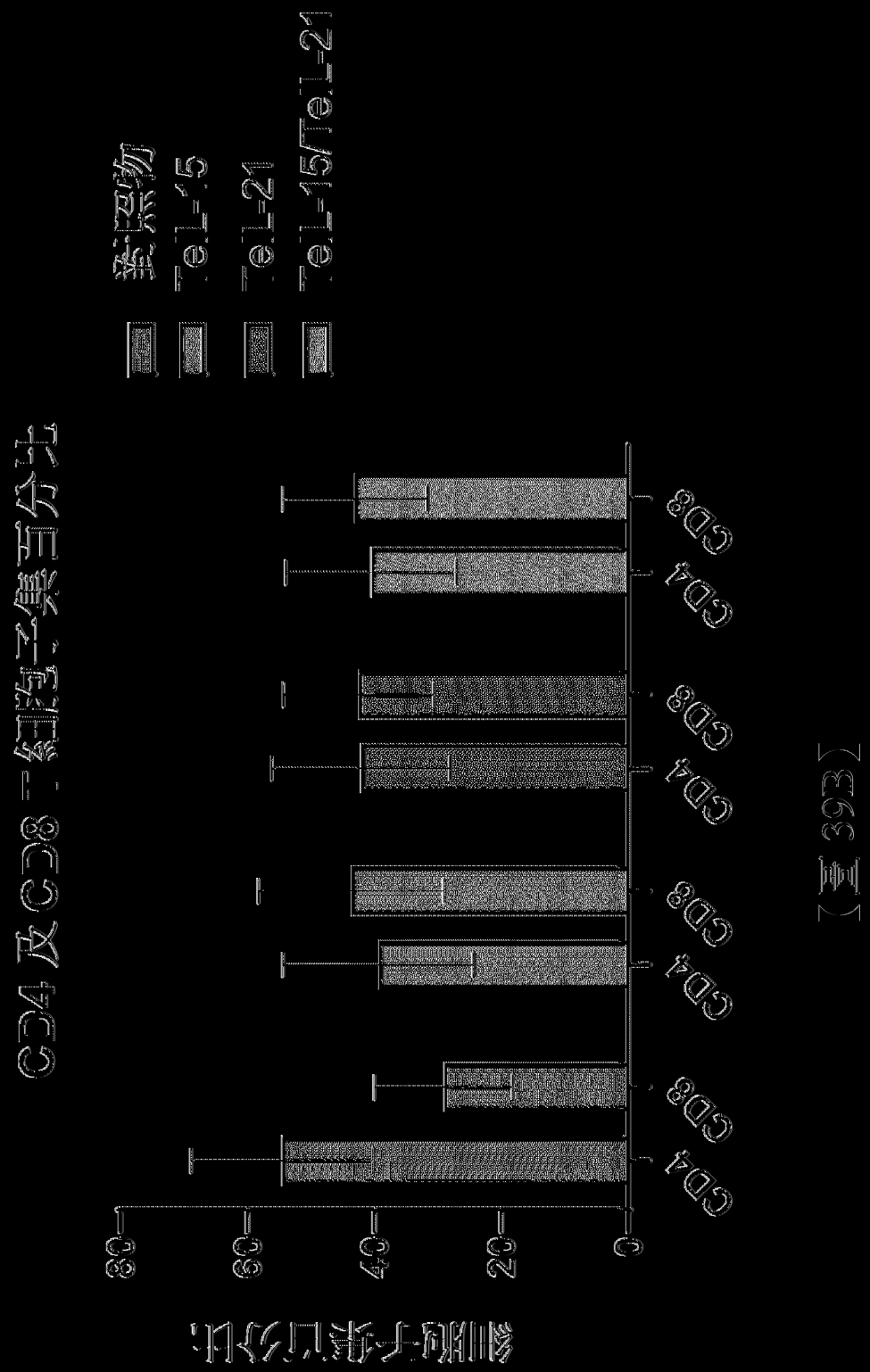
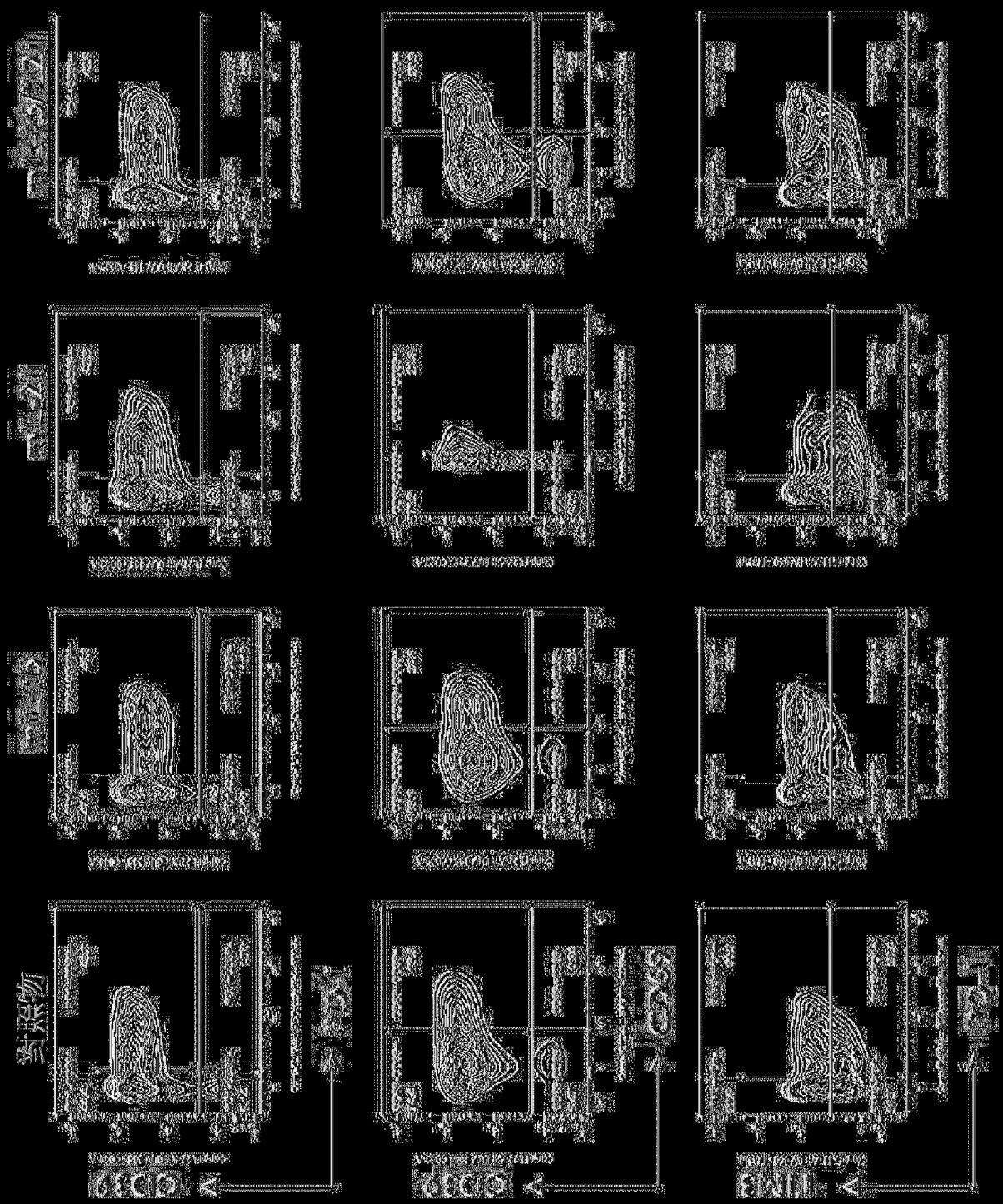

無刺激
Te1_15
Te1_21
Te1_15/Te1_21
CD4 及 CD8 二維表面標記分析
CD4
CD8
細胞介素濃度
0
2
4
8
16

圖 39B



(407)
(403)

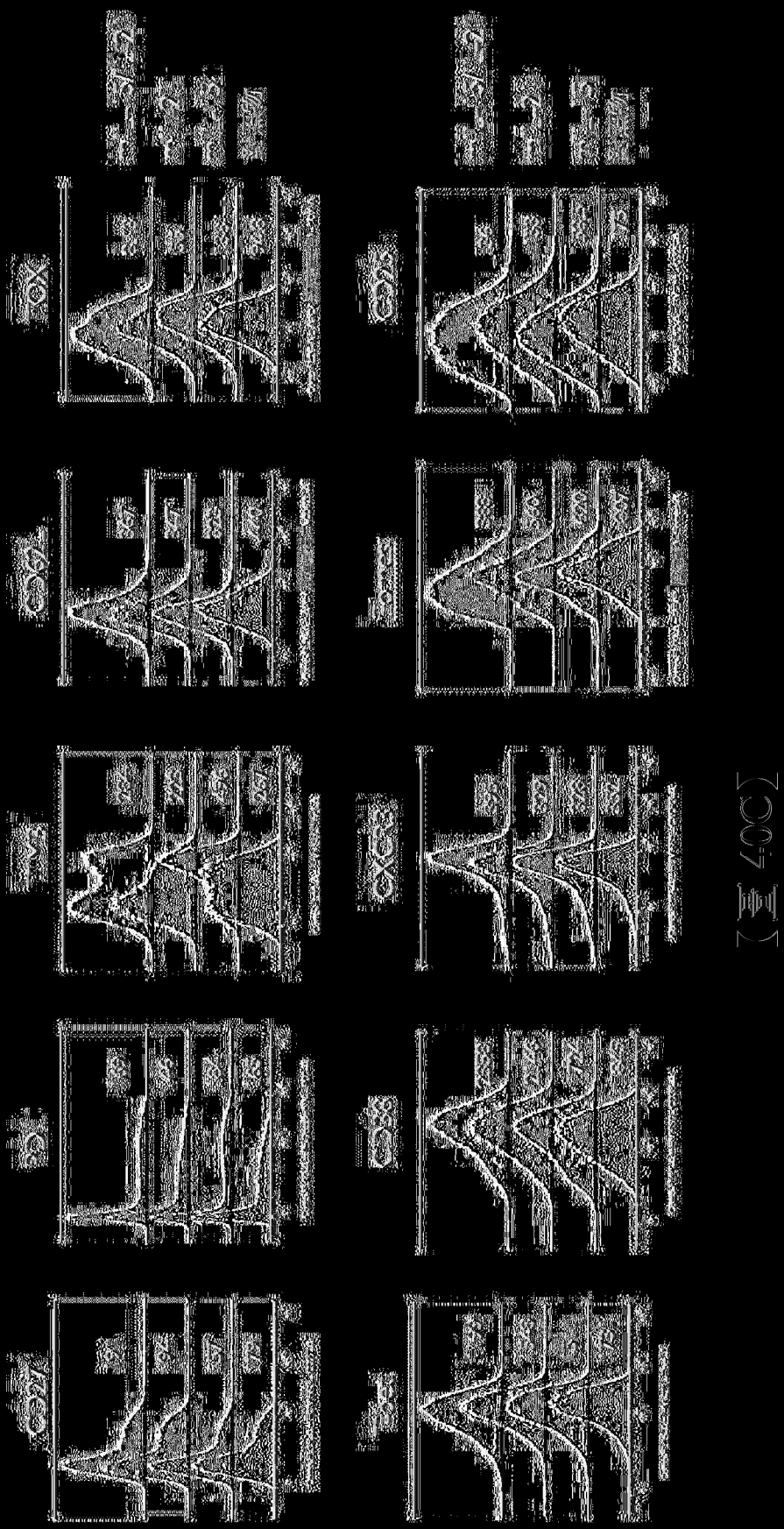


FIG. 7

(圖43)

表面粗糙分析
對照物
W1=0.68
D2=0.68
525
523
667
522
526
526
526

使用者端裝置
藍色設備條參之生物感分析法
使用者端裝置
使用者端裝置
使用者端裝置

圖 (17)

圖 1
第一實施例
第一透鏡
第二透鏡
第三透鏡
第四透鏡
第五透鏡
第六透鏡
第七透鏡
第八透鏡
第九透鏡
第十透鏡
第十一透鏡
第十二透鏡
第十三透鏡
第十四透鏡
第十五透鏡
第十六透鏡
第十七透鏡
第十八透鏡
第十九透鏡
第二十透鏡
第二十一透鏡
第二十二透鏡
第二十三透鏡
第二十四透鏡
第二十五透鏡
第二十六透鏡
第二十七透鏡
第二十八透鏡
第二十九透鏡
第三十透鏡
第三十一透鏡
第三十二透鏡
第三十三透鏡
第三十四透鏡
第三十五透鏡
第三十六透鏡
第三十七透鏡
第三十八透鏡
第三十九透鏡
第四十透鏡
第四十一透鏡
第四十二透鏡
第四十三透鏡
第四十四透鏡
第四十五透鏡
第四十六透鏡
第四十七透鏡
第四十八透鏡
第四十九透鏡
第五十透鏡
第五十一透鏡
第五十二透鏡
第五十三透鏡
第五十四透鏡
第五十五透鏡
第五十六透鏡
第五十七透鏡
第五十八透鏡
第五十九透鏡
第六十透鏡
第六十一透鏡
第六十二透鏡
第六十三透鏡
第六十四透鏡
第六十五透鏡
第六十六透鏡
第六十七透鏡
第六十八透鏡
第六十九透鏡
第七十透鏡
第七十一透鏡
第七十二透鏡
第七十三透鏡
第七十四透鏡
第七十五透鏡
第七十六透鏡
第七十七透鏡
第七十八透鏡
第七十九透鏡
第八十透鏡
第八十一透鏡
第八十二透鏡
第八十三透鏡
第八十四透鏡
第八十五透鏡
第八十六透鏡
第八十七透鏡
第八十八透鏡
第八十九透鏡
第九十透鏡
第九十一透鏡
第九十二透鏡
第九十三透鏡
第九十四透鏡
第九十五透鏡
第九十六透鏡
第九十七透鏡
第九十八透鏡
第九十九透鏡
第一百透鏡
第一百一透鏡
第一百二透鏡
第一百三透鏡
第一百四透鏡
第一百五透鏡
第一百六透鏡
第一百七透鏡
第一百八透鏡
第一百九透鏡
第一百十透鏡
第一百十一透鏡
第一百十二透鏡
第一百十三透鏡
第一百十四透鏡
第一百十五透鏡
第一百十六透鏡
第一百十七透鏡
第一百十八透鏡
第一百十九透鏡
第一百二十透鏡
第一百二十一透鏡
第一百二十二透鏡
第一百二十三透鏡
第一百二十四透鏡
第一百二十五透鏡
第一百二十六透鏡
第一百二十七透鏡
第一百二十八透鏡
第一百二十九透鏡
第一百三十透鏡
第一百三十一透鏡
第一百三十二透鏡
第一百三十三透鏡
第一百三十四透鏡
第一百三十五透鏡
第一百三十六透鏡
第一百三十七透鏡
第一百三十八透鏡
第一百三十九透鏡
第一百四十透鏡
第一百四十一透鏡
第一百四十二透鏡
第一百四十三透鏡
第一百四十四透鏡
第一百四十五透鏡
第一百四十六透鏡
第一百四十七透鏡
第一百四十八透鏡
第一百四十九透鏡
第一百五十透鏡
第一百五十一透鏡
第一百五十二透鏡
第一百五十三透鏡
第一百五十四透鏡
第一百五十五透鏡
第一百五十六透鏡
第一百五十七透鏡
第一百五十八透鏡
第一百五十九透鏡
第一百六十透鏡
第一百六十一透鏡
第一百六十二透鏡
第一百六十三透鏡
第一百六十四透鏡
第一百六十五透鏡
第一百六十六透鏡
第一百六十七透鏡
第一百六十八透鏡
第一百六十九透鏡
第一百七十透鏡
第一百七十一透鏡
第一百七十二透鏡
第一百七十三透鏡
第一百七十四透鏡
第一百七十五透鏡
第一百七十六透鏡
第一百七十七透鏡
第一百七十八透鏡
第一百七十九透鏡
第一百八十透鏡
第一百八十一透鏡
第一百八十二透鏡
第一百八十三透鏡
第一百八十四透鏡
第一百八十五透鏡
第一百八十六透鏡
第一百八十七透鏡
第一百八十八透鏡
第一百八十九透鏡
第一百九十透鏡
第一百九十一透鏡
第一百九十二透鏡
第一百九十三透鏡
第一百九十四透鏡
第一百九十五透鏡
第一百九十六透鏡
第一百九十七透鏡
第一百九十八透鏡
第一百九十九透鏡
第二百透鏡

細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率
細胞毒性百分比平均值
細胞存活率

【圖 46A】

習知解壓之加熱盤分析(SEM)
被包圍部分
鍍金屬膜層
鍍金屬膜層包圍部分
本發明解壓之加熱盤分析(SEM)
鍍金屬膜層包圍部分
鍍金屬膜層

【圖7】

重複測試之ROR分析(5min)
錯誤屏蔽照物門分比:
錯誤屏蔽照物門分比:
無錯誤
有錯誤
無錯誤
有錯誤
錯誤屏蔽照物門分比:
錯誤屏蔽照物門分比:
無錯誤
有錯誤
無錯誤
有錯誤

圖 4C

【圖7A】

第二無線通訊裝置
第一無線通訊裝置
電子裝置

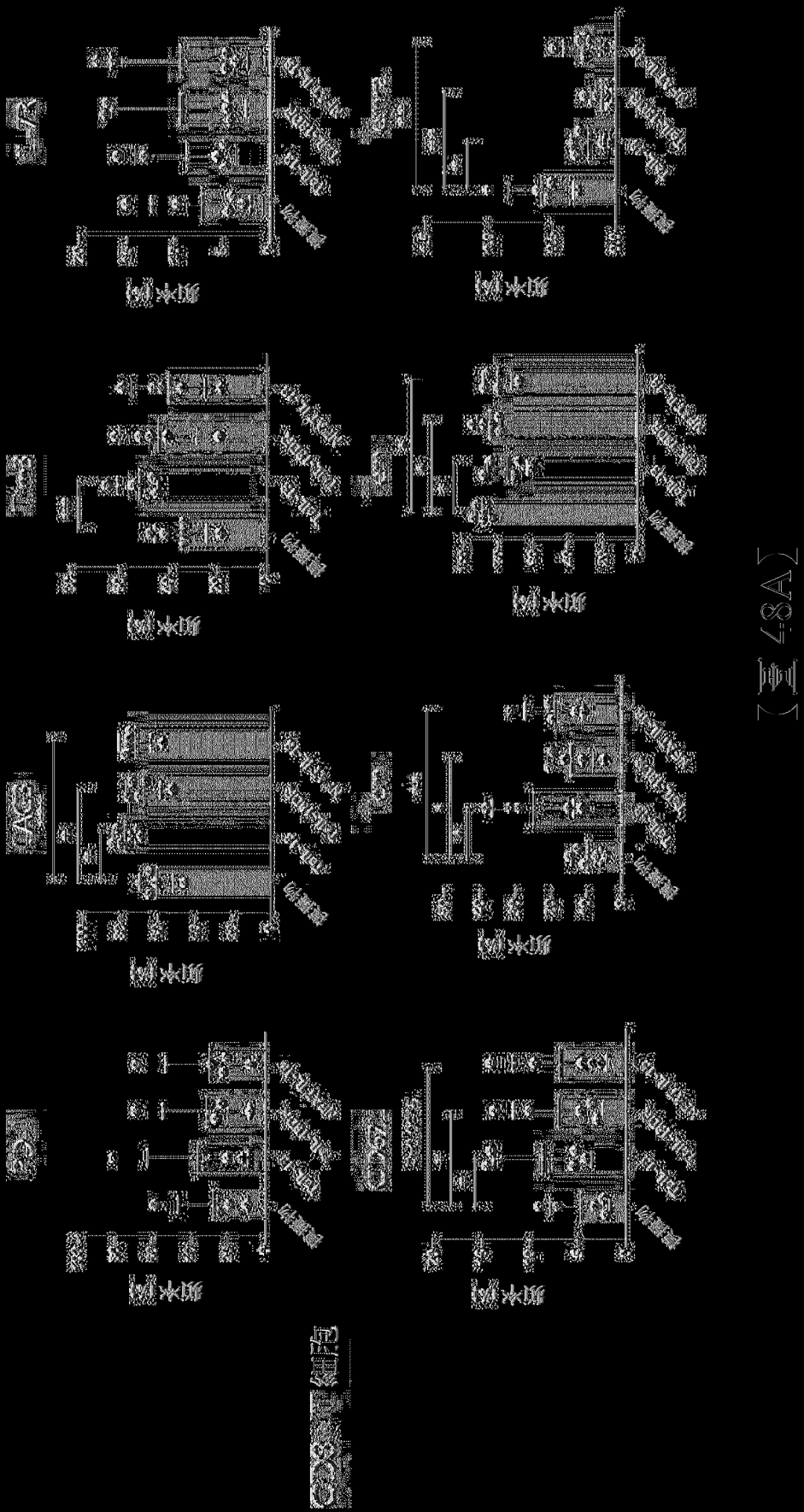
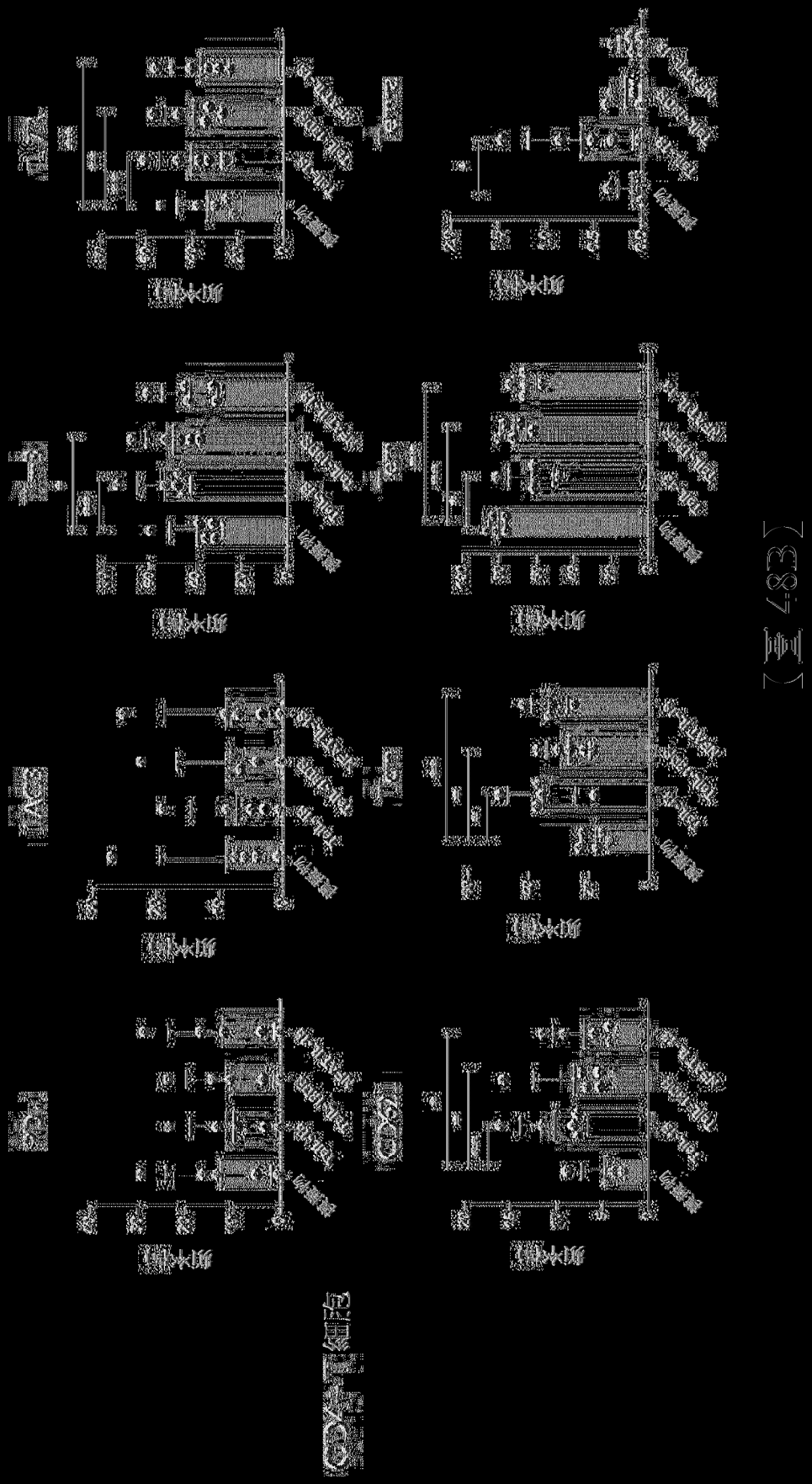
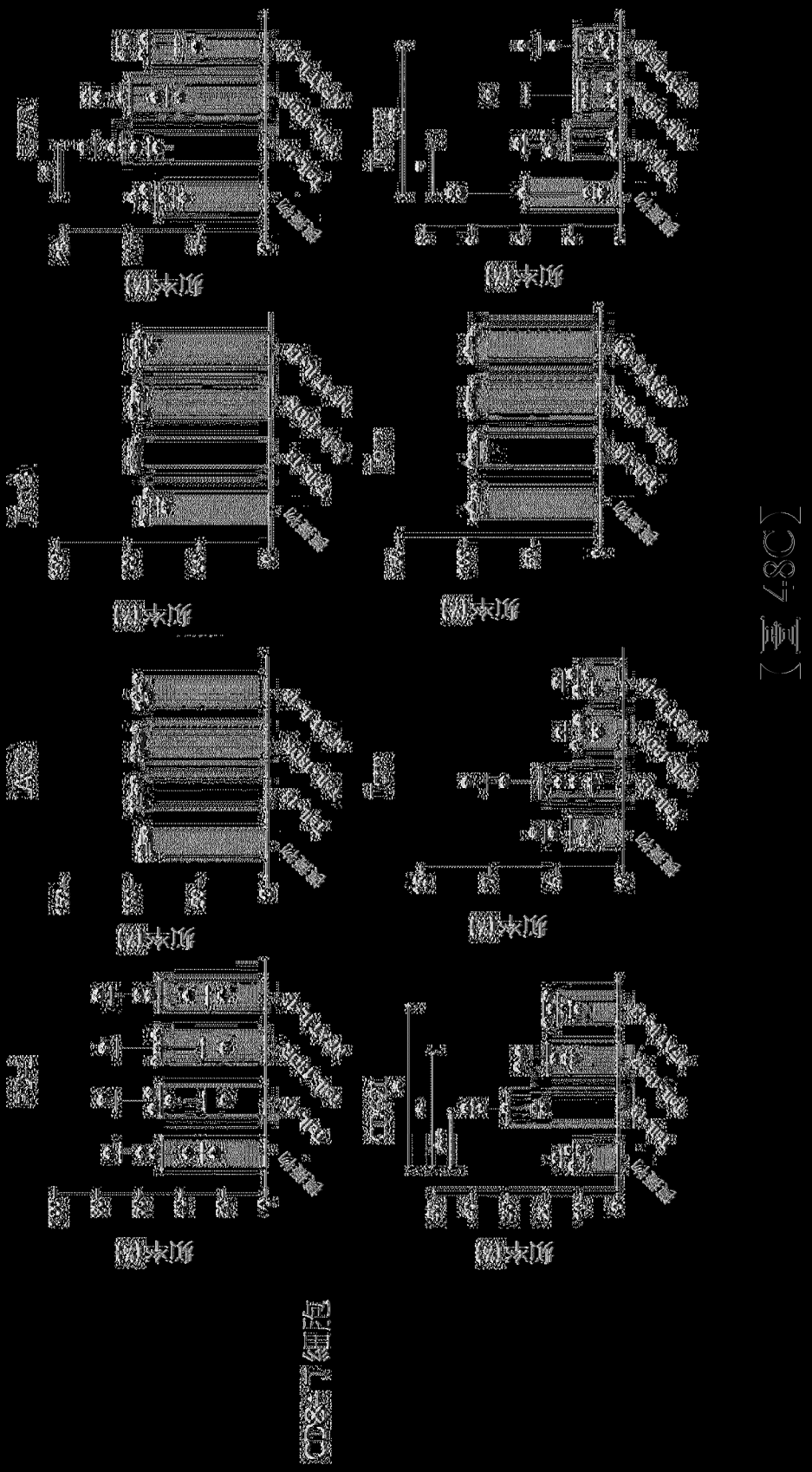


圖 4-8A





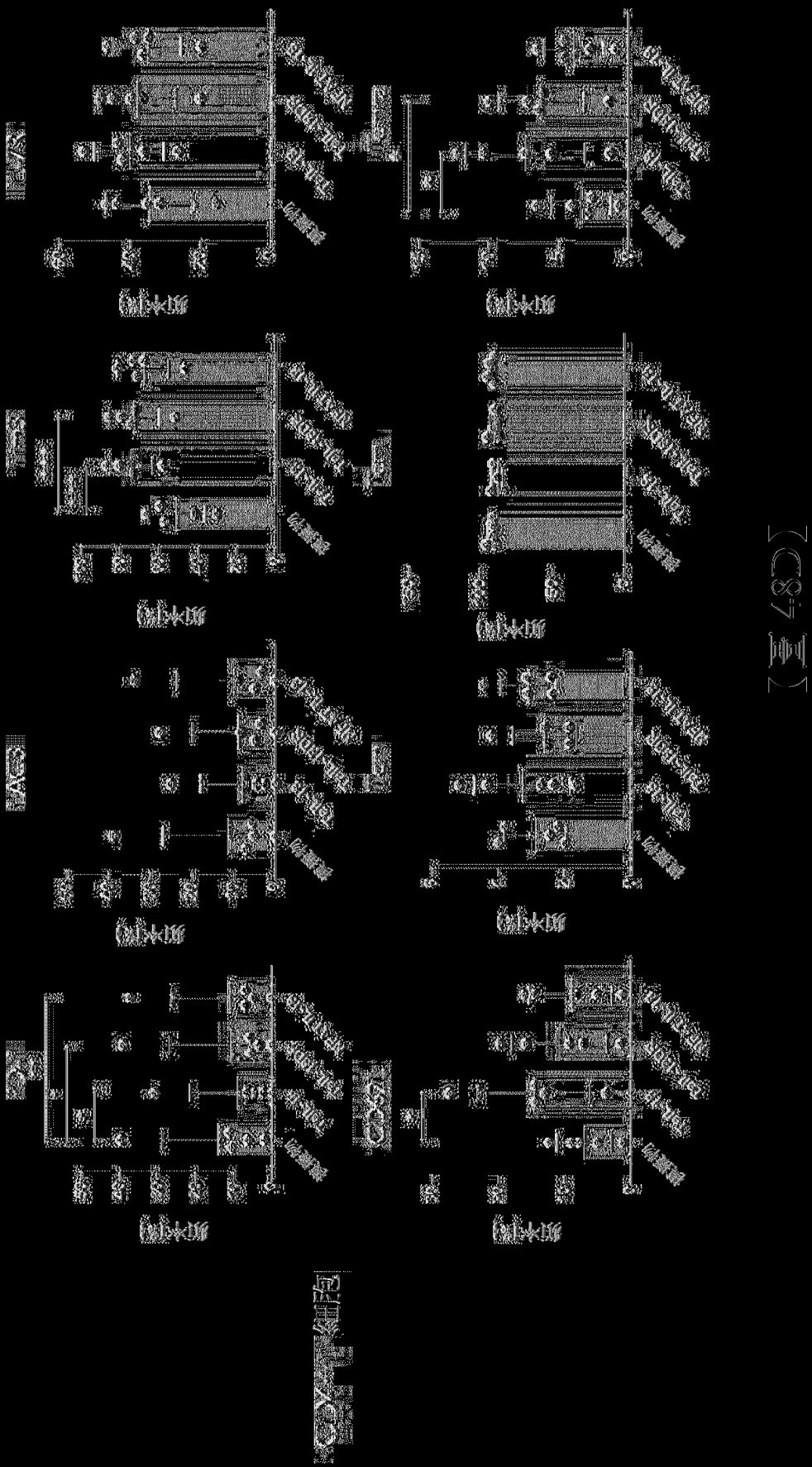
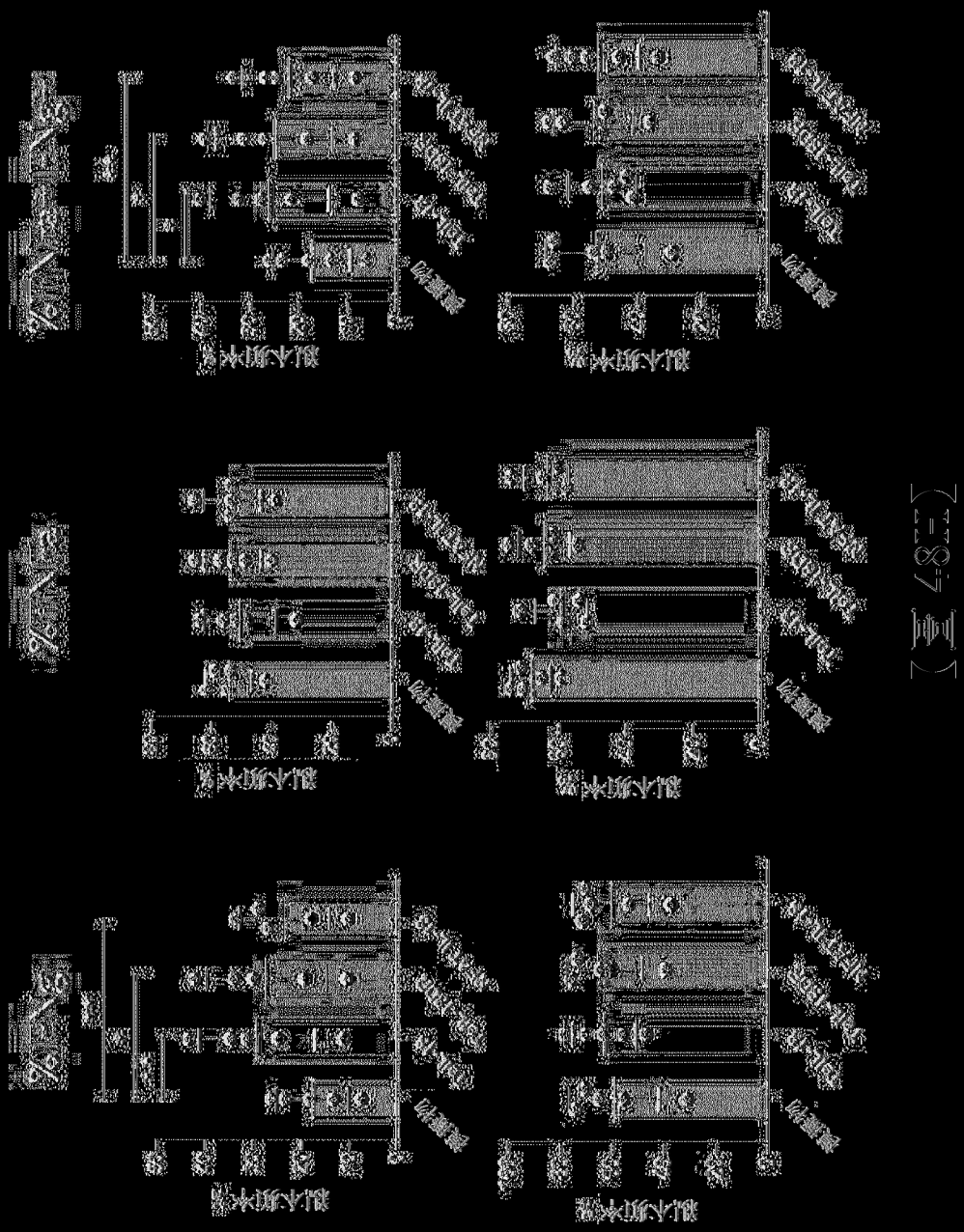


圖 3-3

圖3-7



(圖49A)

圖 6B

圖 3

（圖52A）

（圖 23）

感測物
相關電路元件
圖3

第一導電層
第二導電層
第三導電層
第四導電層
第一導電層
第二導電層
第三導電層
第四導電層
第一導電層
第二導電層
第三導電層
第四導電層

圖式
第一層
第二層
第三層
第四層
第五層
第六層
第七層
第八層
第九層
第十層
第十一層
第十二層
第十三層
第十四層
第十五層
第十六層
第十七層
第十八層
第十九層
第二十層
第二十一層
第二十二層
第二十三層
第二十四層
第二十五層
第二十六層
第二十七層
第二十八層
第二十九層
第三十層
第三十一層
第三十二層
第三十三層
第三十四層
第三十五層
第三十六層
第三十七層
第三十八層
第三十九層
第四十層
第四十一層
第四十二層
第四十三層
第四十四層
第四十五層
第四十六層
第四十七層
第四十八層
第四十九層
第五十層
第五十一層
第五十二層
第五十三層
第五十四層
第五十五層
第五十六層
第五十七層
第五十八層
第五十九層
第六十層
第六十一層
第六十二層
第六十三層
第六十四層
第六十五層
第六十六層
第六十七層
第六十八層
第六十九層
第七十層
第七十一層
第七十二層
第七十三層
第七十四層
第七十五層
第七十六層
第七十七層
第七十八層
第七十九層
第八十層
第八十一層
第八十二層
第八十三層
第八十四層
第八十五層
第八十六層
第八十七層
第八十八層
第八十九層
第九十層
第九十一層
第九十二層
第九十三層
第九十四層
第九十五層
第九十六層
第九十七層
第九十八層
第九十九層
第一百層
第一百一層
第一百二層
第一百三層
第一百四層
第一百五層
第一百六層
第一百七層
第一百八層
第一百九層
第一百十層
第一百十一層
第一百十二層
第一百十三層
第一百十四層
第一百十五層
第一百十六層
第一百十七層
第一百十八層
第一百十九層
第一百二十層
第一百二十一層
第一百二十二層
第一百二十三層
第一百二十四層
第一百二十五層
第一百二十六層
第一百二十七層
第一百二十八層
第一百二十九層
第一百三十層
第一百三十一層
第一百三十二層
第一百三十三層
第一百三十四層
第一百三十五層
第一百三十六層
第一百三十七層
第一百三十八層
第一百三十九層
第一百四十層
第一百四十一層
第一百四十二層
第一百四十三層
第一百四十四層
第一百四十五層
第一百四十六層
第一百四十七層
第一百四十八層
第一百四十九層
第一百五十層
第一百五十一層
第一百五十二層
第一百五十三層
第一百五十四層
第一百五十五層
第一百五十六層
第一百五十七層
第一百五十八層
第一百五十九層
第一百六十層
第一百六十一層
第一百六十二層
第一百六十三層
第一百六十四層
第一百六十五層
第一百六十六層
第一百六十七層
第一百六十八層
第一百六十九層
第一百七十層
第一百七十一層
第一百七十二層
第一百七十三層
第一百七十四層
第一百七十五層
第一百七十六層
第一百七十七層
第一百七十八層
第一百七十九層
第一百八十層
第一百八十一層
第一百八十二層
第一百八十三層
第一百八十四層
第一百八十五層
第一百八十六層
第一百八十七層
第一百八十八層
第一百八十九層
第一百九十層
第一百九十一層
第一百九十二層
第一百九十三層
第一百九十四層
第一百九十五層
第一百九十六層
第一百九十七層
第一百九十八層
第一百九十九層
第二百層
第二百一層
第二百二層
第二百三層
第二百四層
第二百五層
第二百六層
第二百七層
第二百八層
第二百九層
第二百十層
第二百十一層
第二百十二層
第二百十三層
第二百十四層
第二百十五層
第二百十六層
第二百十七層
第二百十八層
第二百十九層
第二百二十層
第二百二十一層
第二百二十二層
第二百二十三層
第二百二十四層
第二百二十五層
第二百二十六層
第二百二十七層
第二百二十八層
第二百二十九層
第二百三十層
第二百三十一層
第二百三十二層
第二百三十三層
第二百三十四層
第二百三十五層
第二百三十六層
第二百三十七層
第二百三十八層
第二百三十九層
第二百四十層
第二百四十一層
第二百四十二層
第二百四十三層
第二百四十四層
第二百四十五層
第二百四十六層
第二百四十七層
第二百四十八層
第二百四十九層
第二百五十層
第二百五十一層
第二百五十二層
第二百五十三層
第二百五十四層
第二百五十五層
第二百五十六層
第二百五十七層
第二百五十八層
第二百五十九層
第二百六十層
第二百六十一層
第二百六十二層
第二百六十三層
第二百六十四層
第二百六十五層
第二百六十六層
第二百六十七層
第二百六十八層
第二百六十九層
第二百七十層
第二百七十一層
第二百七十二層
第二百七十三層
第二百七十四層
第二百七十五層
第二百七十六層
第二百七十七層
第二百七十八層
第二百七十九層
第二百八十層
第二百八十一層
第二百八十二層
第二百八十三層
第二百八十四層
第二百八十五層
第二百八十六層
第二百八十七層
第二百八十八層
第二百八十九層
第二百九十層
第二百九十一層
第二百九十二層
第二百九十三層
第二百九十四層
第二百九十五層
第二百九十六層
第二百九十七層
第二百九十八層
第二百九十九層
第三百層
第三百一層
第三百二層
第三百三層
第三百四層
第三百五層
第三百六層
第三百七層
第三百八層
第三百九層
第三百十層
第三百十一層
第三百十二層
第三百十三層
第三百十四層
第三百十五層
第三百十六層
第三百十七層
第三百十八層
第三百十九層
第三百二十層
第三百二十一層
第三百二十二層
第三百二十三層
第三百二十四層
第三百二十五層
第三百二十六層
第三百二十七層
第三百二十八層
第三百二十九層
第三百三十層
第三百三十一層
第三百三十二層
第三百三十三層
第三百三十四層
第三百三十五層
第三百三十六層
第三百三十七層
第三百三十八層
第三百三十九層
第三百四十層
第三百四十一層
第三百四十二層
第三百四十三層
第三百四十四層
第三百四十五層
第三百四十六層
第三百四十七層
第三百四十八層
第三百四十九層
第三百五十層
第三百五十一層
第三百五十二層
第三百五十三層
第三百五十四層
第三百五十五層
第三百五十六層
第三百五十七層
第三百五十八層
第三百五十九層
第三百六十層
第三百六十一層
第三百六十二層
第三百六十三層
第三百六十四層
第三百六十五層
第三百六十六層
第三百六十七層
第三百六十八層
第三百六十九層
第三百七十層
第三百七十一層
第三百七十二層
第三百七十三層
第三百七十四層
第三百七十五層
第三百七十六層
第三百七十七層
第三百七十八層
第三百七十九層
第三百八十層
第三百八十一層
第三百八十二層
第三百八十三層
第三百八十四層
第三百八十五層
第三百八十六層
第三百八十七層
第三百八十八層
第三百八十九層
第三百九十層
第三百九十一層
第三百九十二層
第三百九十三層
第三百九十四層
第三百九十五層
第三百九十六層
第三百九十七層
第三百九十八層
第三百九十九層
第四百層
第四百一層
第四百二層
第四百三層
第四百四層
第四百五層
第四百六層
第四百七層
第四百八層
第四百九層
第四百十層
第四百十一層
第四百十二層
第四百十三層
第四百十四層
第四百十五層
第四百十六層
第四百十七層
第四百十八層
第四百十九層
第四百二十層
第四百二十一層
第四百二十二層
第四百二十三層
第四百二十四層
第四百二十五層
第四百二十六層
第四百二十七層
第四百二十八層
第四百二十九層
第四百三十層
第四百三十一層
第四百三十二層
第四百三十三層
第四百三十四層
第四百三十五層
第四百三十六層
第四百三十七層
第四百三十八層
第四百三十九層
第四百四十層
第四百四十一層
第四百四十二層
第四百四十三層
第四百四十四層
第四百四十五層
第四百四十六層
第四百四十七層
第四百四十八層
第四百四十九層
第四百五十層
第四百五十一層
第四百五十二層
第四百五十三層
第四百五十四層
第四百五十五層
第四百五十六層
第四百五十七層
第四百五十八層
第四百五十九層
第四百六十層
第四百六十一層
第四百六十二層
第四百六十三層
第四百六十四層
第四百六十五層
第四百六十六層
第四百六十七層
第四百六十八層
第四百六十九層
第四百七十層
第四百七十一層
第四百七十二層
第四百七十三層
第四百七十四層
第四百七十五層
第四百七十六層
第四百七十七層
第四百七十八層
第四百七十九層
第四百八十層
第四百八十一層
第四百八十二層
第四百八十三層
第四百八十四層
第四百八十五層
第四百八十六層
第四百八十七層
第四百八十八層
第四百八十九層
第四百九十層
第四百九十一層
第四百九十二層
第四百九十三層
第四百九十四層
第四百九十五層
第四百九十六層
第四百九十七層
第四百九十八層
第四百九十九層
第五百層
第五百一層
第五百二層
第五百三層
第五百四層
第五百五層
第五百六層
第五百七層
第五百八層
第五百九層
第五百十層
第五百十一層
第五百十二層
第五百十三層
第五百十四層
第五百十五層
第五百十六層
第五百十七層
第五百十八層
第五百十九層
第五百二十層
第五百二十一層
第五百二十二層
第五百二十三層
第五百二十四層
第五百二十五層
第五百二十六層
第五百二十七層
第五百二十八層
第五百二十九層
第五百三十層
第五百三十一層
第五百三十二層
第五百三十三層
第五百三十四層
第五百三十五層
第五百三十六層
第五百三十七層
第五百三十八層
第五百三十九層
第五百四十層
第五百四十一層
第五百四十二層
第五百四十三層
第五百四十四層
第五百四十五層
第五百四十六層
第五百四十七層
第五百四十八層
第五百四十九層
第五百五十層
第五百五十一層
第五百五十二層
第五百五十三層
第五百五十四層
第五百五十五層
第五百五十六層
第五百五十七層
第五百五十八層
第五百五十九層
第五百六十層
第五百六十一層
第五百六十二層
第五百六十三層
第五百六十四層
第五百六十五層
第五百六十六層
第五百六十七層
第五百六十八層
第五百六十九層
第五百七十層
第五百七十一層
第五百七十二層
第五百七十三層
第五百七十四層
第五百七十五層
第五百七十六層
第五百七十七層
第五百七十八層
第五百七十九層
第五百八十層
第五百八十一層
第五百八十二層
第五百八十三層
第五百八十四層
第五百八十五層
第五百八十六層
第五百八十七層
第五百八十八層
第五百八十九層
第五百九十層
第五百九十一層
第五百九十二層
第五百九十三層
第五百九十四層
第五百九十五層
第五百九十六層
第五百九十七層
第五百九十八層
第五百九十九層
第六百層
第六百一層
第六百二層
第六百三層
第六百四層
第六百五層
第六百六層
第六百七層
第六百八層
第六百九層
第六百十層
第六百十一層
第六百十二層
第六百十三層
第六百十四層
第六百十五層
第六百十六層
第六百十七層
第六百十八層
第六百十九層
第六百二十層
第六百二十一層
第六百二十二層
第六百二十三層
第六百二十四層
第六百二十五層
第六百二十六層
第六百二十七層
第六百二十八層
第六百二十九層
第六百三十層
第六百三十一層
第六百三十二層
第六百三十三層
第六百三十四層
第六百三十五層
第六百三十六層
第六百三十七層
第六百三十八層
第六百三十九層
第六百四十層
第六百四十一層
第六百四十二層
第六百四十三層
第六百四十四層
第六百四十五層
第六百四十六層
第六百四十七層
第六百四十八層
第六百四十九層
第六百五十層
第六百五十一層
第六百五十二層
第六百五十三層
第六百五十四層
第六百五十五層
第六百五十六層
第六百五十七層
第六百五十八層
第六百五十九層
第六百六十層
第六百六十一層
第六百六十二層
第六百六十三層
第六百六十四層
第六百六十五層
第六百六十六層
第六百六十七層
第六百六十八層
第六百六十九層
第六百七十層
第六百七十一層
第六百七十二層
第六百七十三層
第六百七十四層
第六百七十五層
第六百七十六層
第六百七十七層
第六百七十八層
第六百七十九層
第六百八十層
第六百八十一層
第六百八十二層
第六百八十三層
第六百八十四層
第六百八十五層
第六百八十六層
第六百八十七層
第六百八十八層
第六百八十九層
第六百九十層
第六百九十一層
第六百九十二層
第六百九十三層
第六百九十四層
第六百九十五層
第六百九十六層
第六百九十七層
第六百九十八層
第六百九十九層
第七百層
第七百一層
第七百二層
第七百三層
第七百四層
第七百五層
第七百六層
第七百七層
第七百八層
第七百九層
第七百十層
第七百十一層
第七百十二層
第七百十三層
第七百十四層
第七百十五層
第七百十六層
第七百十七層
第七百十八層
第七百十九層
第七百二十層
第七百二十一層
第七百二十二層
第七百二十三層
第七百二十四層
第七百二十五層
第七百二十六層
第七百二十七層
第七百二十八層
第七百二十九層
第七百三十層
第七百三十一層
第七百三十二層
第七百三十三層
第七百三十四層
第七百三十五層
第七百三十六層
第七百三十七層
第七百三十八層
第七百三十九層
第七百四十層
第七百四十一層
第七百四十二層
第七百四十三層
第七百四十四層
第七百四十五層
第七百四十六層
第七百四十七層
第七百四十八層
第七百四十九層
第七百五十層
第七百五十一層
第七百五十二層
第七百五十三層
第七百五十四層
第七百五十五層
第七百五十六層
第七百五十七層
第七百五十八層
第七百五十九層
第七百六十層
第七百六十一層
第七百六十二層
第七百六十三層
第七百六十四層
第七百六十五層
第七百六十六層
第七百六十七層
第七百六十八層
第七百六十九層
第七百七十層
第七百七十一層
第七百七十二層
第七百七十三層
第七百七十四層
第七百七十五層
第七百七十六層
第七百七十七層
第七百七十八層
第七百七十九層
第七百八十層
第七百八十一層
第七百八十二層
第七百八十三層
第七百八十四層
第七百八十五層
第七百八十六層
第七百八十七層
第七百八十八層
第七百八十九層
第七百九十層
第七百九十一層
第七百九十二層
第七百九十三層
第七百九十四層
第七百九十五層
第七百九十六層
第七百九十七層
第七百九十八層
第七百九十九層
第八百層
第八百一層
第八百二層
第八百三層
第八百四層
第八百五層
第八百六層
第八百七層
第八百八層
第八百九層
第八百十層
第八百十一層
第八百十二層
第八百十三層
第八百十四層
第八百十五層
第八百十六層
第八百十七層
第八百十八層
第八百十九層
第八百二十層
第八百二十一層
第八百二十二層
第八百二十三層
第八百二十四層
第八百二十五層
第八百二十六層
第八百二十七層
第八百二十八層
第八百二十九層
第八百三十層
第八百三十一層
第八百三十二層
第八百三十三層
第八百三十四層
第八百三十五層
第八百三十六層
第八百三十七層
第八百三十八層
第八百三十九層
第八百四十層
第八百四十一層
第八百四十二層
第八百四十三層
第八百四十四層
第八百四十五層
第八百四十六層
第八百四十七層
第八百四十八層
第八百四十九層
第八百五十層
第八百五十一層
第八百五十二層
第八百五十三層
第八百五十四層
第八百五十五層
第八百五十六層
第八百五十七層
第八百五十八層
第八百五十九層
第八百六十層
第八百六十一層
第八百六十二層
第八百六十三層
第八百六十四層
第八百六十五層
第八百六十六層
第八百六十七層
第八百六十八層
第八百六十九層
第八百七十層
第八百七十一層
第八百七十二層
第八百七十三層
第八百七十四層
第八百七十五層
第八百七十六層
第八百七十七層
第八百七十八層
第八百七十九層
第八百八十層
第八百八十一層
第八百八十二層
第八百八十三層
第八百八十四層
第八百八十五層
第八百八十六層
第八百八十七層
第八百八十八層
第八百八十九層
第八百九十層
第八百九十一層
第八百九十二層
第八百九十三層
第八百九十四層
第八百九十五層
第八百九十六層
第八百九十七層
第八百九十八層
第八百九十九層
第九百層
第九百一層
第九百二層
第九百三層
第九百四層
第九百五層
第九百六層
第九百七層
第九百八層
第九百九層
第九百十層
第九百十一層
第九百十二層
第九百十三層
第九百十四層
第九百十五層
第九百十六層
第九百十七層
第九百十八層
第九百十九層
第九百二十層
第九百二十一層
第九百二十二層
第九百二十三層
第九百二十四層
第九百二十五層
第九百二十六層
第九百二十七層
第九百二十八層
第九百二十九層
第九百三十層
第九百三十一層
第九百三十二層
第九百三十三層
第九百三十四層
第九百三十五層
第九百三十六層
第九百三十七層
第九百三十八層
第九百三十九層
第九百四十層
第九百四十一層
第九百四十二層
第九百四十三層
第九百四十四層
第九百四十五層
第九百四十六層
第九百四十七層
第九百四十八層
第九百四十九層
第九百五十層
第九百五十一層
第九百五十二層
第九百五十三層
第九百五十四層
第九百五十五層
第九百五十六層
第九百五十七層
第九百五十八層
第九百五十九層
第九百六十層
第九百六十一層
第九百六十二層
第九百六十三層
第九百六十四層
第九百六十五層
第九百六十六層
第九百六十七層
第九百六十八層
第九百六十九層
第九百七十層
第九百七十一層
第九百七十二層
第九百七十三層
第九百七十四層
第九百七十五層
第九百七十六層
第九百七十七層
第九百七十八層
第九百七十九層
第九百八十層
第九百八十一層
第九百八十二層
第九百八十三層
第九百八十四層
第九百八十五層
第九百八十六層
第九百八十七層
第九百八十八層
第九百八十九層
第九百九十層
第九百九十一層
第九百九十二層
第九百九十三層
第九百九十四層
第九百九十五層
第九百九十六層
第九百九十七層
第九百九十八層
第九百九十九層
第一千層
第一千一層
第一千二層
第一千三層
第一千四層
第一千五層
第一千六層
第一千七層
第一千八層
第一千九層
第一千十層
第一千十一層
第一千十二層
第一千十三層
第一千十四層
第一千十五層
第一千十六層
第一千十七層
第一千十八層
第一千十九層
第一千二十層
第一千二十一層
第一千二十二層
第一千二十三層
第一千二十四層
第一千二十五層
第一千二十六層
第一千二十七層
第一千二十八層
第一千二十九層
第一千三十層
第一千三十一層
第一千三十二層
第一千三十三層
第一千三十四層
第一千三十五層
第一千三十六層
第一千三十七層
第一千三十八層
第一千三十九層
第一千四十層
第一千四十一層
第一千四十二層
第一千四十三層
第一千四十四層
第一千四十五層
第一千四十六層
第一千四十七層
第一千四十八層
第一千四十九層
第一千五十層
第一千五十一層
第一千五十二層
第一千五十三層
第一千五十四層
第一千五十五層
第一千五十六層
第一千五十七層
第一千五十八層
第一千五十九層
第一千六十層
第一千六十一層
第一千六十二層
第一千六十三層
第一千六十四層
第一千六十五層
第一千六十六層
第一千六十七層
第一千六十八層
第一千六十九層
第一千七十層
第一千七十一層
第一千七十二層
第一千七十三層
第一千七十四層
第一千七十五層
第一千七十六層
第一千七十七層
第一千七十八層
第一千七十九層
第一千八十層
第一千八十一層
第一千八十二層
第一千八十三層
第一千八十四層
第一千八十五層
第一千八十六層
第一千八十七層
第一千八十八層
第一千八十九層
第一千九十層
第一千九十一層
第一千九十二層
第一千九十三層
第一千九十四層
第一千九十五層
第一千九十六層
第一千九十七層
第一千九十八層
第一千九十九層
第一千一百層
第一千一百一層
第一千一百二層
第一千一百三層
第一千一百四層
第一千一百五層
第一千一百六層
第一千一百七層
第一千一百八層
第一千一百九層
第一千一百十層
第一千一百十一層
第一千一百十二層
第一千一百十三層
第一千一百十四層
第一千一百十五層
第一千一百十六層
第一千一百十七層
第一千一百十八層
第一千一百十九層
第一千一百二十層
第一千一百二十一層
第一千一百二十二層
第一千一百二十三層
第一千一百二十四層
第一千一百二十五層
第一千一百二十六層
第一千一百二十七層
第一千一百二十八層
第一千一百二十九層
第一千一百三十層
第一千一百三十一層
第一千一百三十二層
第一千一百三十三層
第一千一百三十四層
第一千一百三十五層
第一千一百三十六層
第一千一百三十七層
第一千一百三十八層
第一千一百三十九層
第一千一百四十層
第一千一百四十一層
第一千一百四十二層
第一千一百四十三層
第一千一百四十四層
第一千一百四十五層
第一千一百四十六層
第一千一百四十七層
第一千一百四十八層
第一千一百四十九層
第一千一百五十層
第一千一百五十一層
第一千一百五十二層
第一千一百五十三層
第一千一百五十四層
第一千一百五十五層
第一千一百五十六層
第一千一百五十七層
第一千一百五十八層
第一千一百五十九層
第一千一百六十層
第一千一百六十一層
第一千一百六十二層
第一千一百六十三層
第一千一百六十四層
第一千一百六十五層
第一千一百六十六層
第一千一百六十七層
第一千一百六十八層
第一千一百六十九層
第一千一百七十層
第一千一百七十一層
第一千一百七十二層
第一千一百七十三層
第一千一百七十四層
第一千一百七十五層
第一千一百七十六層
第一千一百七十七層
第一千一百七十八層
第一千一百七十九層
第一千一百八十層
第一千一百八十一層
第一千一百八十二層
第一千一百八十三層
第一千一百八十四層
第一千一百八十五層
第一千一百八十六層
第一千一百八十七層
第一千一百八十八層
第一千一百八十九層
第一千一百九十層
第一千一百九十一層
第一千一百九十二層
第一千一百九十三層
第一千一百九十四層
第一千一百九十五層
第一千一百九十六層
第一千一百九十七層
第一千一百九十八層
第一千一百九十九層
第一千二百層
第一千二百一層
第一千二百二層
第一千二百三層
第一千二百四層
第一千二百五層
第一千二百六層
第一千二百七層
第一千二百八層
第一千二百九層
第一千二百十層
第一千二百十一層
第一千二百十二層
第一千二百十三層
第一千二百十四層
第一千二百十五層
第一千二百十六層
第一千二百十七層
第一千二百十八層
第一千二百十九層
第一千二百二十層
第一千二百二十一層
第一千二百二十二層
第一千二百二十三層
第一千二百二十四層
第一千二百二十五層
第一千二百二十六層
第一千二百二十七層
第一千二百二十八層
第一千二百二十九層
第一千二百三十層
第一千二百三十一層
第一千二百三十二層
第一千二百三十三層
第一千二百三十四層
第一千二百三十五層
第一千二百三十六層
第一千二百三十七層
第一千二百三十八層
第一千二百三十九層
第一千二百四十層
第一千二百四十一層
第一千二百四十二層
第一千二百四十三層
第一千二百四十四層
第一千二百四十五層
第一千二百四十六層
第一千二百四十七層
第一千二百四十八層
第一千二百四十九層
第一千二百五十層
第一千二百五十一層
第一千二百五十二層
第一千二百五十三層
第一千二百五十四層
第一千二百五十五層
第一千二百五十六層
第一千二百五十七層
第一千二百五十八層
第一千二百五十九層
第一千二百六十層
第一千二百六十一層
第一千二百六十二層
第一千二百六十三層
第一千二百六十四層
第一千二百六十五層
第一千二百六十六層
第一千二百六十七層
第一千二百六十八層
第一千二百六十九層
第一千二百七十層
第一千二百七十一層
第一千二百七十二層
第一千二百七十三層
第一千二百七十四層
第一千二百七十五層
第一千二百七十六層
第一千二百七十七層
第一千二百七十八層
第一千二百七十九層
第一千二百八十層
第一千二百八十一層
第一千二百八十二層
第一千二百八十三層
第一千二百八十四層
第一千二百八十五層
第一千二百八十六層
第一千二百八十七層
第一千二百八十八層
第一千二百八十九層
第一千二百九十層
第一千二百九十一層
第一千二百九十二層
第一千二百九十三層
第一千二百九十四層
第一千二百九十五層
第一千二百九十六層
第一千二百九十七層
第一千二百九十八層
第一千二百九十九層
第一千三百層
第一千三百一層
第一千三百二層
第一千三百三層
第一千三百四層
第一千三百五層
第一千三百六層
第一千三百七層
第一千三百八層
第一千三百九層
第一千三百十層
第一千三百十一層
第一千三百十二層
第一千三百十三層
第一千三百十四層
第一千三百十五層
第一千三百十六層
第一千三百十七層
第一千三百十八層
第一千三百十九層
第一千三百二十層
第一千三百二十一層
第一千三百二十二層
第一千三百二十三層
第一千三百二十四層
第一千三百二十五層
第一千三百二十六層
第一千三百二十七層
第一千三百二十八層
第一千三百二十九層
第一千三百三十層
第一千三百三十一層
第一千三百三十二層
第一千三百三十三層
第一千三百三十四層
第一千三百三十五層
第一千三百三十六層
第一千三百三十七層
第一千三百三十八層
第一千三百三十九層
第一千三百四十層
第一千三百四十一層
第一千三百四十二層
第一千三百四十三層
第一千三百四十四層
第一千三百四十五層
第一千三百四十六層
第一千三百四十七層
第一千三百四十八層
第一千三百四十九層
第一千三百五十層
第一千三百五十一層
第一千三百五十二層
第一千三百五十三層
第一千三百五十四層
第一千三百五十五層
第一千三百五十六層
第一千三百五十七層
第一千三百五十八層
第一千三百五十九層
第一千三百六十層
第一千三百六十一層
第一千三百六十二層
第一千三百六十三層
第一千三百六十四層
第一千三百六十五層
第一千三百六十六層
第一千三百六十七層
第一千三百六十八層
第一千三百六十九層
第一千三百七十層
第一千三百七十一層
第一千三百七十二層
第一千三百七十三層
第一千三百七十四層
第一千三百七十五層
第一千三百七十六層
第一千三百七十七層
第一千三百七十八層
第一千三百七十九層
第一千三百八十層
第一千三百八十一層
第一千三百八十二層
第一千三百八十三層
第一千三百八十四層
第一千三百八十五層
第一千三百八十六層
第一千三百八十七層
第一千三百八十八層
第一千三百八十九層
第一千三百九十層
第一千三百九十一層
第一千三百九十二層
第一千三百九十三層
第一千三百九十四層
第一千三百九十五層
第一千三百九十六層
第一千三百九十七層
第一千三百九十八層
第一千三百九十九層
第一千四百層
第一千四百一層
第一千四百二層
第一千四百三層
第一千四百四層
第一千四百五層
第一千四百六層
第一千四百七層
第一千四百八層
第一千四百九層
第一千四百十層
第一千四百十一層
第一千四百十二層
第一千四百十三層
第一千四百十四層
第一千四百十五層
第一千四百十六層
第一千四百十七層
第一千四百十八層
第一千四百十九層
第一千四百二十層
第一千四百二十一層
第一千四百二十二層
第一千四百二十三層
第一千四百二十四層
第一千四百二十五層
第一千四百二十六層
第一千四百二十七層
第一千四百二十八層
第一千四百二十九層
第一千四百三十層
第一千四百三十一層
第一千四百三十二層
第一千四百三十三層
第一千四百三十四層
第一千四百三十五層
第一千四百三十六層
第一千四百三十七層
第一千四百三十八層
第一千四百三十九層
第一千四百四十層
第一千四百四十一層
第一千四百四十二層
第一千四百四十三層
第一千四百四十四層
第一千四百四十五層
第一千四百四十六層
第一千四百四十七層
第一千四百四十八層
第一千四百四十九層
第一千四百五十層
第一千四百五十一層
第一千四百五十二層
第一千四百五十三層
第一千四百五十四層
第一千四百五十五層
第一千四百五十六層
第一千四百五十七層
第一千四百五十八層
第一千四百五十九層
第一千四百六十層
第一千四百六十一層
第一千四百六十二層
第一千四百六十三層
第一千四百六十四層
第一千四百六十五層
第一千四百六十六層
第一千四百六十七層
第一千四百六十八層
第一千四百六十九層
第一千四百七十層
第一千四百七十一層
第一千四百七十二層
第一千四百七十三層
第一千四百七十四層
第一千四百七十五層
第一千四百七十六層
第一千四百七十七層
第一千四百七十八層
第一千四百七十九層
第一千四百八十層
第一千四百八十一層
第一千四百八十二層
第一千四百八十三層
第一千四百八十四層
第一千四百八十五層
第一千四百八十六層
第一千四百八十七層
第一千四百八十八層
第一千四百八十九層
第一千四百九十層
第一千四百九十一層
第一千四百九十二層
第一千四百九十三層
第一千四百九十四層
第一千四百九十五層
第一千四百九十六層
第一千四百九十七層
第一千四百九十八層
第一千四百九十九層
第一千五百層
第一千五百一層
第一千五百二層
第一千五百三層
第一千五百四層
第一千五百五層
第一千五百六層
第一千五百七層
第一千五百八層
第一千五百九層
第一千五百十層
第一千五百十一層
第一千五百十二層
第一千五百十三層
第一千五百十四層
第一千五百十五層
第一千五百十六層
第一千五百十七層
第一千五百十八層
第一千五百十九層
第一千五百二十層
第一千五百二十一層
第一千五百二十二層
第一千五百二十三層
第一千五百二十四層
第一千五百二十五層
第一千五百二十六層
第一千五百二十七層
第一千五百二十八層
第一千五百二十九層
第一千五百三十層
第一千五百三十一層
第一千五百三十二層
第一千五百三十三層
第一千五百三十四層
第一千五百三十五層
第一千五百三十六層
第一千五百三十七層
第一千五百三十八層
第一千五百三十九層
第一千五百四十層
第一千五百四十一層
第一千五百四十二層
第一千五百四十三層
第一千五百四十四層
第一千五百四十五層
第一千五百四十六層
第一千五百四十七層
第一千五百四十八層
第一千五百四十九層
第一千五百五十層
第一千五百五十一層
第一千五百五十二層
第一千五百五十三層
第一千五百五十四層
第一千五百五十五層
第一千五百五十六層
第一千五百五十七層
第一千五百五十八層
第一千五百五十九層
第一千五百六十層
第一千五百六十一層
第一千五百六十二層
第一千五百六十三層
第一千五百六十四層
第一千五百六十五層
第一千五百六十六層
第一千五百六十七層
第一千五百六十八層
第一千五百六十九層
第一千五百七十層
第一千五百七十一層
第一千五百七十二層
第一千五百七十三層
第一千五百七十四層
第一千五百七十五層
第一千五百七十六層
第一千五百七十七層
第一千五百七十八層
第一千五百七十九層
第一千五百八十層
第一千五百八十一層
第一千五百八十二層
第一千五百八十三層
第一千五百八十四層
第一千五百八十五層
第一千五百八十六層
第一千五百八十七層
第一千五百八十八層
第一千五百八十九層
第一千五百九十層
第一千五百九十一層
第一千五百九十二層
第一千五百九十三層
第一千五百九十四層
第一千五百九十五層
第一千五百九十六層
第一千五百九十七層
第一千五百九十八層
第一千五百九十九層
第一千六百層
第一千六百一層
第一千六百二層
第一千六百三層
第一千六百四層
第一千六百五層
第一千六百六層
第一千六百七層
第一千六百八層
第一千六百九層
第一千六百十層
第一千六百十一層
第一千六百十二層
第一千六百十三層
第一千六百十四層
第一千六百十五層
第一千六百十六層
第一千六百十七層
第一千六百十八層
第一千六百十九層
第一千六百二十層
第一千六百二十一層
第一千六百二十二層
第一千六百二十三層
第一千六百二十四層
第一千六百二十五層
第一千六百二十六層
第一千六百二十七層
第一千六百二十八層
第一千六百二十九層
第一千六百三十層
第一千六百三十一層
第一千六百三十二層
第一千六百三十三層
第一千六百三十四層
第一千六百三十五層
第一千六百三十六層
第一千六百三十七層
第一千六百三十八層
第一千六百三十九層
第一千六百四十層
第一千六百四十一層
第一千六百四十二層
第一千六百四十三層
第一千六百四十四層
第一千六百四十五層
第一千六百四十六層
第一千六百四十七層
第一千六百四十八層
第一千六百四十九層
第一千六百五十層
第一千六百五十一層
第一千六百五十二層
第一千六百五十三層
第一千六百五十四層
第一千六百五十五層
第一千六百五十六層
第一千六百五十七層
第一千六百五十八層
第一千六百五十九層
第一千六百六十層
第一千六百六十一層
第一千六百六十二層
第一千六百六十三層
第一千六百六十四層
第一千六百六十五層
第一千六百六十六層
第一千六百六十七層
第一千六百六十八層
第一千六百六十九層
第一千六百七十層
第一千六百七十一層
第一千六百七十二層
第一千六百七十三層
第一千六百七十四層
第一千六百七十五層
第一千六百七十六層
第一千六百七十七層
第一千六百七十八層
第一千六百七十九層
第一千六百八十層
第一千六百八十一層
第一千六百八十二層
第一千六百八十三層
第一千六百八十四層
第一千六百八十五層
第一千六百八十六層
第一千六百八十七層
第一千六百八十八層
第一千六百八十九層
第一千六百九十層
第一千六百九十一層
第一千六百九十二層
第一千六百九十三層
第一千六百九十四層
第一千六百九十五層
第一千六百九十六層
第一千六百九十七層
第一千六百九十八層
第一千六百九十九層
第一千七百層
第一千七百一層
第一千七百二層
第一千七百三層
第一千七百四層
第一千七百五層
第一千七百六層
第一千七百七層
第一千七百八層
第一千七百九層
第一千七百十層
第一千七百十一層
第一千七百十二層
第一千七百十三層
第一千七百十四層
第一千七百十五層
第一千七百十六層
第一千七百十七層
第一千七百十八層
第一千七百十九層
第一千七百二十層
第一千七百二十一層
第一千七百二十二層
第一千七百二十三層
第一千七百二十四層
第一千七百二十五層
第一千七百二十六層
第一千七百二十七層
第一千七百二十八層
第一千七百二十九層
第一千七百三十層
第一千七百三十一層
第一千七百三十二層
第一千七百三十三層
第一千七百三十四層
第一千七百三十五層
第一千七百三十六層
第一千七百三十七層
第一千七百三十八層
第一千七百三十九層
第一千七百四十層
第一千七百四十一層
第一千七百四十二層
第一千七百四十三層
第一千七百四十四層
第一千七百四十五層
第一千七百四十六層
第一千七百四十七層
第一千七百四十八層
第一千七百四十九層
第一千七百五十層
第一千七百五十一層
第一千七百五十二層
第一千七百五十三層
第一千七百五十四層
第一千七百五十五層
第一千七百五十六層
第一千七百五十七層
第一千七百五十八層
第一千七百五十九層
第一千七百六十層
第一千七百六十一層
第一千七百六十二層
第一千七百六十三層
第一千七百六十四層
第一千七百六十五層
第一千七百六十六層
第一千七百六十七層
第一千七百六十八層
第一千七百六十九層
第一千七百七十層
第一千七百七十一層
第一千七百七十二層
第一千七百七十三層
第一千七百七十四層
第一千七百七十五層
第一千七百七十六層
第一千七百七十七層
第一千七百七十八層
第一千七百七十九層
第一千七百八十層
第一千七百八十一層
第一千七百八十二層
第一千七百八十三層
第一千七百八十四層
第一千七百八十五層
第一千七百八十六層
第一千七百八十七層
第一千七百八十八層
第一千七百八十九層
第一千七百九十層
第一千七百九十一層
第一千七百九十二層
第一千七百九十三層
第一千七百九十四層
第一千七百九十五層
第一千七百九十六層
第一千七百九十七層
第一千七百九十八層
第一千七百九十九層
第一千八百層
第一千八百一層
第一千八百二層
第一千八百三層
第一千八百四層
第一千八百五層
第一千八百六層
第一千八百七層
第一千八百八層
第一千八百九層
第一千八百十層
第一千八百十一層
第一千八百十二層
第一千八百十三層
第一千八百十四層
第一千八百十五層
第一千八百十六層
第一千八百十七層
第一千八百十八層
第一千八百十九層
第一千八百二十層
第一千八百二十一層
第一千八百二十二層
第一千八百二十三層
第一千八百二十四層
第一千八百二十五層
第一千八百二十六層
第一千八百二十七層
第一千八百二十八層
第一千八百二十九層
第一千八百三十層
第一千八百三十一層
第一千八百三十二層
第一千八百三十三層
第一千八百三十四層
第一千八百三十五層
第一千八百三十六層
第一千八百三十七層
第一千八百三十八層
第一千八百三十九層
第一千八百四十層
第一千八百四十一層
第一千八百四十二層
第一千八百四十三層
第一千八百四十四層
第一千八百四十五層
第一千八百四十六層
第一千八百四十七層
第一千八百四十八層
第一千八百四十九層
第一千八百五十層
第一千八百五十一層
第一千八百五十二層
第一千八百五十三層
第一千八百五十四層
第一千八百五十五層
第一千八百五十六層
第一千八百五十七層
第一千八百五十八層
第一千八百五十九層
第一千八百六十層
第一千八百六十一層
第一千八百六十二層
第一千八百六十三層
第一千八百六十四層
第一千八百六十五層
第一千八百六十六層
第一千八百六十七層
第一千八百六十八層
第一千八百六十九層
第一千八百七十層
第一千八百七十一層
第一千八百七十二層
第一千八百七十三層
第一千八百七十四層
第一千八百七十五層
第一千八百七十六層
第一千八百七十七層
第一千八百七十八層
第一千八百七十九層
第一千八百八十層
第一千八百八十一層
第一千八百八十二層
第一千八百八十三層
第一千八百八十四層
第一千八百八十五層
第一千八百八十六層
第一千八百八十七層
第一千八百八十八層
第一千八百八十九層
第一千八百九十層
第一千八百九十一層
第一千八百九十二層
第一千八百九十三層
第一千八百九十四層
第一千八百九十五層
第一千八百九十六層
第一千八百九十七層
第一千八百九十八層
第一千八百九十九層
第一千九百層
第一千九百一層
第一千九百二層
第一千九百三層
第一千九百四層
第一千九百五層
第一千九百六層
第一千九百七層
第一千九百八層
第一千九百九層
第一千九百十層
第一千九百十一層
第一千九百十二層
第一

第二實施例
第二感測器
第二發光元件
第二導光元件
第二光學元件

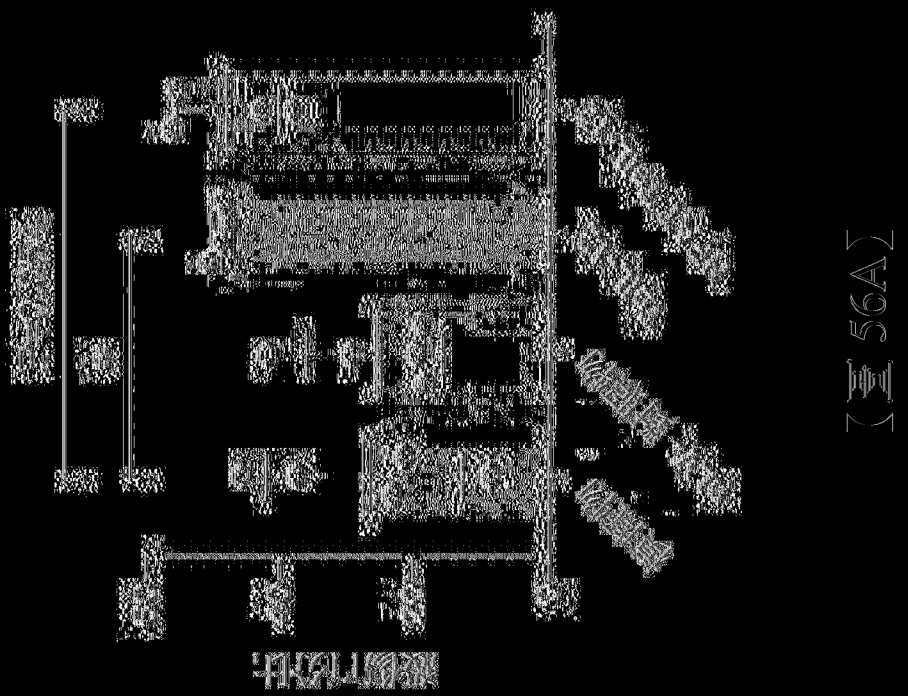


圖 563

圖 5C1

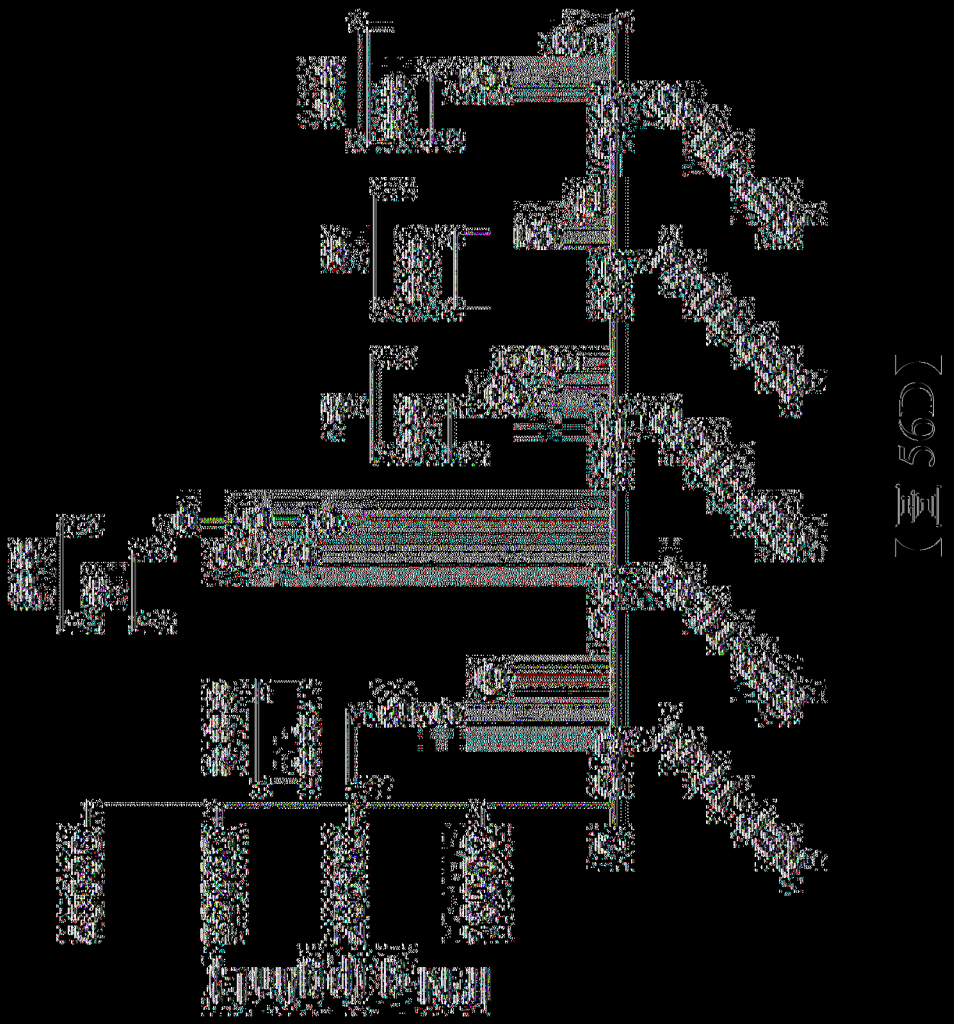


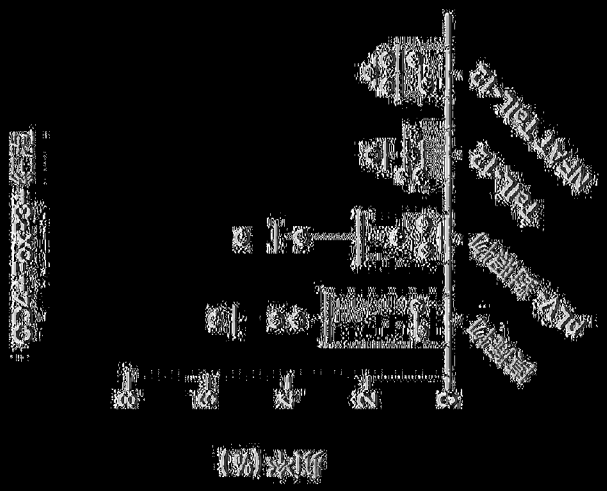
圖 57A

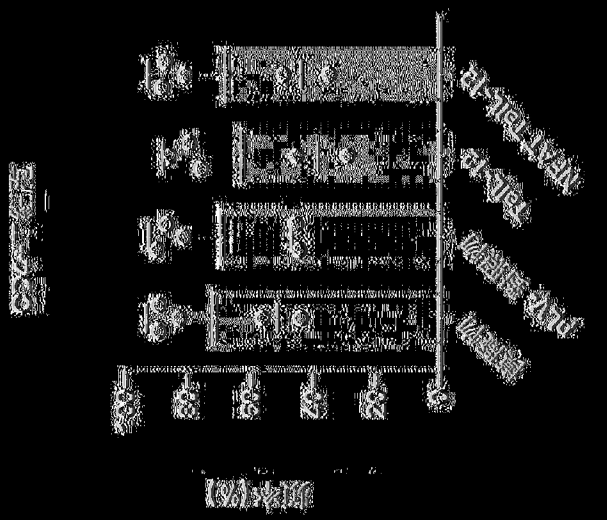
圖 5(3)

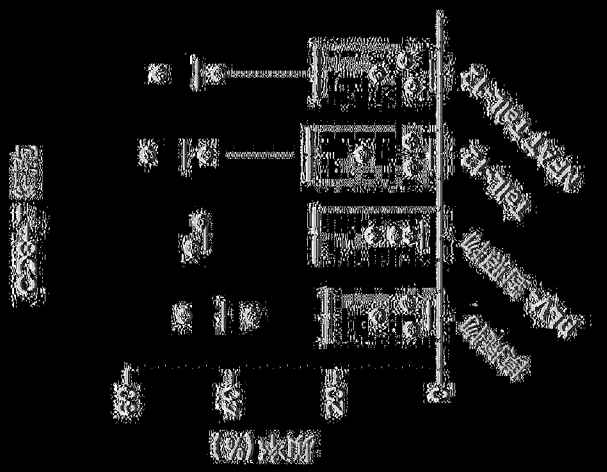
（先前技術）

感應區分佈
S83
感測物
感測物

圖 5C1
對照物
對照物
對照物
對照物



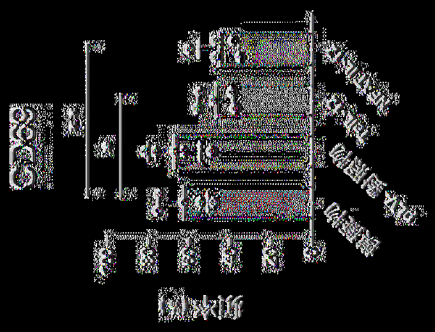


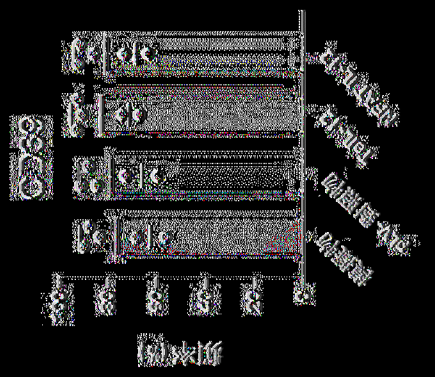


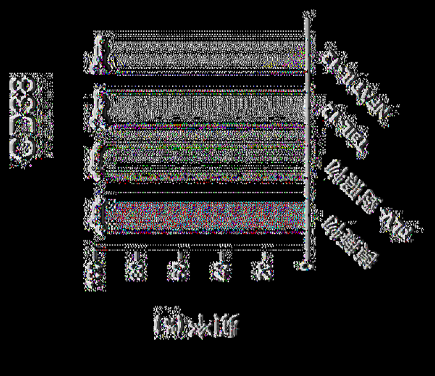
圖式
(603)
圖4
圖5
圖6
圖7
圖8
圖9

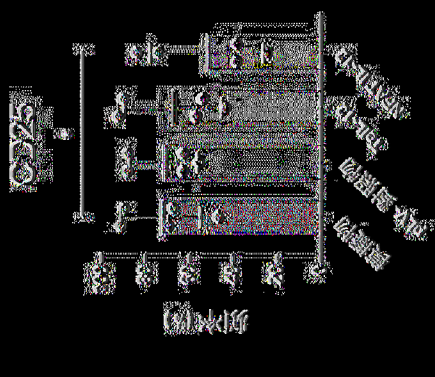
圖3C
圖3D
圖3E
圖3F

圖 62A





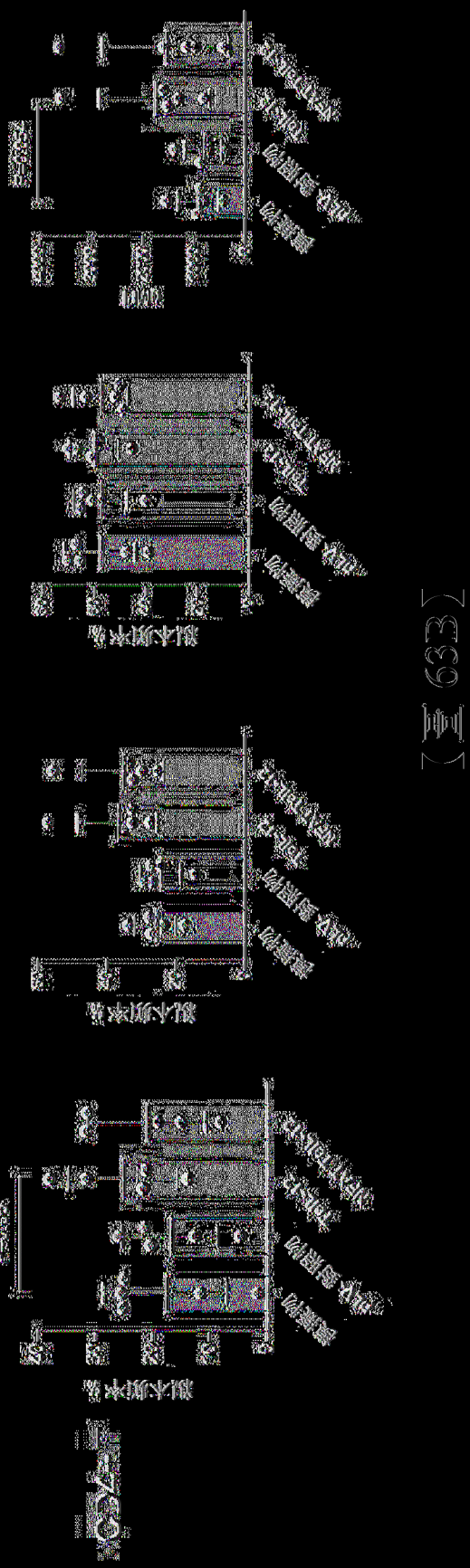






第一實施例
第二實施例
第三實施例
第四實施例
第五實施例
第六實施例
第七實施例
第八實施例
第九實施例
第十實施例
第十一實施例
第十二實施例
第十三實施例
第十四實施例
第十五實施例
第十六實施例
第十七實施例
第十八實施例
第十九實施例
第二十實施例
第二十一實施例
第二十二實施例
第二十三實施例
第二十四實施例
第二十五實施例
第二十六實施例
第二十七實施例
第二十八實施例
第二十九實施例
第三十實施例
第三十一實施例
第三十二實施例
第三十三實施例
第三十四實施例
第三十五實施例
第三十六實施例
第三十七實施例
第三十八實施例
第三十九實施例
第四十實施例
第四十一實施例
第四十二實施例
第四十三實施例
第四十四實施例
第四十五實施例
第四十六實施例
第四十七實施例
第四十八實施例
第四十九實施例
第五十實施例
第五十一實施例
第五十二實施例
第五十三實施例
第五十四實施例
第五十五實施例
第五十六實施例
第五十七實施例
第五十八實施例
第五十九實施例
第六十實施例
第六十一實施例
第六十二實施例
第六十三實施例
第六十四實施例
第六十五實施例
第六十六實施例
第六十七實施例
第六十八實施例
第六十九實施例
第七十實施例
第七十一實施例
第七十二實施例
第七十三實施例
第七十四實施例
第七十五實施例
第七十六實施例
第七十七實施例
第七十八實施例
第七十九實施例
第八十實施例
第八十一實施例
第八十二實施例
第八十三實施例
第八十四實施例
第八十五實施例
第八十六實施例
第八十七實施例
第八十八實施例
第八十九實施例
第九十實施例
第九十一實施例
第九十二實施例
第九十三實施例
第九十四實施例
第九十五實施例
第九十六實施例
第九十七實施例
第九十八實施例
第九十九實施例
第一百實施例
第一百一實施例
第一百二實施例
第一百三實施例
第一百四實施例
第一百五實施例
第一百六實施例
第一百七實施例
第一百八實施例
第一百九實施例
第一百十實施例
第一百十一實施例
第一百十二實施例
第一百十三實施例
第一百十四實施例
第一百十五實施例
第一百十六實施例
第一百十七實施例
第一百十八實施例
第一百十九實施例
第一百二十實施例
第一百二十一實施例
第一百二十二實施例
第一百二十三實施例
第一百二十四實施例
第一百二十五實施例
第一百二十六實施例
第一百二十七實施例
第一百二十八實施例
第一百二十九實施例
第一百三十實施例
第一百三十一實施例
第一百三十二實施例
第一百三十三實施例
第一百三十四實施例
第一百三十五實施例
第一百三十六實施例
第一百三十七實施例
第一百三十八實施例
第一百三十九實施例
第一百四十實施例
第一百四十一實施例
第一百四十二實施例
第一百四十三實施例
第一百四十四實施例
第一百四十五實施例
第一百四十六實施例
第一百四十七實施例
第一百四十八實施例
第一百四十九實施例
第一百五十實施例
第一百五十一實施例
第一百五十二實施例
第一百五十三實施例
第一百五十四實施例
第一百五十五實施例
第一百五十六實施例
第一百五十七實施例
第一百五十八實施例
第一百五十九實施例
第一百六十實施例
第一百六十一實施例
第一百六十二實施例
第一百六十三實施例
第一百六十四實施例
第一百六十五實施例
第一百六十六實施例
第一百六十七實施例
第一百六十八實施例
第一百六十九實施例
第一百七十實施例
第一百七十一實施例
第一百七十二實施例
第一百七十三實施例
第一百七十四實施例
第一百七十五實施例
第一百七十六實施例
第一百七十七實施例
第一百七十八實施例
第一百七十九實施例
第一百八十實施例
第一百八十一實施例
第一百八十二實施例
第一百八十三實施例
第一百八十四實施例
第一百八十五實施例
第一百八十六實施例
第一百八十七實施例
第一百八十八實施例
第一百八十九實施例
第一百九十實施例
第一百九十一實施例
第一百九十二實施例
第一百九十三實施例
第一百九十四實施例
第一百九十五實施例
第一百九十六實施例
第一百九十七實施例
第一百九十八實施例
第一百九十九實施例
第二百實施例
第二百一實施例
第二百二實施例
第二百三實施例
第二百四實施例
第二百五實施例
第二百六實施例
第二百七實施例
第二百八實施例
第二百九實施例
第二百十實施例
第二百十一實施例
第二百十二實施例
第二百十三實施例
第二百十四實施例
第二百十五實施例
第二百十六實施例
第二百十七實施例
第二百十八實施例
第二百十九實施例
第二百二十實施例
第二百二十一實施例
第二百二十二實施例
第二百二十三實施例
第二百二十四實施例
第二百二十五實施例
第二百二十六實施例
第二百二十七實施例
第二百二十八實施例
第二百二十九實施例
第二百三十實施例
第二百三十一實施例
第二百三十二實施例
第二百三十三實施例
第二百三十四實施例
第二百三十五實施例
第二百三十六實施例
第二百三十七實施例
第二百三十八實施例
第二百三十九實施例
第二百四十實施例
第二百四十一實施例
第二百四十二實施例
第二百四十三實施例
第二百四十四實施例
第二百四十五實施例
第二百四十六實施例
第二百四十七實施例
第二百四十八實施例
第二百四十九實施例
第二百五十實施例
第二百五十一實施例
第二百五十二實施例
第二百五十三實施例
第二百五十四實施例
第二百五十五實施例
第二百五十六實施例
第二百五十七實施例
第二百五十八實施例
第二百五十九實施例
第二百六十實施例
第二百六十一實施例
第二百六十二實施例
第二百六十三實施例
第二百六十四實施例
第二百六十五實施例
第二百六十六實施例
第二百六十七實施例
第二百六十八實施例
第二百六十九實施例
第二百七十實施例
第二百七十一實施例
第二百七十二實施例
第二百七十三實施例
第二百七十四實施例
第二百七十五實施例
第二百七十六實施例
第二百七十七實施例
第二百七十八實施例
第二百七十九實施例
第二百八十實施例
第二百八十一實施例
第二百八十二實施例
第二百八十三實施例
第二百八十四實施例
第二百八十五實施例
第二百八十六實施例
第二百八十七實施例
第二百八十八實施例
第二百八十九實施例
第二百九十實施例
第二百九十一實施例
第二百九十二實施例
第二百九十三實施例
第二百九十四實施例
第二百九十五實施例
第二百九十六實施例
第二百九十七實施例
第二百九十八實施例
第二百九十九實施例
第三百實施例
第三百一實施例
第三百二實施例
第三百三實施例
第三百四實施例
第三百五實施例
第三百六實施例
第三百七實施例
第三百八實施例
第三百九實施例
第三百十實施例
第三百十一實施例
第三百十二實施例
第三百十三實施例
第三百十四實施例
第三百十五實施例
第三百十六實施例
第三百十七實施例
第三百十八實施例
第三百十九實施例
第三百二十實施例
第三百二十一實施例
第三百二十二實施例
第三百二十三實施例
第三百二十四實施例
第三百二十五實施例
第三百二十六實施例
第三百二十七實施例
第三百二十八實施例
第三百二十九實施例
第三百三十實施例
第三百三十一實施例
第三百三十二實施例
第三百三十三實施例
第三百三十四實施例
第三百三十五實施例
第三百三十六實施例
第三百三十七實施例
第三百三十八實施例
第三百三十九實施例
第三百四十實施例
第三百四十一實施例
第三百四十二實施例
第三百四十三實施例
第三百四十四實施例
第三百四十五實施例
第三百四十六實施例
第三百四十七實施例
第三百四十八實施例
第三百四十九實施例
第三百五十實施例
第三百五十一實施例
第三百五十二實施例
第三百五十三實施例
第三百五十四實施例
第三百五十五實施例
第三百五十六實施例
第三百五十七實施例
第三百五十八實施例
第三百五十九實施例
第三百六十實施例
第三百六十一實施例
第三百六十二實施例
第三百六十三實施例
第三百六十四實施例
第三百六十五實施例
第三百六十六實施例
第三百六十七實施例
第三百六十八實施例
第三百六十九實施例
第三百七十實施例
第三百七十一實施例
第三百七十二實施例
第三百七十三實施例
第三百七十四實施例
第三百七十五實施例
第三百七十六實施例
第三百七十七實施例
第三百七十八實施例
第三百七十九實施例
第三百八十實施例
第三百八十一實施例
第三百八十二實施例
第三百八十三實施例
第三百八十四實施例
第三百八十五實施例
第三百八十六實施例
第三百八十七實施例
第三百八十八實施例
第三百八十九實施例
第三百九十實施例
第三百九十一實施例
第三百九十二實施例
第三百九十三實施例
第三百九十四實施例
第三百九十五實施例
第三百九十六實施例
第三百九十七實施例
第三百九十八實施例
第三百九十九實施例
第四百實施例
第四百一實施例
第四百二實施例
第四百三實施例
第四百四實施例
第四百五實施例
第四百六實施例
第四百七實施例
第四百八實施例
第四百九實施例
第四百十實施例
第四百十一實施例
第四百十二實施例
第四百十三實施例
第四百十四實施例
第四百十五實施例
第四百十六實施例
第四百十七實施例
第四百十八實施例
第四百十九實施例
第四百二十實施例
第四百二十一實施例
第四百二十二實施例
第四百二十三實施例
第四百二十四實施例
第四百二十五實施例
第四百二十六實施例
第四百二十七實施例
第四百二十八實施例
第四百二十九實施例
第四百三十實施例
第四百三十一實施例
第四百三十二實施例
第四百三十三實施例
第四百三十四實施例
第四百三十五實施例
第四百三十六實施例
第四百三十七實施例
第四百三十八實施例
第四百三十九實施例
第四百四十實施例
第四百四十一實施例
第四百四十二實施例
第四百四十三實施例
第四百四十四實施例
第四百四十五實施例
第四百四十六實施例
第四百四十七實施例
第四百四十八實施例
第四百四十九實施例
第四百五十實施例
第四百五十一實施例
第四百五十二實施例
第四百五十三實施例
第四百五十四實施例
第四百五十五實施例
第四百五十六實施例
第四百五十七實施例
第四百五十八實施例
第四百五十九實施例
第四百六十實施例
第四百六十一實施例
第四百六十二實施例
第四百六十三實施例
第四百六十四實施例
第四百六十五實施例
第四百六十六實施例
第四百六十七實施例
第四百六十八實施例
第四百六十九實施例
第四百七十實施例
第四百七十一實施例
第四百七十二實施例
第四百七十三實施例
第四百七十四實施例
第四百七十五實施例
第四百七十六實施例
第四百七十七實施例
第四百七十八實施例
第四百七十九實施例
第四百八十實施例
第四百八十一實施例
第四百八十二實施例
第四百八十三實施例
第四百八十四實施例
第四百八十五實施例
第四百八十六實施例
第四百八十七實施例
第四百八十八實施例
第四百八十九實施例
第四百九十實施例
第四百九十一實施例
第四百九十二實施例
第四百九十三實施例
第四百九十四實施例
第四百九十五實施例
第四百九十六實施例
第四百九十七實施例
第四百九十八實施例
第四百九十九實施例
第五百實施例
第五百一實施例
第五百二實施例
第五百三實施例
第五百四實施例
第五百五實施例
第五百六實施例
第五百七實施例
第五百八實施例
第五百九實施例
第五百十實施例
第五百十一實施例
第五百十二實施例
第五百十三實施例
第五百十四實施例
第五百十五實施例
第五百十六實施例
第五百十七實施例
第五百十八實施例
第五百十九實施例
第五百二十實施例
第五百二十一實施例
第五百二十二實施例
第五百二十三實施例
第五百二十四實施例
第五百二十五實施例
第五百二十六實施例
第五百二十七實施例
第五百二十八實施例
第五百二十九實施例
第五百三十實施例
第五百三十一實施例
第五百三十二實施例
第五百三十三實施例
第五百三十四實施例
第五百三十五實施例
第五百三十六實施例
第五百三十七實施例
第五百三十八實施例
第五百三十九實施例
第五百四十實施例
第五百四十一實施例
第五百四十二實施例
第五百四十三實施例
第五百四十四實施例
第五百四十五實施例
第五百四十六實施例
第五百四十七實施例
第五百四十八實施例
第五百四十九實施例
第五百五十實施例
第五百五十一實施例
第五百五十二實施例
第五百五十三實施例
第五百五十四實施例
第五百五十五實施例
第五百五十六實施例
第五百五十七實施例
第五百五十八實施例
第五百五十九實施例
第五百六十實施例
第五百六十一實施例
第五百六十二實施例
第五百六十三實施例
第五百六十四實施例
第五百六十五實施例
第五百六十六實施例
第五百六十七實施例
第五百六十八實施例
第五百六十九實施例
第五百七十實施例
第五百七十一實施例
第五百七十二實施例
第五百七十三實施例
第五百七十四實施例
第五百七十五實施例
第五百七十六實施例
第五百七十七實施例
第五百七十八實施例
第五百七十九實施例
第五百八十實施例
第五百八十一實施例
第五百八十二實施例
第五百八十三實施例
第五百八十四實施例
第五百八十五實施例
第五百八十六實施例
第五百八十七實施例
第五百八十八實施例
第五百八十九實施例
第五百九十實施例
第五百九十一實施例
第五百九十二實施例
第五百九十三實施例
第五百九十四實施例
第五百九十五實施例
第五百九十六實施例
第五百九十七實施例
第五百九十八實施例
第五百九十九實施例
第六百實施例
第六百一實施例
第六百二實施例
第六百三實施例
第六百四實施例
第六百五實施例
第六百六實施例
第六百七實施例
第六百八實施例
第六百九實施例
第六百十實施例
第六百十一實施例
第六百十二實施例
第六百十三實施例
第六百十四實施例
第六百十五實施例
第六百十六實施例
第六百十七實施例
第六百十八實施例
第六百十九實施例
第六百二十實施例
第六百二十一實施例
第六百二十二實施例
第六百二十三實施例
第六百二十四實施例
第六百二十五實施例
第六百二十六實施例
第六百二十七實施例
第六百二十八實施例
第六百二十九實施例
第六百三十實施例
第六百三十一實施例
第六百三十二實施例
第六百三十三實施例
第六百三十四實施例
第六百三十五實施例
第六百三十六實施例
第六百三十七實施例
第六百三十八實施例
第六百三十九實施例
第六百四十實施例
第六百四十一實施例
第六百四十二實施例
第六百四十三實施例
第六百四十四實施例
第六百四十五實施例
第六百四十六實施例
第六百四十七實施例
第六百四十八實施例
第六百四十九實施例
第六百五十實施例
第六百五十一實施例
第六百五十二實施例
第六百五十三實施例
第六百五十四實施例
第六百五十五實施例
第六百五十六實施例
第六百五十七實施例
第六百五十八實施例
第六百五十九實施例
第六百六十實施例
第六百六十一實施例
第六百六十二實施例
第六百六十三實施例
第六百六十四實施例
第六百六十五實施例
第六百六十六實施例
第六百六十七實施例
第六百六十八實施例
第六百六十九實施例
第六百七十實施例
第六百七十一實施例
第六百七十二實施例
第六百七十三實施例
第六百七十四實施例
第六百七十五實施例
第六百七十六實施例
第六百七十七實施例
第六百七十八實施例
第六百七十九實施例
第六百八十實施例
第六百八十一實施例
第六百八十二實施例
第六百八十三實施例
第六百八十四實施例
第六百八十五實施例
第六百八十六實施例
第六百八十七實施例
第六百八十八實施例
第六百八十九實施例
第六百九十實施例
第六百九十一實施例
第六百九十二實施例
第六百九十三實施例
第六百九十四實施例
第六百九十五實施例
第六百九十六實施例
第六百九十七實施例
第六百九十八實施例
第六百九十九實施例
第七百實施例
第七百一實施例
第七百二實施例
第七百三實施例
第七百四實施例
第七百五實施例
第七百六實施例
第七百七實施例
第七百八實施例
第七百九實施例
第七百十實施例
第七百十一實施例
第七百十二實施例
第七百十三實施例
第七百十四實施例
第七百十五實施例
第七百十六實施例
第七百十七實施例
第七百十八實施例
第七百十九實施例
第七百二十實施例
第七百二十一實施例
第七百二十二實施例
第七百二十三實施例
第七百二十四實施例
第七百二十五實施例
第七百二十六實施例
第七百二十七實施例
第七百二十八實施例
第七百二十九實施例
第七百三十實施例
第七百三十一實施例
第七百三十二實施例
第七百三十三實施例
第七百三十四實施例
第七百三十五實施例
第七百三十六實施例
第七百三十七實施例
第七百三十八實施例
第七百三十九實施例
第七百四十實施例
第七百四十一實施例
第七百四十二實施例
第七百四十三實施例
第七百四十四實施例
第七百四十五實施例
第七百四十六實施例
第七百四十七實施例
第七百四十八實施例
第七百四十九實施例
第七百五十實施例
第七百五十一實施例
第七百五十二實施例
第七百五十三實施例
第七百五十四實施例
第七百五十五實施例
第七百五十六實施例
第七百五十七實施例
第七百五十八實施例
第七百五十九實施例
第七百六十實施例
第七百六十一實施例
第七百六十二實施例
第七百六十三實施例
第七百六十四實施例
第七百六十五實施例
第七百六十六實施例
第七百六十七實施例
第七百六十八實施例
第七百六十九實施例
第七百七十實施例
第七百七十一實施例
第七百七十二實施例
第七百七十三實施例
第七百七十四實施例
第七百七十五實施例
第七百七十六實施例
第七百七十七實施例
第七百七十八實施例
第七百七十九實施例
第七百八十實施例
第七百八十一實施例
第七百八十二實施例
第七百八十三實施例
第七百八十四實施例
第七百八十五實施例
第七百八十六實施例
第七百八十七實施例
第七百八十八實施例
第七百八十九實施例
第七百九十實施例
第七百九十一實施例
第七百九十二實施例
第七百九十三實施例
第七百九十四實施例
第七百九十五實施例
第七百九十六實施例
第七百九十七實施例
第七百九十八實施例
第七百九十九實施例
第八百實施例
第八百一實施例
第八百二實施例
第八百三實施例
第八百四實施例
第八百五實施例
第八百六實施例
第八百七實施例
第八百八實施例
第八百九實施例
第八百十實施例
第八百十一實施例
第八百十二實施例
第八百十三實施例
第八百十四實施例
第八百十五實施例
第八百十六實施例
第八百十七實施例
第八百十八實施例
第八百十九實施例
第八百二十實施例
第八百二十一實施例
第八百二十二實施例
第八百二十三實施例
第八百二十四實施例
第八百二十五實施例
第八百二十六實施例
第八百二十七實施例
第八百二十八實施例
第八百二十九實施例
第八百三十實施例
第八百三十一實施例
第八百三十二實施例
第八百三十三實施例
第八百三十四實施例
第八百三十五實施例
第八百三十六實施例
第八百三十七實施例
第八百三十八實施例
第八百三十九實施例
第八百四十實施例
第八百四十一實施例
第八百四十二實施例
第八百四十三實施例
第八百四十四實施例
第八百四十五實施例
第八百四十六實施例
第八百四十七實施例
第八百四十八實施例
第八百四十九實施例
第八百五十實施例
第八百五十一實施例
第八百五十二實施例
第八百五十三實施例
第八百五十四實施例
第八百五十五實施例
第八百五十六實施例
第八百五十七實施例
第八百五十八實施例
第八百五十九實施例
第八百六十實施例
第八百六十一實施例
第八百六十二實施例
第八百六十三實施例
第八百六十四實施例
第八百六十五實施例
第八百六十六實施例
第八百六十七實施例
第八百六十八實施例
第八百六十九實施例
第八百七十實施例
第八百七十一實施例
第八百七十二實施例
第八百七十三實施例
第八百七十四實施例
第八百七十五實施例
第八百七十六實施例
第八百七十七實施例
第八百七十八實施例
第八百七十九實施例
第八百八十實施例
第八百八十一實施例
第八百八十二實施例
第八百八十三實施例
第八百八十四實施例
第八百八十五實施例
第八百八十六實施例
第八百八十七實施例
第八百八十八實施例
第八百八十九實施例
第八百九十實施例
第八百九十一實施例
第八百九十二實施例
第八百九十三實施例
第八百九十四實施例
第八百九十五實施例
第八百九十六實施例
第八百九十七實施例
第八百九十八實施例
第八百九十九實施例
第九百實施例
第九百一實施例
第九百二實施例
第九百三實施例
第九百四實施例
第九百五實施例
第九百六實施例
第九百七實施例
第九百八實施例
第九百九實施例
第九百十實施例
第九百十一實施例
第九百十二實施例
第九百十三實施例
第九百十四實施例
第九百十五實施例
第九百十六實施例
第九百十七實施例
第九百十八實施例
第九百十九實施例
第九百二十實施例
第九百二十一實施例
第九百二十二實施例
第九百二十三實施例
第九百二十四實施例
第九百二十五實施例
第九百二十六實施例
第九百二十七實施例
第九百二十八實施例
第九百二十九實施例
第九百三十實施例
第九百三十一實施例
第九百三十二實施例
第九百三十三實施例
第九百三十四實施例
第九百三十五實施例
第九百三十六實施例
第九百三十七實施例
第九百三十八實施例
第九百三十九實施例
第九百四十實施例
第九百四十一實施例
第九百四十二實施例
第九百四十三實施例
第九百四十四實施例
第九百四十五實施例
第九百四十六實施例
第九百四十七實施例
第九百四十八實施例
第九百四十九實施例
第九百五十實施例
第九百五十一實施例
第九百五十二實施例
第九百五十三實施例
第九百五十四實施例
第九百五十五實施例
第九百五十六實施例
第九百五十七實施例
第九百五十八實施例
第九百五十九實施例
第九百六十實施例
第九百六十一實施例
第九百六十二實施例
第九百六十三實施例
第九百六十四實施例
第九百六十五實施例
第九百六十六實施例
第九百六十七實施例
第九百六十八實施例
第九百六十九實施例
第九百七十實施例
第九百七十一實施例
第九百七十二實施例
第九百七十三實施例
第九百七十四實施例
第九百七十五實施例
第九百七十六實施例
第九百七十七實施例
第九百七十八實施例
第九百七十九實施例
第九百八十實施例
第九百八十一實施例
第九百八十二實施例
第九百八十三實施例
第九百八十四實施例
第九百八十五實施例
第九百八十六實施例
第九百八十七實施例
第九百八十八實施例
第九百八十九實施例
第九百九十實施例
第九百九十一實施例
第九百九十二實施例
第九百九十三實施例
第九百九十四實施例
第九百九十五實施例
第九百九十六實施例
第九百九十七實施例
第九百九十八實施例
第九百九十九實施例
第一千實施例

圖 6A



TOLERATE
OK3
(30g/m)
ET38
(30g/m)
第4天
第2天
第0天
第4天
第2天
第0天
600
500
0
濃度(ppm)

【圖 64A】

圖 43

TeL'5/TeL2'REPTL
0K3 (30g/m)
T38 (30g/m)
第4天
第2天
第0天
第4天
第2天
第0天
(65A)
時間(小時)

第一次修正
第二次修正
第三次修正
附圖（63）

第一電極
第二電極
第三電極
第四電極
第五電極
第六電極
第一導線
第二導線
第三導線
第四導線
第五導線
第六導線
第一連接線
第二連接線
第三連接線
第四連接線
第五連接線
第六連接線
第一連接線
第二連接線
第三連接線
第四連接線
第五連接線
第六連接線
第一導線
第二導線
第三導線
第四導線
第五導線
第六導線
第一電極
第二電極
第三電極
第四電極
第五電極
第六電極

圖 3（66A）

圖 (63)

第一儲存裝置
第二儲存裝置
第三儲存裝置
第四儲存裝置
第五儲存裝置
第六儲存裝置
第七儲存裝置
第八儲存裝置
第九儲存裝置
第十儲存裝置
第十一儲存裝置
第十二儲存裝置
第十三儲存裝置
第十四儲存裝置
第十五儲存裝置
第十六儲存裝置
第十七儲存裝置
第十八儲存裝置
第十九儲存裝置
第二十儲存裝置
第二十一儲存裝置
第二十二儲存裝置
第二十三儲存裝置
第二十四儲存裝置
第二十五儲存裝置
第二十六儲存裝置
第二十七儲存裝置
第二十八儲存裝置
第二十九儲存裝置
第三十儲存裝置
第三十一儲存裝置
第三十二儲存裝置
第三十三儲存裝置
第三十四儲存裝置
第三十五儲存裝置
第三十六儲存裝置
第三十七儲存裝置
第三十八儲存裝置
第三十九儲存裝置
第四十儲存裝置
第四十一儲存裝置
第四十二儲存裝置
第四十三儲存裝置
第四十四儲存裝置
第四十五儲存裝置
第四十六儲存裝置
第四十七儲存裝置
第四十八儲存裝置
第四十九儲存裝置
第五十儲存裝置
第五十一儲存裝置
第五十二儲存裝置
第五十三儲存裝置
第五十四儲存裝置
第五十五儲存裝置
第五十六儲存裝置
第五十七儲存裝置
第五十八儲存裝置
第五十九儲存裝置
第六十儲存裝置
第六十一儲存裝置
第六十二儲存裝置
第六十三儲存裝置
第六十四儲存裝置
第六十五儲存裝置
第六十六儲存裝置
第六十七儲存裝置
第六十八儲存裝置
第六十九儲存裝置
第七十儲存裝置
第七十一儲存裝置
第七十二儲存裝置
第七十三儲存裝置
第七十四儲存裝置
第七十五儲存裝置
第七十六儲存裝置
第七十七儲存裝置
第七十八儲存裝置
第七十九儲存裝置
第八十儲存裝置
第八十一儲存裝置
第八十二儲存裝置
第八十三儲存裝置
第八十四儲存裝置
第八十五儲存裝置
第八十六儲存裝置
第八十七儲存裝置
第八十八儲存裝置
第八十九儲存裝置
第九十儲存裝置
第九十一儲存裝置
第九十二儲存裝置
第九十三儲存裝置
第九十四儲存裝置
第九十五儲存裝置
第九十六儲存裝置
第九十七儲存裝置
第九十八儲存裝置
第九十九儲存裝置
第一百儲存裝置
第一百一儲存裝置
第一百二儲存裝置
第一百三儲存裝置
第一百四儲存裝置
第一百五儲存裝置
第一百六儲存裝置
第一百七儲存裝置
第一百八儲存裝置
第一百九儲存裝置
第一百十儲存裝置
第一百十一儲存裝置
第一百十二儲存裝置
第一百十三儲存裝置
第一百十四儲存裝置
第一百十五儲存裝置
第一百十六儲存裝置
第一百十七儲存裝置
第一百十八儲存裝置
第一百十九儲存裝置
第一百二十儲存裝置
第一百二十一儲存裝置
第一百二十二儲存裝置
第一百二十三儲存裝置
第一百二十四儲存裝置
第一百二十五儲存裝置
第一百二十六儲存裝置
第一百二十七儲存裝置
第一百二十八儲存裝置
第一百二十九儲存裝置
第一百三十儲存裝置
第一百三十一儲存裝置
第一百三十二儲存裝置
第一百三十三儲存裝置
第一百三十四儲存裝置
第一百三十五儲存裝置
第一百三十六儲存裝置
第一百三十七儲存裝置
第一百三十八儲存裝置
第一百三十九儲存裝置
第一百四十儲存裝置
第一百四十一儲存裝置
第一百四十二儲存裝置
第一百四十三儲存裝置
第一百四十四儲存裝置
第一百四十五儲存裝置
第一百四十六儲存裝置
第一百四十七儲存裝置
第一百四十八儲存裝置
第一百四十九儲存裝置
第一百五十儲存裝置
第一百五十一儲存裝置
第一百五十二儲存裝置
第一百五十三儲存裝置
第一百五十四儲存裝置
第一百五十五儲存裝置
第一百五十六儲存裝置
第一百五十七儲存裝置
第一百五十八儲存裝置
第一百五十九儲存裝置
第一百六十儲存裝置
第一百六十一儲存裝置
第一百六十二儲存裝置
第一百六十三儲存裝置
第一百六十四儲存裝置
第一百六十五儲存裝置
第一百六十六儲存裝置
第一百六十七儲存裝置
第一百六十八儲存裝置
第一百六十九儲存裝置
第一百七十儲存裝置
第一百七十一儲存裝置
第一百七十二儲存裝置
第一百七十三儲存裝置
第一百七十四儲存裝置
第一百七十五儲存裝置
第一百七十六儲存裝置
第一百七十七儲存裝置
第一百七十八儲存裝置
第一百七十九儲存裝置
第一百八十儲存裝置
第一百八十一儲存裝置
第一百八十二儲存裝置
第一百八十三儲存裝置
第一百八十四儲存裝置
第一百八十五儲存裝置
第一百八十六儲存裝置
第一百八十七儲存裝置
第一百八十八儲存裝置
第一百八十九儲存裝置
第一百九十儲存裝置
第一百九十一儲存裝置
第一百九十二儲存裝置
第一百九十三儲存裝置
第一百九十四儲存裝置
第一百九十五儲存裝置
第一百九十六儲存裝置
第一百九十七儲存裝置
第一百九十八儲存裝置
第一百九十九儲存裝置
第二百儲存裝置
第二百一儲存裝置
第二百二儲存裝置
第二百三儲存裝置
第二百四儲存裝置
第二百五儲存裝置
第二百六儲存裝置
第二百七儲存裝置
第二百八儲存裝置
第二百九儲存裝置
第二百十儲存裝置
第二百十一儲存裝置
第二百十二儲存裝置
第二百十三儲存裝置
第二百十四儲存裝置
第二百十五儲存裝置
第二百十六儲存裝置
第二百十七儲存裝置
第二百十八儲存裝置
第二百十九儲存裝置
第二百二十儲存裝置
第二百二十一儲存裝置
第二百二十二儲存裝置
第二百二十三儲存裝置
第二百二十四儲存裝置
第二百二十五儲存裝置
第二百二十六儲存裝置
第二百二十七儲存裝置
第二百二十八儲存裝置
第二百二十九儲存裝置
第二百三十儲存裝置
第二百三十一儲存裝置
第二百三十二儲存裝置
第二百三十三儲存裝置
第二百三十四儲存裝置
第二百三十五儲存裝置
第二百三十六儲存裝置
第二百三十七儲存裝置
第二百三十八儲存裝置
第二百三十九儲存裝置
第二百四十儲存裝置
第二百四十一儲存裝置
第二百四十二儲存裝置
第二百四十三儲存裝置
第二百四十四儲存裝置
第二百四十五儲存裝置
第二百四十六儲存裝置
第二百四十七儲存裝置
第二百四十八儲存裝置
第二百四十九儲存裝置
第二百五十儲存裝置
第二百五十一儲存裝置
第二百五十二儲存裝置
第二百五十三儲存裝置
第二百五十四儲存裝置
第二百五十五儲存裝置
第二百五十六儲存裝置
第二百五十七儲存裝置
第二百五十八儲存裝置
第二百五十九儲存裝置
第二百六十儲存裝置
第二百六十一儲存裝置
第二百六十二儲存裝置
第二百六十三儲存裝置
第二百六十四儲存裝置
第二百六十五儲存裝置
第二百六十六儲存裝置
第二百六十七儲存裝置
第二百六十八儲存裝置
第二百六十九儲存裝置
第二百七十儲存裝置
第二百七十一儲存裝置
第二百七十二儲存裝置
第二百七十三儲存裝置
第二百七十四儲存裝置
第二百七十五儲存裝置
第二百七十六儲存裝置
第二百七十七儲存裝置
第二百七十八儲存裝置
第二百七十九儲存裝置
第二百八十儲存裝置
第二百八十一儲存裝置
第二百八十二儲存裝置
第二百八十三儲存裝置
第二百八十四儲存裝置
第二百八十五儲存裝置
第二百八十六儲存裝置
第二百八十七儲存裝置
第二百八十八儲存裝置
第二百八十九儲存裝置
第二百九十儲存裝置
第二百九十一儲存裝置
第二百九十二儲存裝置
第二百九十三儲存裝置
第二百九十四儲存裝置
第二百九十五儲存裝置
第二百九十六儲存裝置
第二百九十七儲存裝置
第二百九十八儲存裝置
第二百九十九儲存裝置
第三百儲存裝置
第三百一儲存裝置
第三百二儲存裝置
第三百三儲存裝置
第三百四儲存裝置
第三百五儲存裝置
第三百六儲存裝置
第三百七儲存裝置
第三百八儲存裝置
第三百九儲存裝置
第三百十儲存裝置
第三百十一儲存裝置
第三百十二儲存裝置
第三百十三儲存裝置
第三百十四儲存裝置
第三百十五儲存裝置
第三百十六儲存裝置
第三百十七儲存裝置
第三百十八儲存裝置
第三百十九儲存裝置
第三百二十儲存裝置
第三百二十一儲存裝置
第三百二十二儲存裝置
第三百二十三儲存裝置
第三百二十四儲存裝置
第三百二十五儲存裝置
第三百二十六儲存裝置
第三百二十七儲存裝置
第三百二十八儲存裝置
第三百二十九儲存裝置
第三百三十儲存裝置
第三百三十一儲存裝置
第三百三十二儲存裝置
第三百三十三儲存裝置
第三百三十四儲存裝置
第三百三十五儲存裝置
第三百三十六儲存裝置
第三百三十七儲存裝置
第三百三十八儲存裝置
第三百三十九儲存裝置
第三百四十儲存裝置
第三百四十一儲存裝置
第三百四十二儲存裝置
第三百四十三儲存裝置
第三百四十四儲存裝置
第三百四十五儲存裝置
第三百四十六儲存裝置
第三百四十七儲存裝置
第三百四十八儲存裝置
第三百四十九儲存裝置
第三百五十儲存裝置
第三百五十一儲存裝置
第三百五十二儲存裝置
第三百五十三儲存裝置
第三百五十四儲存裝置
第三百五十五儲存裝置
第三百五十六儲存裝置
第三百五十七儲存裝置
第三百五十八儲存裝置
第三百五十九儲存裝置
第三百六十儲存裝置
第三百六十一儲存裝置
第三百六十二儲存裝置
第三百六十三儲存裝置
第三百六十四儲存裝置
第三百六十五儲存裝置
第三百六十六儲存裝置
第三百六十七儲存裝置
第三百六十八儲存裝置
第三百六十九儲存裝置
第三百七十儲存裝置
第三百七十一儲存裝置
第三百七十二儲存裝置
第三百七十三儲存裝置
第三百七十四儲存裝置
第三百七十五儲存裝置
第三百七十六儲存裝置
第三百七十七儲存裝置
第三百七十八儲存裝置
第三百七十九儲存裝置
第三百八十儲存裝置
第三百八十一儲存裝置
第三百八十二儲存裝置
第三百八十三儲存裝置
第三百八十四儲存裝置
第三百八十五儲存裝置
第三百八十六儲存裝置
第三百八十七儲存裝置
第三百八十八儲存裝置
第三百八十九儲存裝置
第三百九十儲存裝置
第三百九十一儲存裝置
第三百九十二儲存裝置
第三百九十三儲存裝置
第三百九十四儲存裝置
第三百九十五儲存裝置
第三百九十六儲存裝置
第三百九十七儲存裝置
第三百九十八儲存裝置
第三百九十九儲存裝置
第四百儲存裝置
第四百一儲存裝置
第四百二儲存裝置
第四百三儲存裝置
第四百四儲存裝置
第四百五儲存裝置
第四百六儲存裝置
第四百七儲存裝置
第四百八儲存裝置
第四百九儲存裝置
第四百十儲存裝置
第四百十一儲存裝置
第四百十二儲存裝置
第四百十三儲存裝置
第四百十四儲存裝置
第四百十五儲存裝置
第四百十六儲存裝置
第四百十七儲存裝置
第四百十八儲存裝置
第四百十九儲存裝置
第四百二十儲存裝置
第四百二十一儲存裝置
第四百二十二儲存裝置
第四百二十三儲存裝置
第四百二十四儲存裝置
第四百二十五儲存裝置
第四百二十六儲存裝置
第四百二十七儲存裝置
第四百二十八儲存裝置
第四百二十九儲存裝置
第四百三十儲存裝置
第四百三十一儲存裝置
第四百三十二儲存裝置
第四百三十三儲存裝置
第四百三十四儲存裝置
第四百三十五儲存裝置
第四百三十六儲存裝置
第四百三十七儲存裝置
第四百三十八儲存裝置
第四百三十九儲存裝置
第四百四十儲存裝置
第四百四十一儲存裝置
第四百四十二儲存裝置
第四百四十三儲存裝置
第四百四十四儲存裝置
第四百四十五儲存裝置
第四百四十六儲存裝置
第四百四十七儲存裝置
第四百四十八儲存裝置
第四百四十九儲存裝置
第四百五十儲存裝置
第四百五十一儲存裝置
第四百五十二儲存裝置
第四百五十三儲存裝置
第四百五十四儲存裝置
第四百五十五儲存裝置
第四百五十六儲存裝置
第四百五十七儲存裝置
第四百五十八儲存裝置
第四百五十九儲存裝置
第四百六十儲存裝置
第四百六十一儲存裝置
第四百六十二儲存裝置
第四百六十三儲存裝置
第四百六十四儲存裝置
第四百六十五儲存裝置
第四百六十六儲存裝置
第四百六十七儲存裝置
第四百六十八儲存裝置
第四百六十九儲存裝置
第四百七十儲存裝置
第四百七十一儲存裝置
第四百七十二儲存裝置
第四百七十三儲存裝置
第四百七十四儲存裝置
第四百七十五儲存裝置
第四百七十六儲存裝置
第四百七十七儲存裝置
第四百七十八儲存裝置
第四百七十九儲存裝置
第四百八十儲存裝置
第四百八十一儲存裝置
第四百八十二儲存裝置
第四百八十三儲存裝置
第四百八十四儲存裝置
第四百八十五儲存裝置
第四百八十六儲存裝置
第四百八十七儲存裝置
第四百八十八儲存裝置
第四百八十九儲存裝置
第四百九十儲存裝置
第四百九十一儲存裝置
第四百九十二儲存裝置
第四百九十三儲存裝置
第四百九十四儲存裝置
第四百九十五儲存裝置
第四百九十六儲存裝置
第四百九十七儲存裝置
第四百九十八儲存裝置
第四百九十九儲存裝置
第五百儲存裝置
第五百一儲存裝置
第五百二儲存裝置
第五百三儲存裝置
第五百四儲存裝置
第五百五儲存裝置
第五百六儲存裝置
第五百七儲存裝置
第五百八儲存裝置
第五百九儲存裝置
第五百十儲存裝置
第五百十一儲存裝置
第五百十二儲存裝置
第五百十三儲存裝置
第五百十四儲存裝置
第五百十五儲存裝置
第五百十六儲存裝置
第五百十七儲存裝置
第五百十八儲存裝置
第五百十九儲存裝置
第五百二十儲存裝置
第五百二十一儲存裝置
第五百二十二儲存裝置
第五百二十三儲存裝置
第五百二十四儲存裝置
第五百二十五儲存裝置
第五百二十六儲存裝置
第五百二十七儲存裝置
第五百二十八儲存裝置
第五百二十九儲存裝置
第五百三十儲存裝置
第五百三十一儲存裝置
第五百三十二儲存裝置
第五百三十三儲存裝置
第五百三十四儲存裝置
第五百三十五儲存裝置
第五百三十六儲存裝置
第五百三十七儲存裝置
第五百三十八儲存裝置
第五百三十九儲存裝置
第五百四十儲存裝置
第五百四十一儲存裝置
第五百四十二儲存裝置
第五百四十三儲存裝置
第五百四十四儲存裝置
第五百四十五儲存裝置
第五百四十六儲存裝置
第五百四十七儲存裝置
第五百四十八儲存裝置
第五百四十九儲存裝置
第五百五十儲存裝置
第五百五十一儲存裝置
第五百五十二儲存裝置
第五百五十三儲存裝置
第五百五十四儲存裝置
第五百五十五儲存裝置
第五百五十六儲存裝置
第五百五十七儲存裝置
第五百五十八儲存裝置
第五百五十九儲存裝置
第五百六十儲存裝置
第五百六十一儲存裝置
第五百六十二儲存裝置
第五百六十三儲存裝置
第五百六十四儲存裝置
第五百六十五儲存裝置
第五百六十六儲存裝置
第五百六十七儲存裝置
第五百六十八儲存裝置
第五百六十九儲存裝置
第五百七十儲存裝置
第五百七十一儲存裝置
第五百七十二儲存裝置
第五百七十三儲存裝置
第五百七十四儲存裝置
第五百七十五儲存裝置
第五百七十六儲存裝置
第五百七十七儲存裝置
第五百七十八儲存裝置
第五百七十九儲存裝置
第五百八十儲存裝置
第五百八十一儲存裝置
第五百八十二儲存裝置
第五百八十三儲存裝置
第五百八十四儲存裝置
第五百八十五儲存裝置
第五百八十六儲存裝置
第五百八十七儲存裝置
第五百八十八儲存裝置
第五百八十九儲存裝置
第五百九十儲存裝置
第五百九十一儲存裝置
第五百九十二儲存裝置
第五百九十三儲存裝置
第五百九十四儲存裝置
第五百九十五儲存裝置
第五百九十六儲存裝置
第五百九十七儲存裝置
第五百九十八儲存裝置
第五百九十九儲存裝置
第六百儲存裝置
第六百一儲存裝置
第六百二儲存裝置
第六百三儲存裝置
第六百四儲存裝置
第六百五儲存裝置
第六百六儲存裝置
第六百七儲存裝置
第六百八儲存裝置
第六百九儲存裝置
第六百十儲存裝置
第六百十一儲存裝置
第六百十二儲存裝置
第六百十三儲存裝置
第六百十四儲存裝置
第六百十五儲存裝置
第六百十六儲存裝置
第六百十七儲存裝置
第六百十八儲存裝置
第六百十九儲存裝置
第六百二十儲存裝置
第六百二十一儲存裝置
第六百二十二儲存裝置
第六百二十三儲存裝置
第六百二十四儲存裝置
第六百二十五儲存裝置
第六百二十六儲存裝置
第六百二十七儲存裝置
第六百二十八儲存裝置
第六百二十九儲存裝置
第六百三十儲存裝置
第六百三十一儲存裝置
第六百三十二儲存裝置
第六百三十三儲存裝置
第六百三十四儲存裝置
第六百三十五儲存裝置
第六百三十六儲存裝置
第六百三十七儲存裝置
第六百三十八儲存裝置
第六百三十九儲存裝置
第六百四十儲存裝置
第六百四十一儲存裝置
第六百四十二儲存裝置
第六百四十三儲存裝置
第六百四十四儲存裝置
第六百四十五儲存裝置
第六百四十六儲存裝置
第六百四十七儲存裝置
第六百四十八儲存裝置
第六百四十九儲存裝置
第六百五十儲存裝置
第六百五十一儲存裝置
第六百五十二儲存裝置
第六百五十三儲存裝置
第六百五十四儲存裝置
第六百五十五儲存裝置
第六百五十六儲存裝置
第六百五十七儲存裝置
第六百五十八儲存裝置
第六百五十九儲存裝置
第六百六十儲存裝置
第六百六十一儲存裝置
第六百六十二儲存裝置
第六百六十三儲存裝置
第六百六十四儲存裝置
第六百六十五儲存裝置
第六百六十六儲存裝置
第六百六十七儲存裝置
第六百六十八儲存裝置
第六百六十九儲存裝置
第六百七十儲存裝置
第六百七十一儲存裝置
第六百七十二儲存裝置
第六百七十三儲存裝置
第六百七十四儲存裝置
第六百七十五儲存裝置
第六百七十六儲存裝置
第六百七十七儲存裝置
第六百七十八儲存裝置
第六百七十九儲存裝置
第六百八十儲存裝置
第六百八十一儲存裝置
第六百八十二儲存裝置
第六百八十三儲存裝置
第六百八十四儲存裝置
第六百八十五儲存裝置
第六百八十六儲存裝置
第六百八十七儲存裝置
第六百八十八儲存裝置
第六百八十九儲存裝置
第六百九十儲存裝置
第六百九十一儲存裝置
第六百九十二儲存裝置
第六百九十三儲存裝置
第六百九十四儲存裝置
第六百九十五儲存裝置
第六百九十六儲存裝置
第六百九十七儲存裝置
第六百九十八儲存裝置
第六百九十九儲存裝置
第七百儲存裝置
第七百一儲存裝置
第七百二儲存裝置
第七百三儲存裝置
第七百四儲存裝置
第七百五儲存裝置
第七百六儲存裝置
第七百七儲存裝置
第七百八儲存裝置
第七百九儲存裝置
第七百十儲存裝置
第七百十一儲存裝置
第七百十二儲存裝置
第七百十三儲存裝置
第七百十四儲存裝置
第七百十五儲存裝置
第七百十六儲存裝置
第七百十七儲存裝置
第七百十八儲存裝置
第七百十九儲存裝置
第七百二十儲存裝置
第七百二十一儲存裝置
第七百二十二儲存裝置
第七百二十三儲存裝置
第七百二十四儲存裝置
第七百二十五儲存裝置
第七百二十六儲存裝置
第七百二十七儲存裝置
第七百二十八儲存裝置
第七百二十九儲存裝置
第七百三十儲存裝置
第七百三十一儲存裝置
第七百三十二儲存裝置
第七百三十三儲存裝置
第七百三十四儲存裝置
第七百三十五儲存裝置
第七百三十六儲存裝置
第七百三十七儲存裝置
第七百三十八儲存裝置
第七百三十九儲存裝置
第七百四十儲存裝置
第七百四十一儲存裝置
第七百四十二儲存裝置
第七百四十三儲存裝置
第七百四十四儲存裝置
第七百四十五儲存裝置
第七百四十六儲存裝置
第七百四十七儲存裝置
第七百四十八儲存裝置
第七百四十九儲存裝置
第七百五十儲存裝置
第七百五十一儲存裝置
第七百五十二儲存裝置
第七百五十三儲存裝置
第七百五十四儲存裝置
第七百五十五儲存裝置
第七百五十六儲存裝置
第七百五十七儲存裝置
第七百五十八儲存裝置
第七百五十九儲存裝置
第七百六十儲存裝置
第七百六十一儲存裝置
第七百六十二儲存裝置
第七百六十三儲存裝置
第七百六十四儲存裝置
第七百六十五儲存裝置
第七百六十六儲存裝置
第七百六十七儲存裝置
第七百六十八儲存裝置
第七百六十九儲存裝置
第七百七十儲存裝置
第七百七十一儲存裝置
第七百七十二儲存裝置
第七百七十三儲存裝置
第七百七十四儲存裝置
第七百七十五儲存裝置
第七百七十六儲存裝置
第七百七十七儲存裝置
第七百七十八儲存裝置
第七百七十九儲存裝置
第七百八十儲存裝置
第七百八十一儲存裝置
第七百八十二儲存裝置
第七百八十三儲存裝置
第七百八十四儲存裝置
第七百八十五儲存裝置
第七百八十六儲存裝置
第七百八十七儲存裝置
第七百八十八儲存裝置
第七百八十九儲存裝置
第七百九十儲存裝置
第七百九十一儲存裝置
第七百九十二儲存裝置
第七百九十三儲存裝置
第七百九十四儲存裝置
第七百九十五儲存裝置
第七百九十六儲存裝置
第七百九十七儲存裝置
第七百九十八儲存裝置
第七百九十九儲存裝置
第八百儲存裝置
第八百一儲存裝置
第八百二儲存裝置
第八百三儲存裝置
第八百四儲存裝置
第八百五儲存裝置
第八百六儲存裝置
第八百七儲存裝置
第八百八儲存裝置
第八百九儲存裝置
第八百十儲存裝置
第八百十一儲存裝置
第八百十二儲存裝置
第八百十三儲存裝置
第八百十四儲存裝置
第八百十五儲存裝置
第八百十六儲存裝置
第八百十七儲存裝置
第八百十八儲存裝置
第八百十九儲存裝置
第八百二十儲存裝置
第八百二十一儲存裝置
第八百二十二儲存裝置
第八百二十三儲存裝置
第八百二十四儲存裝置
第八百二十五儲存裝置
第八百二十六儲存裝置
第八百二十七儲存裝置
第八百二十八儲存裝置
第八百二十九儲存裝置
第八百三十儲存裝置
第八百三十一儲存裝置
第八百三十二儲存裝置
第八百三十三儲存裝置
第八百三十四儲存裝置
第八百三十五儲存裝置
第八百三十六儲存裝置
第八百三十七儲存裝置
第八百三十八儲存裝置
第八百三十九儲存裝置
第八百四十儲存裝置
第八百四十一儲存裝置
第八百四十二儲存裝置
第八百四十三儲存裝置
第八百四十四儲存裝置
第八百四十五儲存裝置
第八百四十六儲存裝置
第八百四十七儲存裝置
第八百四十八儲存裝置
第八百四十九儲存裝置
第八百五十儲存裝置
第八百五十一儲存裝置
第八百五十二儲存裝置
第八百五十三儲存裝置
第八百五十四儲存裝置
第八百五十五儲存裝置
第八百五十六儲存裝置
第八百五十七儲存裝置
第八百五十八儲存裝置
第八百五十九儲存裝置
第八百六十儲存裝置
第八百六十一儲存裝置
第八百六十二儲存裝置
第八百六十三儲存裝置
第八百六十四儲存裝置
第八百六十五儲存裝置
第八百六十六儲存裝置
第八百六十七儲存裝置
第八百六十八儲存裝置
第八百六十九儲存裝置
第八百七十儲存裝置
第八百七十一儲存裝置
第八百七十二儲存裝置
第八百七十三儲存裝置
第八百七十四儲存裝置
第八百七十五儲存裝置
第八百七十六儲存裝置
第八百七十七儲存裝置
第八百七十八儲存裝置
第八百七十九儲存裝置
第八百八十儲存裝置
第八百八十一儲存裝置
第八百八十二儲存裝置
第八百八十三儲存裝置
第八百八十四儲存裝置
第八百八十五儲存裝置
第八百八十六儲存裝置
第八百八十七儲存裝置
第八百八十八儲存裝置
第八百八十九儲存裝置
第八百九十儲存裝置
第八百九十一儲存裝置
第八百九十二儲存裝置
第八百九十三儲存裝置
第八百九十四儲存裝置
第八百九十五儲存裝置
第八百九十六儲存裝置
第八百九十七儲存裝置
第八百九十八儲存裝置
第八百九十九儲存裝置
第九百儲存裝置
第九百一儲存裝置
第九百二儲存裝置
第九百三儲存裝置
第九百四儲存裝置
第九百五儲存裝置
第九百六儲存裝置
第九百七儲存裝置
第九百八儲存裝置
第九百九儲存裝置
第九百十儲存裝置
第九百十一儲存裝置
第九百十二儲存裝置
第九百十三儲存裝置
第九百十四儲存裝置
第九百十五儲存裝置
第九百十六儲存裝置
第九百十七儲存裝置
第九百十八儲存裝置
第九百十九儲存裝置
第九百二十儲存裝置
第九百二十一儲存裝置
第九百二十二儲存裝置
第九百二十三儲存裝置
第九百二十四儲存裝置
第九百二十五儲存裝置
第九百二十六儲存裝置
第九百二十七儲存裝置
第九百二十八儲存裝置
第九百二十九儲存裝置
第九百三十儲存裝置
第九百三十一儲存裝置
第九百三十二儲存裝置
第九百三十三儲存裝置
第九百三十四儲存裝置
第九百三十五儲存裝置
第九百三十六儲存裝置
第九百三十七儲存裝置
第九百三十八儲存裝置
第九百三十九儲存裝置
第九百四十儲存裝置
第九百四十一儲存裝置
第九百四十二儲存裝置
第九百四十三儲存裝置
第九百四十四儲存裝置
第九百四十五儲存裝置
第九百四十六儲存裝置
第九百四十七儲存裝置
第九百四十八儲存裝置
第九百四十九儲存裝置
第九百五十儲存裝置
第九百五十一儲存裝置
第九百五十二儲存裝置
第九百五十三儲存裝置
第九百五十四儲存裝置
第九百五十五儲存裝置
第九百五十六儲存裝置
第九百五十七儲存裝置
第九百五十八儲存裝置
第九百五十九儲存裝置
第九百六十儲存裝置
第九百六十一儲存裝置
第九百六十二儲存裝置
第九百六十三儲存裝置
第九百六十四儲存裝置
第九百六十五儲存裝置
第九百六十六儲存裝置
第九百六十七儲存裝置
第九百六十八儲存裝置
第九百六十九儲存裝置
第九百七十儲存裝置
第九百七十一儲存裝置
第九百七十二儲存裝置
第九百七十三儲存裝置
第九百七十四儲存裝置
第九百七十五儲存裝置
第九百七十六儲存裝置
第九百七十七儲存裝置
第九百七十八儲存裝置
第九百七十九儲存裝置
第九百八十儲存裝置
第九百八十一儲存裝置
第九百八十二儲存裝置
第九百八十三儲存裝置
第九百八十四儲存裝置
第九百八十五儲存裝置
第九百八十六儲存裝置
第九百八十七儲存裝置
第九百八十八儲存裝置
第九百八十九儲存裝置
第九百九十儲存裝置
第九百九十一儲存裝置
第九百九十二儲存裝置
第九百九十三儲存裝置
第九百九十四儲存裝置
第九百九十五儲存裝置
第九百九十六儲存裝置
第九百九十七儲存裝置
第九百九十八儲存裝置
第九百九十九儲存裝置
第一千儲存裝置
第一千一儲存裝置
第一千二儲存裝置
第一千三儲存裝置
第一千四儲存裝置
第一千五儲存裝置
第一千六儲存裝置
第一千七儲存裝置
第一千八儲存裝置
第一千九儲存裝置
第一千十儲存裝置
第一千十一儲存裝置
第一千十二儲存裝置
第一千十三儲存裝置
第一千十四儲存裝置
第一千十五儲存裝置
第一千十六儲存裝置
第一千十七儲存裝置
第一千十八儲存裝置
第一千十九儲存裝置
第一千二十儲存裝置
第一千二十一儲存裝置
第一千二十二儲存裝置
第一千二十三儲存裝置
第一千二十四儲存裝置
第一千二十五儲存裝置
第一千二十六儲存裝置
第一千二十七儲存裝置
第一千二十八儲存裝置
第一千二十九儲存裝置
第一千三十儲存裝置
第一千三十一儲存裝置
第一千三十二儲存裝置
第一千三十三儲存裝置
第一千三十四儲存裝置
第一千三十五儲存裝置
第一千三十六儲存裝置
第一千三十七儲存裝置
第一千三十八儲存裝置
第一千三十九儲存裝置
第一千四十儲存裝置
第一千四十一儲存裝置
第一千四十二儲存裝置
第一千四十三儲存裝置
第一千四十四儲存裝置
第一千四十五儲存裝置
第一千四十六儲存裝置
第一千四十七儲存裝置
第一千四十八儲存裝置
第一千四十九儲存裝置
第一千五十儲存裝置
第一千五十一儲存裝置
第一千五十二儲存裝置
第一千五十三儲存裝置
第一千五十四儲存裝置
第一千五十五儲存裝置
第一千五十六儲存裝置
第一千五十七儲存裝置
第一千五十八儲存裝置
第一千五十九儲存裝置
第一千六十儲存裝置
第一千六十一儲存裝置
第一千六十二儲存裝置
第一千六十三儲存裝置
第一千六十四儲存裝置
第一千六十五儲存裝置
第一千六十六儲存裝置
第一千六十七儲存裝置
第一千六十八儲存裝置
第一千六十九儲存裝置
第一千七十儲存裝置
第一千七十一儲存裝置
第一千七十二儲存裝置
第一千七十三儲存裝置
第一千七十四儲存裝置
第一千七十五儲存裝置
第一千七十六儲存裝置
第一千七十七儲存裝置
第一千七十八儲存裝置
第一千七十九儲存裝置
第一千八十儲存裝置
第一千八十一儲存裝置
第一千八十二儲存裝置
第一千八十三儲存裝置
第一千八十四儲存裝置
第一千八十五儲存裝置
第一千八十六儲存裝置
第一千八十七儲存裝置
第一千八十八儲存裝置
第一千八十九儲存裝置
第一千九十儲存裝置
第一千九十一儲存裝置
第一千九十二儲存裝置
第一千九十三儲存裝置
第一千九十四儲存裝置
第一千九十五儲存裝置
第一千九十六儲存裝置
第一千九十七儲存裝置
第一千九十八儲存裝置
第一千九十九儲存裝置
第一千一百儲存裝置
第一千一百一儲存裝置
第一千一百二儲存裝置
第一千一百三儲存裝置
第一千一百四儲存裝置
第一千一百五儲存裝置
第一千一百六儲存裝置
第一千一百七儲存裝置
第一千一百八儲存裝置
第一千一百九儲存裝置
第一千一百十儲存裝置
第一千一百十一儲存裝置
第一千一百十二儲存裝置
第一千一百十三儲存裝置
第一千一百十四儲存裝置
第一千一百十五儲存裝置
第一千一百十六儲存裝置
第一千一百十七儲存裝置
第一千一百十八儲存裝置
第一千一百十九儲存裝置
第一千一百二十儲存裝置
第一千一百二十一儲存裝置
第一千一百二十二儲存裝置
第一千一百二十三儲存裝置
第一千一百二十四儲存裝置
第一千一百二十五儲存裝置
第一千一百二十六儲存裝置
第一千一百二十七儲存裝置
第一千一百二十八儲存裝置
第一千一百二十九儲存裝置
第一千一百三十儲存裝置
第一千一百三十一儲存裝置
第一千一百三十二儲存裝置
第一千一百三十三儲存裝置
第一千一百三十四儲存裝置
第一千一百三十五儲存裝置
第一千一百三十六儲存裝置
第一千一百三十七儲存裝置
第一千一百三十八儲存裝置
第一千一百三十九儲存裝置
第一千一百四十儲存裝置
第一千一百四十一儲存裝置
第一千一百四十二儲存裝置
第一千一百四十三儲存裝置
第一千一百四十四儲存裝置
第一千一百四十五儲存裝置
第一千一百四十六儲存裝置
第一千一百四十七儲存裝置
第一千一百四十八儲存裝置
第一千一百四十九儲存裝置
第一千一百五十儲存裝置
第一千一百五十一儲存裝置
第一千一百五十二儲存裝置
第一千一百五十三儲存裝置
第一千一百五十四儲存裝置
第一千一百五十五儲存裝置
第一千一百五十六儲存裝置
第一千一百五十七儲存裝置
第一千一百五十八儲存裝置
第一千一百五十九儲存裝置
第一千一百六十儲存裝置
第一千一百六十一儲存裝置
第一千一百六十二儲存裝置
第一千一百六十三儲存裝置
第一千一百六十四儲存裝置
第一千一百六十五儲存裝置
第一千一百六十六儲存裝置
第一千一百六十七儲存裝置
第一千一百六十八儲存裝置
第一千一百六十九儲存裝置
第一千一百七十儲存裝置
第一千一百七十一儲存裝置
第一千一百七十二儲存裝置
第一千一百七十三儲存裝置
第一千一百七十四儲存裝置
第一千一百七十五儲存裝置
第一千一百七十六儲存裝置
第一千一百七十七儲存裝置
第一千一百七十八儲存裝置
第一千一百七十九儲存裝置
第一千一百八十儲存裝置
第一千一百八十一儲存裝置
第一千一百八十二儲存裝置
第一千一百八十三儲存裝置
第一千一百八十四儲存裝置
第一千一百八十五儲存裝置
第一千一百八十六儲存裝置
第一千一百八十七儲存裝置
第一千一百八十八儲存裝置
第一千一百八十九儲存裝置
第一千一百九十儲存裝置
第一千一百九十一儲存裝置
第一千一百九十二儲存裝置
第一千一百九十三儲存裝置
第一千一百九十四儲存裝置
第一千一百九十五儲存裝置
第一千一百九十六儲存裝置
第一千一百九十七儲存裝置
第一千一百九十八儲存裝置
第一千一百九十九儲存裝置
第一千二百儲存裝置
第一千二百一儲存裝置
第一千二百二儲存裝置
第一千二百三儲存裝置
第一千二百四儲存裝置
第一千二百五儲存裝置
第一千二百六儲存裝置
第一千二百七儲存裝置
第一千二百八儲存裝置
第一千二百九儲存裝置
第一千二百十儲存裝置
第一千二百十一儲存裝置
第一千二百十二儲存裝置
第一千二百十三儲存裝置
第一千二百十四儲存裝置
第一千二百十五儲存裝置
第一千二百十六儲存裝置
第一千二百十七儲存裝置
第一千二百十八儲存裝置
第一千二百十九儲存裝置
第一千二百二十儲存裝置
第一千二百二十一儲存裝置
第一千二百二十二儲存裝置
第一千二百二十三儲存裝置
第一千二百二十四儲存裝置
第一千二百二十五儲存裝置
第一千二百二十六儲存裝置
第一千二百二十七儲存裝置
第一千二百二十八儲存裝置
第一千二百二十九儲存裝置
第一千二百三十儲存裝置
第一千二百三十一儲存裝置
第一千二百三十二儲存裝置
第一千二百三十三儲存裝置
第一千二百三十四儲存裝置
第一千二百三十五儲存裝置
第一千二百三十六儲存裝置
第一千二百三十七儲存裝置
第一千二百三十八儲存裝置
第一千二百三十九儲存裝置
第一千二百四十儲存裝置
第一千二百四十一儲存裝置
第一千二百四十二儲存裝置
第一千二百四十三儲存裝置
第一千二百四十四儲存裝置
第一千二百四十五儲存裝置
第一千二百四十六儲存裝置
第一千二百四十七儲存裝置
第一千二百四十八儲存裝置
第一千二百四十九儲存裝置
第一千二百五十儲存裝置
第一千二百五十一儲存裝置
第一千二百五十二儲存裝置
第一千二百五十三儲存裝置
第一千二百五十四儲存裝置
第一千二百五十五儲存裝置
第一千二百五十六儲存裝置
第一千二百五十七儲存裝置
第一

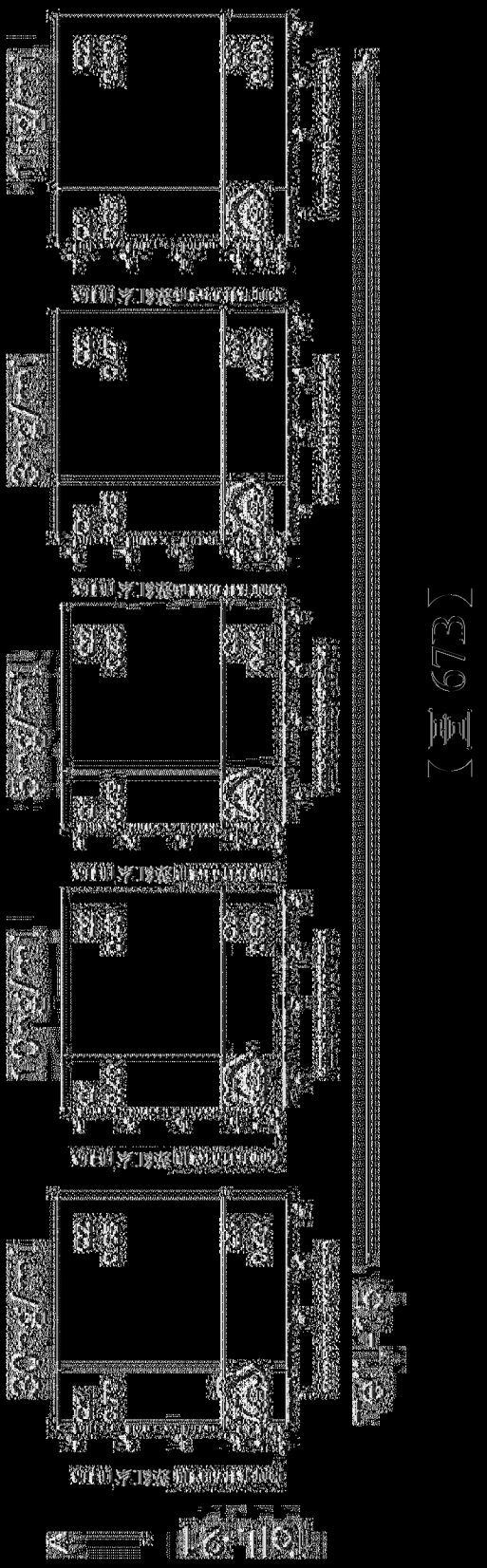


圖 3-3