



(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 202028457 A

(43) 公開日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 01 日

(21) 申請案號：108134042

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 09 月 20 日

(51) Int. Cl. : C12N5/078 (2010.01)

A01N1/02 (2006.01)

A61K35/17 (2015.01)

(30) 優先權：2018/09/20 美國

62/733,937

2019/07/29 美國

62/879,881

(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：維爾拉帕斯朗 安南 VEERAPATHRAN, ANAND (IN)；尼穆斯 肯尼斯 ONIMUS,
KENNETH (US)

(74) 代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：75 項 圖式數：25 共 488 頁

(54) 名稱

來自經冷凍保存之腫瘤樣本之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (T I L) 之擴增

(57) 摘要

在一些實施例中，揭示擴增來自經冷凍保存之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞之方法及使用該經擴增之腫瘤浸潤性淋巴細胞治療人疾病(包括癌症)之方法。在一些實施例中，揭示經冷凍保存之腫瘤組織之組成物。

In some embodiments, methods of expanding tumor infiltrating lymphocytes from cryopreserved tumor tissue and methods of using the expanded tumor infiltrating lymphocytes in the treatment of human diseases, including cancers, are disclosed In some embodiments, compositions of cryopreserved tumor tissues are disclosed.

指定代表圖：

過程2A：從第一擴增開始至步驟E約22天

1. 步驟A

獲得病患腫瘤樣本

2. 步驟B

碎斷腫瘤組織片段之
冷凍保存第一擴增
3天至14天

3. 步驟C

第一擴增轉變至第二擴增
無儲存及密閉系統

4. 步驟D

第二擴增
IL-2、OKT-3及抗原呈現餵養細胞
密閉系統

5. 步驟E

收集來自步驟D的TILS
密閉系統

6. 步驟F

最終配方及/或轉移至輸注袋
(可選地冷凍保存)

【圖 1】



202028457

【發明摘要】

【中文發明名稱】

來自經冷凍保存之腫瘤樣本之腫瘤浸潤性淋巴細胞
(T I L) 之擴增

【英文發明名稱】

EXPANSION OF TILS FROM CRYOPRESERVED TUMOR SAMPLES

【中文】

在一些實施例中，揭示擴增來自經冷凍保存之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞之方法及使用該經擴增之腫瘤浸潤性淋巴細胞治療人疾病(包括癌症)之方法。在一些實施例中，揭示經冷凍保存之腫瘤組織之組成物。

【英文】

In some embodiments, methods of expanding tumor infiltrating lymphocytes from cryopreserved tumor tissue and methods of using the expanded tumor infiltrating lymphocytes in the treatment of human diseases, including cancers, are disclosed. In some embodiments, compositions of cryopreserved tumor tissues are disclosed.

【指定代表圖】第(1)圖。
【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】

來自經冷凍保存之腫瘤樣本之腫瘤浸潤性淋巴細胞
(T I L) 之擴增

【英文發明名稱】

EXPANSION OF TILS FROM CRYOPRESERVED TUMOR
SAMPLES

【技術領域】

【0001】本文所述之發明大致上關於淋巴細胞之擴增，且更具體地但非絕對關於來自經冷凍保存之腫瘤組織之淋巴細胞之擴增。

【先前技術】

【0002】使用過繼性轉移腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)治療難治療性癌症代表一種潛力強大的預後不良病患治療方案。Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 383-393。成功免疫治療需要大量的TIL；因此，需要強健及可靠的製造及商業化過程。由於細胞擴增的眾多技術、物流及法規問題，此商業化規模是一項重大挑戰。基於IL-2的TIL擴增及隨後的「快速擴增過程」(REP)已因其效率而成為TIL擴增的較佳方法。Dudley, *et al.*, *Science* **2002**, 298, 850-54；Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 2346-

57 ; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233-39 ; Riddell, *et al.*, *Science* **1992**, 257, 238-41 ; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42。REP可在14天期間導致1,000倍的TIL擴增，儘管其需要大量過量(例如，200倍)的經照射的通常來自多個供體之同種異體周邊血液單核細胞(PBMC，亦稱為單核細胞(MNC))作為餵養細胞，還需要抗CD3抗體(OKT3)及高劑量的IL-2。Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42。經歷REP程序的TIL已在宿主免疫抑制後的一些黑色素瘤病患中產生成功的過繼性細胞療法。

【0003】目前的TIL製造過程受限於期間、成本、無菌性考量及本文所述之其他因子，使得該等過程之商業化潛力受到嚴重限制。在目前過程的許多限制當中，依賴新鮮腫瘤組織以起始製造是其中之一，由於長距離運輸新鮮腫瘤的困難，因此通常需要昂貴及高成本的當地製造機構。有提供不依賴新鮮腫瘤組織且適用於商業規模製造且經法規核准用於地理廣泛分散人病患之TIL製造過程及療法的迫切需求。

【發明內容】

【0004】在一實施例中，本發明提供TIL擴增方法，該方法利用經冷凍之腫瘤組織作為起始的TIL來源材料以產生治療性TIL族群。

【0005】在一實施例中，本發明提供一種冷凍保存用

於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之腫瘤組織之方法，該方法包含：

- (i)碎斷該腫瘤組織；
- (ii)於冷凍保存培養基(cryopreservation medium)中培育該等片段；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【0006】在一實施例中，本發明提供一種藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之經冷凍保存之腫瘤片段，該程序包含下列步驟：

- (i)碎斷腫瘤樣本；
- (ii)於冷凍保存培養基中培育該等片段；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【0007】在一實施例中，本發明提供一種藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之經冷凍保存之腫瘤片段，該程序包含下列步驟：

- (i)碎斷腫瘤樣本；
- (ii)於包含約10% v/v二甲亞砷之冷凍保存培養基中，在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育該等片段約20分鐘至約70分鐘；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【0008】在一實施例中，本發明提供一種用於擴增來

自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含在冷凍之前將該腫瘤組織在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少30分鐘；
- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (d)移走至少複數個該等TIL；及
- (e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0009】 在一實施例中，本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織；
- (b)將該腫瘤組織在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少30分鐘；
- (c)冷凍該腫瘤組織；
- (d)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存；
- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (d)移走至少複數個該等TIL；及

(e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0010】在一些實施例中，儲存培養基包含2至12% v/v(體積:體積)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，儲存培養基包含5% v/v DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含10% v/v DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含介於5與10% v/v之間的DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含選自由1% v/v、2% v/v、3% v/v、4% v/v、5% v/v、6% v/v、7% v/v、8% v/v、9% v/v、10% v/v、11% v/v、12% v/v、13% v/v、14% v/v及15% v/v所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的儲存培養基係水介質。

【0011】在一些實施例中，儲存培養基包含2至12% w/w(重量:重量)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，儲存培養基包含5% w/w DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含10% w/w DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含介於5與10% w/w之間的DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含選自由1% w/w、2% w/w、3% w/w、4% w/w、5% w/w、6% w/w、7% w/w、8% w/w、9% w/w、10% w/w、11% w/w、12% w/w、13% w/w、14% w/w及15% w/w所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的儲存培養基係水介質。

【0012】在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在

約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少 30 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育介於 30 分鐘與約 60 分鐘之間。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育約 45 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育約 60 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育 60 分鐘。

【0013】在一些實施例中，儲存培養基包含約 5% v/v DMSO 且腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育約 60 分鐘。在一些實施例中，儲存培養基包含約 10% v/v DMSO 且腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少 30 分鐘至約 60 分鐘。

【0014】在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

(a) 將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：

(i) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(iii) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 20 分鐘至約 70 分鐘，該容器含有該腫瘤組

織及該儲存培養基；

(iv) 冷凍該容器；及

(v) 儲存該容器以使該容器維持冷凍；

(b) 解凍該容器；

(c) 在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素

2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；

(d) 移走至少複數個該等 TIL；

(e) 在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的
餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等 TIL以
提供經擴增數量的 TIL。

【0015】 在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍
之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

(a) 自病患獲得腫瘤組織；

(b) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(b) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器
中；

(c) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 20 分
鐘至約 70 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培
養基；

(d) 冷凍該容器；

(e) 儲存該容器以使該容器維持冷凍；

(d) 解凍該容器；

(f) 在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素
2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；

(g)移走至少複數個該等 TIL；及

(h)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及 IL-2之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0016】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成直徑介於 1.5 mm 與 6 mm 之間及厚度介於 1.5 mm 與 6 mm 之間。在仍其他實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成約 6 mm × 6 mm × 6 mm。

【0017】在一些實施例中，儲存培養基進一步包含抗細菌劑。在一些實施例中，抗細菌劑係建它黴素 (gentamicin)。在一些實施例中，儲存培養基包含濃度至少 50 µg/mL 之建它黴素。在一些實施例中，儲存培養基包含抗細菌劑、抗真菌劑及彼等之組合。在一些實施例中，抗真菌劑係兩性黴素 B (amphotericin B) 且係以約 0.25 µg/mL 至約 2.5 µg/mL 存在。在一些實施例中，抗真菌劑係黴菌素 (fungin) 且係以約 5 µg/mL 至約 50 µg/mL 存在。

【0018】在一些實施例中，在執行該方法的冷凍步驟之前首先將新鮮腫瘤組織於 Hank 氏平衡鹽溶液 (HBSS) 或另一合適培養基或溶液中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之至少三次連續洗滌，其中在每次洗滌之後置換 HBSS。

【0019】在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入 37°C 水浴中約 5 分鐘。

【0020】在一些實施例中，冷凍步驟包含在約 -125°C

至約 -195°C 之溫度下冷凍該容器。在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -150°C ；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -145°C ；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約 -135°C 。

【0021】在一些實施例中，該方法係以來自人個體之新鮮腫瘤樣本執行。

【0022】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)及HPV陽性腫瘤組織。

【0023】在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一擴增步驟(c)及該第二擴增步驟(e)之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在第16天。在一些實施例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(c)至(e)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(c)至(e)以21天完成；在一些實施例中，步驟(c)至(e)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(c)至(e)以約16天完成。

【0024】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治

療之人個體的癌症之方法，該方法包含投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)，該方法包含：

(a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：

(i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(iii)將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約20分鐘至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(iv)使用汽相液態氮冷凍該容器；及

(v)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；

(b)解凍該腫瘤組織；

(c)將該等腫瘤片段加入密閉系統；

(d)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7

- 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，該治療性 TIL 族群包含相對於該第二 TIL 族群增加的效應 T 細胞及/或中央記憶 T 細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (d) 轉變至步驟 (e) 無需打開該系統而發生；
- (f) 收集獲自步驟 (f) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (e) 轉變至步驟 (f) 無需打開該系統而發生；
- (g) 將得自步驟 (f) 之該經收集之 TIL 族群轉移至輸注袋，其中自步驟 (f) 轉移至步驟 (g) 無需打開該系統而發生；
- (h) 使用冷凍保存程序將來自步驟 (g) 之包含該經收集之 TIL 族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (i) 投予治療有效劑量的來自步驟 (g) 之該輸注袋的該第三 TIL 族群至該個體。

【0025】 在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL)，該方法包含：

- (a) 自該個體獲得腫瘤組織；
- (b) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (c) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
- (d) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 20 分鐘至約 70 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存

- 培養基；
- (e)使用汽相液態氮冷凍該容器；
 - (f)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
 - (g)解凍該腫瘤組織；
 - (h)將該腫瘤組織添加至密閉系統；
 - (i)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生；
 - (j)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(i)轉變至步驟(j)無需打開該系統而發生；
 - (k)收集獲自步驟(j)之該治療性TIL族群，其中自步驟(j)轉變至步驟(k)無需打開該系統而發生；

- (l)將步驟(k)收集之該治療性TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(k)轉移至步驟(l)無需打開該系統而發生；
- (m)使用冷凍保存程序將來自步驟(l)之包含該治療性TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (n)投予治療有效劑量的來自步驟(m)之該輸注袋的該治療性TIL族群至該個體。

【0026】在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包括例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠質母細胞瘤、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結直腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、黑色素瘤、難治療性黑色素瘤、轉移性黑色素瘤及非小細胞肺癌。實性腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0027】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含TIL；
- (b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含在冷凍之前在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育該腫瘤組織約30分鐘；
- (c)解凍該腫瘤組織；
- (d)在氣體可通透容器中以包含介白素2(IL-2)及可選地OKT-3抗體之第一細胞培養基處理該腫瘤組織以

提供 TIL；

(e)移走至少複數個該等 TIL；及

(f)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的
餵養細胞、OKT-3抗體及 IL-2 之第二細胞培養基擴
增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0028】 本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤
組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

(a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；

(b)將該腫瘤組織在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲
存培養基中培育約 30 分鐘；

(c)冷凍該腫瘤組織；

(d)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存；

(e)解凍該腫瘤組織；

(f)在氣體可通透容器中以包含介白素 2(IL-2)及可選地
OKT-3抗體之第一細胞培養基處理該腫瘤組織以提
供 TIL；

(g)移走至少複數個該等 TIL；及

(h)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射
的餵養細胞、OKT-3抗體及 IL-2 之第二細胞培養基
擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0029】 在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍
之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

(a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；

(b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織

之方法包含：

- (i) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv) 冷凍該容器；及
 - (v) 儲存該容器以使該容器維持冷凍；
- (c) 解凍該容器；
- (d) 在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (e) 移走至少複數個該等TIL；及
- (f) 在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0030】 在一些實施例中，在執行該方法的冷凍步驟之前首先將新鮮腫瘤組織於Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之至少三次連續洗滌，其中在每次洗滌之後置換HBSS。

【0031】 在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入 37°C 水浴中約5分鐘。

【0032】 在一些實施例中，冷凍步驟包含在約 -125°C 至約 -195°C 之溫度下冷凍該容器。在一些實施例中，容器

的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -150°C ；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -145°C ；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約 -135°C 。

【0033】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)及HPV陽性腫瘤組織。

【0034】在一些實施例中，該方法進一步包含在第一擴增(或第一培養)步驟及第二擴增(或第二培養)步驟之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在第16天。在一些實施例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(i)至(k)(如適用)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(i)至(k)(如適用)以約21天完成；在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(i)至(k)(如適用)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(i)至(k)(如適用)以約16天完成。

【0035】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含投予經擴增之腫瘤

浸潤性淋巴細胞(TIL)，該方法包含：

- (a)自該個體獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；
- (b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：
 - (i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii)將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv)使用汽相液態氮冷凍該容器；及
 - (v)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (c)解凍該腫瘤組織；
- (d)將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (e)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；
- (f)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的

- IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；
- (g)收集獲自步驟(f)之該治療性TIL族群，其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；
- (h)將自步驟(g)收集之該治療性TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(g)轉移至步驟(h)無需打開該系統而發生；
- (i)使用冷凍保存程序將來自步驟(h)之包含該治療性TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (j)投予治療有效劑量的來自步驟(i)之該輸注袋的該治療性TIL族群至該個體。

【0036】在一些實施例中，在執行該方法的冷凍步驟之前首先將新鮮腫瘤組織於Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之至少三次連續洗滌，其中在每次洗滌之後置換HBSS。

【0037】在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入37°C水浴中約5分鐘。

【0038】在一些實施例中，冷凍步驟包含在約-125°C

至約 -195°C 之溫度下冷凍該容器。在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -150°C ；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -145°C ；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約 -135°C 。

【0039】 在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)及HPV陽性腫瘤組織。

【0040】 在一些實施例中，該方法進一步包含在該第一擴增步驟及該第二擴增步驟之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在第16天。在一些實施例中，第一擴增步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增步驟以約7天完成，且第二擴增步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(e)至(g)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(e)至(g)以約21天完成；在一些實施例中，步驟(e)至(g)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(e)至(g)以約16天完成。

【0041】 在一些實施例中，根據本發明之擴增方法以約16天完成。在一些實施例中，擴增方法包含第一擴增步驟(REP前步驟)及第二擴增步驟(REP步驟)。在一實施例中，第一擴增步驟係約3至約5天。在另一實施例中，第一

擴增步驟係約3天。在另一實施例中，第一擴增步驟係約5天。在一些實施例中，第二擴增步驟係約11至約13天。在另一實施例中，第二擴增步驟係約11天。在另一實施例中，第二擴增步驟係約13天。在一些實施例中，第一擴增步驟係約5天，且第二擴增步驟係約11天。在一些實施例中，第一擴增步驟係約3天，且第二擴增步驟係約13天。

【0042】在一些實施例中，TIL在第二擴增步驟期間分瓶至額外容器。在一些實施例中，TIL在第二擴增步驟之第5天分瓶。在一些實施例中，TIL在第二擴增步驟之第6天分瓶。在一些實施例中，第二擴增步驟係約11天且TIL在第二擴增步驟之第5天分瓶。在一些實施例中，第二擴增步驟係約13天且TIL在第二擴增步驟之第6天分瓶。

【0043】在一些實施例中，第一擴增步驟係3天，第二擴增步驟係13天，且TIL在第二擴增步驟之第6天(全過程的第9天)分瓶。在一些實施例中，第一擴增步驟係5天，第二擴增步驟係11天，且TIL在第二擴增步驟之第5天(全過程的第10天)分瓶。

【0044】在一些實施例中，在第二擴增步驟期間使用餵養細胞。在一實施例中，在1/100規模的過程中，在第二擴增步驟期間使用約2至 50×10^6 個餵養細胞。在另一實施例中，使用約 25×10^6 個餵養細胞。在另一實施例中，使用約 50×10^6 個餵養細胞。在一些實施例中，在完整規模的過程中，使用約2至 50×10^9 個餵養細胞。在一些實施例中，在完整規模的過程中，使用約 2.5×10^9 或約 5×10^9

個餵養細胞。在一些實施例中，餵養細胞係PBMC。

【0045】在一些實施例中，第二擴增步驟接種約 5×10^6 至約 200×10^6 個TIL。在一些實施例中，第二擴增步驟接種約5%至約25%之來自第一擴增步驟之TIL。在一些實施例中，第二擴增步驟接種約10%至約20%之來自第一擴增步驟之TIL。在一些實施例中，第二擴增步驟接種約10%之來自第一擴增步驟之TIL。

【0046】其他實施例包括這些組成物及方法的組合及變化。

【圖式簡單說明】

【0047】本發明之前述摘要說明及下列詳細說明搭配隨附圖式一起閱讀時，將更能清楚了解。

【0048】[圖1]：描繪2A過程實施例的主要步驟，包括新鮮腫瘤組織在步驟B碎斷之後可選的冷凍保存。自第一擴增培養起始至步驟E結束的總時間係約22天。

【0049】[圖2]：圖A至C描繪TIL製造過程之實施例的各種步驟，包括冷凍保存新鮮腫瘤片段允許較晚起始REP前培養。

【0050】[圖3]：描繪TIL製造的實施例，包括冷凍保存新鮮腫瘤片段，該片段接著稍後用於起始REP前培養。

【0051】[圖4]：描繪TIL製造的實施例，包括冷凍保存新鮮腫瘤片段，該片段接著稍後用於起始REP前培養。

【0052】[圖5]：大致比較過程1C實施例與過程2A例

示性實施例。過程 2A 設想 REP 前培養自新鮮腫瘤組織片段或解凍的經冷凍保存之腫瘤組織片段起始。

【0053】[圖 6]：進一步比較過程 1C 實施例與過程 2A 實施例。

【0054】[圖 7]：描繪 2A 過程實施例，其中 REP 「提前」起始。

【0055】[圖 8]：比較衍生自 Gen 2A 過程及經修飾的 Gen 2A 過程(標註為「Gen 2.2」)之總存活細胞，其中 REP 前培養係以新鮮、急速冷凍或在 2°C 至 8°C 下於儲存培養基中培育 30 分鐘或 60 分鐘之後冷凍起始。細胞計數係在 REP 前培養結束時。

【0056】[圖 9]：比較衍生自 Gen 2A 過程及經修飾的 Gen 2A 過程(標註為「Gen 2.2」)之總存活細胞，其中 REP 前培養係以新鮮、急速冷凍或在 2°C 至 8°C 下於儲存培養基中培育 30 分鐘或 60 分鐘之後冷凍起始。細胞計數在 REP 培養結束時。

【0057】[圖 10]：比較由衍生自 Gen 2A 過程及經修飾的 Gen 2A 過程(標註為「Gen 2.2」)之細胞所產生的 IFN- γ ，其中 REP 前培養係以新鮮、急速冷凍或在 2°C 至 8°C 下於儲存培養基中培育 30 分鐘或 60 分鐘之後冷凍起始。

【0058】[圖 11]：描繪 Gen 2 實施例之主要步驟相較於 Gen 2.2 實施例之主要步驟。

【0059】[圖 12]：描繪 1/100 規模 TIL 產生過程之主要步驟。

【 0060 】 [圖 13]：圖 13A 至 13E 描繪自 5 位不同病患處理且在 REP 前期間收集之腫瘤樣本的總存活細胞 (TVC)。使用新鮮 (Gen2 對照) 及經冷凍之腫瘤樣本測量 TVC。在第 11 天記錄新鮮腫瘤樣本之 TVC，或在第 7 天記錄經冷凍之腫瘤樣本之 TVC。圖 13A (病患 M1125) 顯示腫瘤樣本進行不同冷凍方法之唯一一位病患：在汽相液態氮中急速冷凍，且在汽相液態氮中急速冷凍之前在攝氏 2 至 8° 下培育 30 或 60 分鐘。至於剩餘病患 S13018、OV8022、T6042 及 O8026 (分別為圖 13B 至 13E)，腫瘤樣本在急速冷凍之前在 2 至 8° 下培育 60 分鐘。每位病患的腫瘤樣本切片成 3mm 直徑片段且使用 4 至 6 個片段培養。圖表中的每個長條代表外推至完整規模之 TVC (乘以 10)。在圖 13A 中，經冷凍、早期 REP 前培養相較於新鮮者產生約 1% TVC，圖 13B 相較於新鮮者產生約 25% TVC，圖 13C 相較於新鮮者產生約 200%，圖 13D 相較於新鮮者產生約 96% 及圖 13E 相較於新鮮者產生約 3%。資料表示在第 7 天之來自經冷凍之腫瘤樣本之 TVC 與在第 11 天之來自新鮮腫瘤樣本之 TVC 係可比較的。

【 0061 】 [圖 14]：圖 14A 至 14E 描繪在早期 REP 期間收集的來自和圖 13 相同的 5 位病患之腫瘤樣本之 TVC。細胞如圖 13 所述在第 11 天 (新鮮) 及第 7 天 (冷凍) 收集。在圖 14A 中，經冷凍、早期 REP 培養相較於新鮮者產生約 86% TVC，圖 14B 相較於新鮮者產生約 98% TVC，圖 14C 相較於新鮮者產生約 124%，圖 14D 相較於新鮮者產生約 286% 及圖 14E 相較於新鮮者產生約 167%。資料表示在早期 REP 期間

第7天之來自經冷凍之腫瘤樣本之整體產率(以TVC測量)與在第11天之來自新鮮腫瘤樣本之TVC係可相比的。

【0062】[圖15]：圖15描繪來自4位病患之新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的CD8/CD4比例。新鮮或經冷凍之REP TIL樣本係以流動式細胞測量術抗體(CD3-BUV395、CD62LBV421、CD57-PB、CD11c-BV711、CD28-BB515、CD19-BUV563、CCR7-PE、CD123-BV605、CD27PE-CF594、CD14-BV-650、TCRg/d-APC、CD45-PerCP-Cy5.5、CD45RA-A700、CD56-BUV737、CD8-BV786、CD4-PE-Cy7及CD16-APC-Vio770)染色。TIL一致性係基於TCR a/b+或g/d+、單核球(CD14+)、NK(CD56+、CD16+、CD56+/CD16+及B細胞(CD19+)判定且純度係基於CD3+CD45+細胞判定。病患M1125及T6042顯示高度CD8表現，但整體來說新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之間的CD8/CD4比例係可相比的。

【0063】[圖16]：圖16A至16H描繪在和圖15相同的4位病患中之CD3+CD45+表現及其他標誌表現。圖16A及16B描繪病患M1125的資料；圖16C及16D為病患S13018；圖16E及16F為病患OV8022；及圖16G及16H為病患T6042。資料顯示新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之間的TIL純度係可相比的。

【0064】[圖17]：圖17A至17C繪示來自新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之表現CD4或CD8之細胞的CD28、CD27及CD57之表現。圖17A係病患M1125；圖17B係病患

S13018；及圖 17C 係病患 T6042。資料顯示新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之間的分化狀態係可相比的。

【 0065 】 [圖 18]：圖 18A 至 18C 繪示在表現 CD4 或 CD8 之細胞中新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的記憶狀態。圖 18A 係病患 M1125；圖 18B 係病患 S13018；及圖 18C 係病患 T6042。資料顯示新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之間的記憶狀態係可相比的。TN：初始 (CD45RA+CCR7+)、TCM：中央記憶 (CD45RA-CCR7+)、TEM：效應記憶 (CD45RA-CCR7-)、TEMRA/TEFF：RA+ 效應記憶 / 效應細胞 (CD45RA+CCR7)、中央記憶 / 活化細胞 (CD45RA+CD62L+)。所表示之長條圖係以 CD4+ 或 CD8+ 進行閘控時，CD45+/- 或 CCR7+/- 或 CD62L+/- 的陽性百分比。

【 0066 】 [圖 19]：圖 19A 至 19C 繪示在 3 位病患表現 CD4 (上圖) 或 CD8 (下圖) 之細胞中新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的活化 / 耗竭標誌：M1125 (圖 19A)；S13018 (圖 19B)；及 T6042 (圖 19C)。REP TIL 之活化及耗竭係藉由多色流動式細胞測量術判定。使用抗體 (CD3-BUV395、PD-1-BV421、2B4/CD244-PB、CD8-BB515、CD25-BUV563、BTLA-PE、KLRG1-PE-Dazzle 594、TIM-3-BV650、CD194/CCR4-APC、CD4-VioGreen、TIGIT-PerCP-eFluor 710、CD183-BV711、CD69-APC-R700、CD95-BUV737、CD127-PE-Cy7、CD103-BV786、LAG-3-APC-eFluor 780) 染色腫瘤組織且使用流動式細胞測量術測量表現。整體而言，新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之間的 TIL 活化 / 耗竭狀態係

可比較的。

【0067】[圖20]：圖20A至20C繪示3位病患之新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的IFN γ 功能：M1125(圖20A)；S13018(圖20B)；及T6042(圖20C)。將 1×10^5 個REP TIL接種在抗CD3板中24小時。收集培養上清液且使用IFN γ Qantikine ELISA套組測量IFN γ 細胞介素。此處表示之長條圖係三重複(triplicate)測量之平均值+SD。使用學生「t」檢定計算統計顯著性。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。整體而言，資料顯示在經冷凍之腫瘤樣本中IFN γ 功能係較高。

【0068】[圖21]：圖21A至21C繪示3位病患之新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的顆粒溶解酶B(GzmB)功能：M1125(圖21A)；S13018(圖21B)；及T6042(圖21C)。將 1×10^5 個REP TIL接種在抗CD3板中24小時。收集培養上清液且使用Duo set ELISA套組測顆粒溶解酶B。此處表示之長條圖係三重複(triplicate)測量之平均值+SD。使用學生「t」檢定計算統計顯著性。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。整體而言，資料顯示在經冷凍之腫瘤樣本中顆粒溶解酶B(GzmB)功能係可相比(comparable)/較高的。

【0069】[圖22]：圖22A至22C繪示3位病患之新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的CD107A表現：M1125(圖22A)；S13018(圖22B)；及T6042(圖22C)。2 $\times 10^5$ 個REP TIL在有或無PMA/IO之刺激下刺激2小時，接著染色CD107A-APC700，且藉由流動式細胞測量術分析。長條圖代表以CD8或CD4進行閘控之CD107A陽性細胞。整體而言，資料

顯示新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之間的CD107A表現係可比較的。

【0070】 [圖 23]：圖 23A至 23C繪示 3位病患之新鮮及經冷凍之腫瘤樣本的相對於 1301細胞之端粒長度：M1125(圖 23A)；S13018(圖 23B)；及 T6042(圖 23C)。使用 Dako/Agilent Pathology Solutions(端粒 PNA套組/FITC用於流動式細胞測量術)套組執行 Flow-FISH且遵照製造商說明測量端粒重複的平均長度。在各測定中使用 1301 T細胞白血病細胞系(SigmaAldrich, St. Louis, MO)作為內部參考標準。計數個別 TIL且以 1:1細胞比例與 1301細胞混合。將 2×10^6 個 TIL與 2×10^6 個 1301細胞混合，使用經 FITC共軛之端粒 PNA探針 (FITC-00-CCCTAA-CCC-TAA-CCC-TAA)執行原位雜交且使用流動式細胞測量術(BD canto II)分析。測試樣本之端粒螢光按照下式係表現為 1301細胞幾何平均螢光(f1)之百分比：相對端粒長度= $[(\text{平均 FITC f1測試細胞含有探針} - \text{平均 FITC f1測試細胞不含探針}) \times 1301\text{細胞之 DNA指數} \times 100] / [(\text{平均 FITC f1 1301細胞含有探針} - \text{平均 FITC f1 1301細胞不含探針}) \times \text{測試細胞之 DNA指數}]$ 。資料表示經冷凍之腫瘤樣本比起新鮮腫瘤樣本的端粒長度係可比較的或較佳。

【0071】 [圖 24]：圖 24係說明來自新鮮及經冷凍之腫瘤片段之 TIL擴增過程之某些實施例的流程圖：新鮮方法(「GEN2」)、早期 REP方法 1(「ER-1」)及早期 REP方法 2(「ER-2」)。

【0072】[圖 25]：圖 25 說明結構 I-A 及 I-B 為包含三個線性連接的衍生自例如 4-1BBL 或結合 4-1BB 之抗體的 TNFRSF 結合結構域，該 TNFRSF 結合結構域摺疊以形成三價蛋白質，該三價蛋白質接著與第二三價蛋白質經由 IgG1-Fc (包括 CH3 及 CH2 結構域) 連接，且該 IgG1-Fc 接著用於經由雙硫鍵 (小長橢圓形) 將二個三價蛋白質連接在一起，藉以穩定結構且提供能夠將六個受體的細胞內傳訊結構域與傳訊蛋白質集合在一起以形成傳訊複合物的促效劑。

【實施方式】

序列表簡單說明

【0073】SEQ ID NO:1 係莫羅單抗 (muromonab) 之重鏈的胺基酸序列。

【0074】SEQ ID NO:2 係莫羅單抗之輕鏈的胺基酸序列。

【0075】SEQ ID NO:3 係重組人 IL-2 蛋白質之胺基酸序列。

【0076】SEQ ID NO:4 係阿地介白素 (aldesleukin) 之胺基酸序列。

【0077】SEQ ID NO:5 係重組人 IL-4 蛋白質之胺基酸序列。

【0078】SEQ ID NO:6 係重組人 IL-7 蛋白質之胺基酸序列。

【0079】 SEQ ID NO:7係重組人IL-15蛋白質之胺基酸序列。

【0080】 SEQ ID NO:8係重組人IL-21蛋白質之胺基酸序列。

【0081】 SEQ ID NO:9係人4-1BB之胺基酸序列。

【0082】 SEQ ID NO:10係鼠類4-1BB之胺基酸序列。

【0083】 SEQ ID NO:11係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(utumilumab)(PF-05082566)之重鏈。

【0084】 SEQ ID NO:12係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈。

【0085】 SEQ ID NO:13係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈可變區(V_H)。

【0086】 SEQ ID NO:14係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈可變區(V_L)。

【0087】 SEQ ID NO:15係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR1。

【0088】 SEQ ID NO:16係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR2。

【0089】 SEQ ID NO:17係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之重鏈CDR3。

【0090】 SEQ ID NO:18係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR1。

【0091】 SEQ ID NO:19係4-1BB促效劑單株抗體烏圖木單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR2。

【0092】 SEQ ID NO:20係4-1BB促效劑單株抗體烏圖本單抗(PF-05082566)之輕鏈CDR3。

【0093】 SEQ ID NO:21係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(urelumab)(BMS-663513)之重鏈。

【0094】 SEQ ID NO:22係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈。

【0095】 SEQ ID NO:23係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈可變區(V_H)。

【0096】 SEQ ID NO:24係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈可變區(V_L)。

【0097】 SEQ ID NO:25係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR1。

【0098】 SEQ ID NO:26係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR2。

【0099】 SEQ ID NO:27係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之重鏈CDR3。

【0100】 SEQ ID NO:28係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR1。

【0101】 SEQ ID NO:29係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR2。

【0102】 SEQ ID NO:30係4-1BB促效劑單株抗體烏瑞魯單抗(BMS-663513)之輕鏈CDR3。

【0103】 SEQ ID NO:31係TNFRSF促效劑融合蛋白質之Fc結構域。

【0104】 SEQ ID NO:32係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0105】 SEQ ID NO:33係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0106】 SEQ ID NO:34係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0107】 SEQ ID NO:35係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0108】 SEQ ID NO:36係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0109】 SEQ ID NO:37係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0110】 SEQ ID NO:38係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0111】 SEQ ID NO:39係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0112】 SEQ ID NO:40係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0113】 SEQ ID NO:41係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0114】 SEQ ID NO:42係TNFRSF促效劑融合蛋白質之Fc結構域。

【0115】 SEQ ID NO:43係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0116】 SEQ ID NO:44係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0117】 SEQ ID NO:45係TNFRSF促效劑融合蛋白質之連接子。

【0118】 SEQ ID NO:46係4-1BB配體(4-1BBL)胺基酸序列。

【0119】 SEQ ID NO:47係4-1BBL多肽之可溶部分。

【0120】 SEQ ID NO:48係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本1之重鏈可變區(V_H)。

【0121】 SEQ ID NO:49係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本1之輕鏈可變區(V_L)。

【0122】 SEQ ID NO:50係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本2之重鏈可變區(V_H)。

【0123】 SEQ ID NO:51係4-1BB促效劑抗體4B4-1-1版本2之輕鏈可變區(V_L)。

【0124】 SEQ ID NO:52係4-1BB促效劑抗體H39E3-2之重鏈可變區(V_H)。

【0125】 SEQ ID NO:53係4-1BB促效劑抗體H39E3-2之輕鏈可變區(V_L)。

【0126】 SEQ ID NO:54係人OX40之胺基酸序列。

【0127】 SEQ ID NO:55係鼠類OX40之胺基酸序列。

【0128】 SEQ ID NO:56係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(tavolixizumab)(MEDI-0562)之重鏈。

【0129】 SEQ ID NO:57係OX40促效劑單株抗體塔伏

利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈。

【0130】SEQ ID NO:58係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈可變區(V_H)。

【0131】SEQ ID NO:59係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈可變區(V_L)。

【0132】SEQ ID NO:60係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR1。

【0133】SEQ ID NO:61係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR2。

【0134】SEQ ID NO:62係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之重鏈CDR3。

【0135】SEQ ID NO:63係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR1。

【0136】SEQ ID NO:64係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR2。

【0137】SEQ ID NO:65係OX40促效劑單株抗體塔伏利西單抗(MEDI-0562)之輕鏈CDR3。

【0138】SEQ ID NO:66係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈。

【0139】SEQ ID NO:67係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈。

【0140】SEQ ID NO:68係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈可變區(V_H)。

【0141】SEQ ID NO:69係OX40促效劑單株抗體11D4

之輕鏈可變區(V_L)。

【0142】 SEQ ID NO:70係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR1。

【0143】 SEQ ID NO:71係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR2。

【0144】 SEQ ID NO:72係OX40促效劑單株抗體11D4之重鏈CDR3。

【0145】 SEQ ID NO:73係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR1。

【0146】 SEQ ID NO:74係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR2。

【0147】 SEQ ID NO:75係OX40促效劑單株抗體11D4之輕鏈CDR3。

【0148】 SEQ ID NO:76係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈。

【0149】 SEQ ID NO:77係OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈。

【0150】 SEQ ID NO:78係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈可變區(V_H)。

【0151】 SEQ ID NO:79係OX40促效劑單株抗體18D8之輕鏈可變區(V_L)。

【0152】 SEQ ID NO:80係OX40促效劑單株抗體18D8之重鏈CDR1。

【0153】 SEQ ID NO:81係OX40促效劑單株抗體18D8

之重鏈 CDR2。

【 0154 】 SEQ ID NO:82 係 OX40 促效劑單株抗體 18D8 之重鏈 CDR3。

【 0155 】 SEQ ID NO:83 係 OX40 促效劑單株抗體 18D8 之輕鏈 CDR1。

【 0156 】 SEQ ID NO:84 係 OX40 促效劑單株抗體 18D8 之輕鏈 CDR2。

【 0157 】 SEQ ID NO:85 係 OX40 促效劑單株抗體 18D8 之輕鏈 CDR3。

【 0158 】 SEQ ID NO:86 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之重鏈可變區 (V_H)。

【 0159 】 SEQ ID NO:87 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0160 】 SEQ ID NO:88 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之重鏈 CDR1。

【 0161 】 SEQ ID NO:89 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之重鏈 CDR2。

【 0162 】 SEQ ID NO:90 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之重鏈 CDR3。

【 0163 】 SEQ ID NO:91 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之輕鏈 CDR1。

【 0164 】 SEQ ID NO:92 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu119-122 之輕鏈 CDR2。

【 0165 】 SEQ ID NO:93 係 OX40 促效劑單株抗體

Hu119-122之輕鏈CDR3。

【 0166 】 SEQ ID NO:94 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之重鏈可變區(V_H)。

【 0167 】 SEQ ID NO:95 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之輕鏈可變區(V_L)。

【 0168 】 SEQ ID NO:96 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之重鏈CDR1。

【 0169 】 SEQ ID NO:97 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之重鏈CDR2。

【 0170 】 SEQ ID NO:98 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之重鏈CDR3。

【 0171 】 SEQ ID NO:99 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之輕鏈CDR1。

【 0172 】 SEQ ID NO:100 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之輕鏈CDR2。

【 0173 】 SEQ ID NO:101 係 OX40 促效劑單株抗體 Hu106-222之輕鏈CDR3。

【 0174 】 SEQ ID NO:102 係 OX40配體(OX40L)胺基酸序列。

【 0175 】 SEQ ID NO:103 係 OX40L多肽之可溶部分。

【 0176 】 SEQ ID NO:104 係 OX40L多肽之替代性可溶部分。

【 0177 】 SEQ ID NO:105 係 OX40 促效劑單株抗體 008 之重鏈可變區(V_H)。

【 0178 】 SEQ ID NO:106係 OX40促效劑單株抗體 008 之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0179 】 SEQ ID NO:107係 OX40促效劑單株抗體 011 之重鏈可變區 (V_H)。

【 0180 】 SEQ ID NO:108係 OX40促效劑單株抗體 011 之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0181 】 SEQ ID NO:109係 OX40促效劑單株抗體 021 之重鏈可變區 (V_H)。

【 0182 】 SEQ ID NO:110係 OX40促效劑單株抗體 021 之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0183 】 SEQ ID NO:111係 OX40促效劑單株抗體 023 之重鏈可變區 (V_H)。

【 0184 】 SEQ ID NO:112係 OX40促效劑單株抗體 023 之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0185 】 SEQ ID NO:113係 OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區 (V_H)。

【 0186 】 SEQ ID NO:114係 OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0187 】 SEQ ID NO:115係 OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區 (V_H)。

【 0188 】 SEQ ID NO:116係 OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區 (V_L)。

【 0189 】 SEQ ID NO:117係人化 OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區 (V_H)。

【0190】 SEQ ID NO:118係人化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0191】 SEQ ID NO:119係人化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0192】 SEQ ID NO:120係人化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0193】 SEQ ID NO:121係人化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0194】 SEQ ID NO:122係人化OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0195】 SEQ ID NO:123係人化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0196】 SEQ ID NO:124係人化OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0197】 SEQ ID NO:125係OX40促效劑單株抗體之重鏈可變區(V_H)。

【0198】 SEQ ID NO:126係OX40促效劑單株抗體之輕鏈可變區(V_L)。

【0199】 SEQ ID NO:127係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之重鏈胺基酸序列。

【0200】 SEQ ID NO:128係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0201】 SEQ ID NO:129係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0202】 SEQ ID NO:130係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0203】 SEQ ID NO:131係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0204】 SEQ ID NO:132係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0205】 SEQ ID NO:133係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0206】 SEQ ID NO:134係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0207】 SEQ ID NO:135係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0208】 SEQ ID NO:136係PD-1抑制劑尼沃魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0209】 SEQ ID NO:137係PD-1抑制劑派姆單抗之重鏈胺基酸序列。

【0210】 SEQ ID NO:138係PD-1抑制劑派姆單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0211】 SEQ ID NO:139係PD-1抑制劑派姆單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0212】 SEQ ID NO:140係PD-1抑制劑派姆單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0213】 SEQ ID NO:141係PD-1抑制劑派姆單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0214】 SEQ ID NO:142係PD-1抑制劑派姆單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0215】 SEQ ID NO:143係PD-1抑制劑派姆單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【0216】 SEQ ID NO:144係PD-1抑制劑派姆單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【0217】 SEQ ID NO:145係PD-1抑制劑派姆單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【0218】 SEQ ID NO:146係PD-1抑制劑派姆單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【0219】 SEQ ID NO:147係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈胺基酸序列。

【0220】 SEQ ID NO:148係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈胺基酸序列。

【0221】 SEQ ID NO:149係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【0222】 SEQ ID NO:150係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【0223】 SEQ ID NO:151係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【0224】 SEQ ID NO:152係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【0225】 SEQ ID NO:153係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【 0226 】 SEQ ID NO:154係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【 0227 】 SEQ ID NO:155係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【 0228 】 SEQ ID NO:156係PD-L1抑制劑德瓦魯單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【 0229 】 SEQ ID NO:157係PD-L1抑制劑艾維路單抗之重鏈胺基酸序列。

【 0230 】 SEQ ID NO:158係PD-L1抑制劑艾維路單抗之輕鏈胺基酸序列。

【 0231 】 SEQ ID NO:159係PD-L1抑制劑艾維路單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【 0232 】 SEQ ID NO:160係PD-L1抑制劑艾維路單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【 0233 】 SEQ ID NO:161係PD-L1抑制劑艾維路單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【 0234 】 SEQ ID NO:162係PD-L1抑制劑艾維路單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【 0235 】 SEQ ID NO:163係PD-L1抑制劑艾維路單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【 0236 】 SEQ ID NO:164係PD-L1抑制劑艾維路單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【 0237 】 SEQ ID NO:165係PD-L1抑制劑艾維路單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【 0238 】 SEQ ID NO:166係PD-L1抑制劑艾維路單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【 0239 】 SEQ ID NO:167係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之重鏈胺基酸序列。

【 0240 】 SEQ ID NO:168係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之輕鏈胺基酸序列。

【 0241 】 SEQ ID NO:169係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之重鏈可變區(V_H)胺基酸序列。

【 0242 】 SEQ ID NO:170係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之輕鏈可變區(V_L)胺基酸序列。

【 0243 】 SEQ ID NO:171係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之重鏈CDR1胺基酸序列。

【 0244 】 SEQ ID NO:172係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之重鏈CDR2胺基酸序列。

【 0245 】 SEQ ID NO:173係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之重鏈CDR3胺基酸序列。

【 0246 】 SEQ ID NO:174係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之輕鏈CDR1胺基酸序列。

【 0247 】 SEQ ID NO:175係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之輕鏈CDR2胺基酸序列。

【 0248 】 SEQ ID NO:176係PD-L1抑制劑阿特珠單抗之輕鏈CDR3胺基酸序列。

【 0249 】 除非另行定義，此處所使用之所有技術及科學用語具有本發明所屬領域之技藝人士所通常瞭解之相同

意義。所有在此處提及之專利及公開案係以引用方式被整體併入本文中。

定義

【0250】用語「經冷凍」是指組織、細胞性組成物或其他組成物因為遇冷而變硬或僵直。如本文中所使用之用語涵蓋冷凍保存之概念，冷凍保存係一種在非常低之溫度下儲存細胞、組織等之過程，其中該經儲存之細胞、組織等仍維持存活性。

【0251】用語「冷凍儲存(cryostorage)」是指將已經冷凍的組成物保持在非常低之溫度下，其中該經儲存之細胞、組織等仍維持存活性。

【0252】用語「急速冷凍(flash freezing)」、「迅速冷凍(snap freezing)」、「快速冷凍(flash frozen)」及「經迅速冷凍(snap frozen)」是指極度快速地例如但不限於在少於約二分鐘內造成變成冷凍。

【0253】用語「LOVO細胞處理系統」及「LOVO」係指由Fresenius Kabi USA, LLC製造的細胞處理系統。這二個用語亦指由任何供應商製造的任何可將包含細胞的溶液泵送通過無菌及/或密閉系統環境中的膜或過濾器諸如旋轉膜或旋轉過濾器的儀器或裝置，允許連續流動及細胞處理以在無需團塊化下移除上清液或細胞培養基。在一些實施例中，該細胞收集器及/或細胞處理系統可在密閉無菌系統中執行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其

他細胞處理步驟。

【0254】用語「黴菌素 (fungin)」係指由 InvitroGen, San Diego, CA, USA 販售的抗真菌試劑 Fungin™ (目錄編號 ant-fn-1 及 ant-fn-2)。黴菌素係匹馬菌素 (pimaricin) (CAS 7681-93-8) 的可溶性調配物。如本文中所使用，「黴菌素」涵蓋匹馬菌素或那他黴素之任何商用調配物。

【0255】用語「fungizone」係 E. R. Squibb and Sons, LLC 的商標，且係指抗黴菌劑兩性黴素 B (CAS 1397-89-3)。兩性黴素 B 可自商業途徑獲得，例如 σ -Aldrich, St. Louis, MO, USA (目錄編號 A2942，為 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於去離子水中之溶液)。如本文中所使用，「fungizone」涵蓋兩性黴素 B 之任何商用調配物。

【0256】用語「生理緩衝之等張鹽水溶液」是指所屬技術領域中具有通常知識者已知之許多該等鹽溶液中之任一者，其中將該溶液製成生理 pH 及等張鹽濃度。在所屬技術領域中，這些通常被稱為平衡鹽溶液。在不設限下，該等生理緩衝之等張鹽水溶液可包含 Hank 氏平衡鹽溶液 (「HBSS」)、Tris 緩衝鹽水 (「TBS」)、磷酸鹽緩衝鹽水 (「PBS」) 或 Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝鹽水 (「DPBS」或「dPBS」)。

【0257】用語「活體內 (in vivo)」係指發生在對象身體以內的事件。

【0258】用語「活體外 (in vitro)」係指發生在對象身體以外的事件。活體外測定涵蓋基於細胞的測定，其採用

活細胞或死細胞，且亦可涵蓋不採用完整細胞的不含細胞測定。

【0259】用語「離體(ex vivo)」係指涉及在從對象身體移除之細胞、組織及/或器官上所進行處理或執行程序的事件。適當地，該細胞、組織及/或器官可利用手術或治療的方法回到個體體內。

【0260】用語「快速擴增(rapid expansion)」是指抗原特異性TIL於數量上在一週期間增加至少約3倍(或4、5、6、7、8、或9倍)，更佳的是在一週期間增加至少約10倍(或20、30、40、50、60、70、80、或90倍)，或最佳的是在一週期間增加至少約100倍。一些快速擴增規程概述於下。

【0261】在本文中的「腫瘤浸潤性淋巴細胞(tumor infiltrating lymphocytes)」或「TIL」是指原本獲得時是白血球但其離開個體的血流且遷移至腫瘤中的一個細胞族群。TIL包括但不限於CD8⁺細胞毒性T細胞(淋巴細胞)、Th1及Th17 CD4⁺T細胞、天然殺手細胞、樹突細胞及M1巨噬細胞。TIL包括初代及繼代TIL。「初代TIL」是該些如本文概述之獲自病患組織樣本的細胞(有時稱為「新鮮收集(freshly harvested)」)，而「繼代TIL」是任何經本文所述之擴增或增生的TIL細胞族群，包括但不限於主體TIL(bulk TIL)及擴增TIL(「REP TIL」或「REP後TIL」)。TIL細胞族群可包括基因修飾的TIL。

【0262】在本文中的「細胞族群(population of

cells)」(包括TIL)係指一些具有共同特質的細胞。一般來說，族群於數量上通常介於 1×10^6 至 1×10^{10} ，不同TIL族群包含不同數量。例如，初代TIL在IL-2存在下的初始生長導致大約 1×10^8 個細胞的主體TIL族群。通常進行REP擴增以提供 1.5×10^9 至 1.5×10^{10} 個用於輸注的細胞族群。

【0263】在本文中的「經冷凍保存之TIL」係指在介於約 -150°C 至 -60°C 的溫度範圍內處理及儲存的不論是初代、主體、或擴增(REP TIL)的TIL。冷凍保存的常規方法亦描述於本文他處，包括實例中。為了清晰且避免疑義，可將「經冷凍保存之TIL」與可用來作為初代TIL來源的冷凍組織樣本區別。

【0264】在本文中的「解凍的經冷凍保存之TIL(thawed cryopreserved TILs)」係指先前經冷凍保存且接著經處理以回到室溫或更高溫度下的TIL族群，包括但不限於細胞培養溫度或其中TIL可投予至病患之溫度。

【0265】TIL通常可經生物化學(使用細胞表面標誌)定義，或可藉由彼等浸潤腫瘤及致效治療的能力之功能性定義。TIL通常可藉由表現一或多個下列生物標記來分類：CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1及CD25。此外且替代地，TIL可藉由彼等重新導入病患體內後浸潤實質性腫瘤的能力來進行功能性定義。

【0266】用語「冷凍保存培養基(cryopreservation media或cryopreservation medium)」係指任何可用於冷凍

保存細胞的培養基。該等培養基可包括包含5% v/v DMSO至10% v/v DMSO之培養基；該等培養基亦可包括包含7% v/v DMSO至10% v/v DMSO之培養基。例示性培養基包括CryoStor CS10、Hyperthermasol以及彼等之組合。用語「CS10」係指獲自Stemcell Technologies或Biolife Solutions的冷凍保存培養基。CS10培養基可以其商品名稱「CryoStor® CS10」稱呼。CS10培養基是不含血清、不含動物組分的包含DMSO之培養基。

【0267】用語「中央記憶T細胞(central memory T cell)」係指T細胞子集，其在人中為CD45R0+且組成性表現CCR7(CCR7^{hi})及CD62L(CD62^{hi})。中央記憶T細胞的表面表型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞的轉錄因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2及BMI1。中央記憶T細胞在TCR引發後主要分泌IL-2及CD40L作為效應分子。中央記憶T細胞是主要的血中CD4細胞，且在人的淋巴結及扁桃腺中等比例濃化。

【0268】用語「效應記憶T細胞」係指人或哺乳動物T細胞子集，其就像中央記憶T細胞是CD45R0+，但已經失去組成性表現CCR7的能力(CCR7^{lo})且表現CD62L的能力異質或低(CD62L^{lo})。中央記憶T細胞的表面表型亦包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)及IL-15R。中央記憶T細胞的轉錄因子包括BLIMP1。效應記憶T細胞在抗原刺激後快速分泌高量的發炎性細胞介素，包括干擾素 γ 、IL-4及IL-5。效應記憶T細胞是主要的血中CD8細胞，且在人的肺臟、肝

臟及腸道中等比例濃化。CD8⁺效應記憶T細胞攜帶大量的穿孔素。

【0269】用語「密閉系統」係指與外界環境隔離的系統。任何適用於細胞培養方法的密閉系統皆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。一旦將腫瘤片段添加至密閉系統後，該系統即與外界環境隔離，直到準備將TIL投予至病患為止。

【0270】本文中所使用之用語「碎斷(fragmenting)」、「片段(fragment)」及「碎斷的(fragmented)」描述將腫瘤破壞的過程，包括機械碎斷方法諸如破碎、切開、分割及分碎腫瘤組織以及任何其他用於破壞腫瘤組織之物理結構之方法。

【0271】用語「周邊血液單核細胞」及「PBMC」係指具有圓形細胞核的周邊血液細胞，包括淋巴細胞(T細胞、B細胞、NK細胞)及單核球。較佳地，周邊血液單核細胞係經照射的異體周邊血液單核細胞。PBMC是一種抗原呈現細胞。

【0272】用語「抗CD3抗體」係指以成熟T細胞之T細胞抗原受體中的CD3受體為目標的抗體或其變體，例如單株抗體，且包括人、人化、嵌合或鼠抗體。抗CD3抗體包括OKT-3，亦稱為莫羅單抗。抗CD3抗體亦包括UHCT1株，亦稱為T3及CD3 ϵ 。其他抗CD3抗體包括例如，奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizumab)及維西珠單抗(visilizumab)。

【0273】用語「OKT-3」(在本文中亦稱為「OKT3」)係指以成熟T細胞之T細胞抗原受體中的CD3受體為目標的單株抗體或其生物類似物或變體，包括人、人化、嵌合或鼠抗體，且包括市售形式諸如OKT-3(30 ng/mL, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA)及莫羅單抗或其變體、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的胺基酸序列在表1中給出(SEQ ID NO:1及SEQ ID NO:2)。能夠產生OKT-3的融合瘤寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)，且所指派之ATCC編號為CRL 8001。能夠產生OKT-3的融合瘤亦寄存於歐洲認證細胞培養中心(ECACC)，且所指派之目錄編號為86022706。

表 1. 莫羅單抗之胺基酸序列。

| 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 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFP AVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKLSLSLSPGK 450 |
| SEQ ID NO:2 莫羅單抗輕鏈 | QIVLTQSPAI MSASPGKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFFPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213 |

表 2. 介白素之胺基酸序列。

| 識別號 | 序列(單字母胺基酸符號) |
|--|---|
| SEQ ID NO:3 重組人 IL-2 (rhIL-2) | MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMIINGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134 |
| SEQ ID NO:4 阿地介白素 | PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132 |
| SEQ ID NO:5 重組人 IL-4 (rhIL-4) | MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKI 120 MREKYSKCSS 130 |
| SEQ ID NO:6 重組人 IL-7 (rhIL-7) | MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDMSKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKLNLDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH 153 |
| SEQ ID NO:7 重組人 IL-15 (rhIL-15) | MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115 |
| SEQ ID NO:8 重組人 IL-21 (rhIL-21) | MQDRHMIRMRL QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132 |

【0274】用語「IL-2」(在本文中亦稱為「IL2」)係指稱為介白素-2的T細胞生長因子，且包括所有形式的IL-2，包括其人及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及變體。IL-2係描述於例如 Nelson, *J. Immunol.* **2004**, 172, 3983-88及 Malek, *Annu.Rev. Immunol.* **2008**, 26, 453-79，彼等揭露以引用方式併入本文中。適用於本發明之重組人IL-2的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:3)。例如，用語IL-2涵蓋人重組形式的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 CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA(CELLGRO GMP)或 ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-209-b)供應的重組IL-2形式及來自其他供應商的其他市售相等品。阿地介白素(去丙胺醯基-1、經絲胺酸-125取代的人IL-2)係非糖基

化人重組形式的IL-2，分子量為大約15 kDa。適用於本發明之阿地介白素的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:4)。用語IL-2亦涵蓋如本文中描述之聚乙二醇化形式的IL-2，包括聚乙二醇化IL2前藥NKTR-214(可購自Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA)。適用於本發明之NKTR-214及聚乙二醇化IL-2係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WO 2012/065086 A1，彼等揭露以引用方式併入本文中。適用於本發明之替代形式的接合IL-2係描述於美國專利第4,766,106、5,206,344、5,089,261及4902,502號，彼等揭露以引用方式併入本文中。適用於本發明之IL-2調配物係描述於美國專利第6,706,289號，其揭露以引用方式併入本文中。

【0275】用語「IL-4」(在本文中亦稱為「IL4」)係指稱為介白素4的細胞介素，其係藉由Th2 T細胞及藉由嗜酸性球、嗜鹼性球及肥胖細胞產生。IL-4調節初始(naïve)輔助T細胞(Th0細胞)分化成Th2 T細胞。Steinke及Borish, *Respir. Res.* **2001**, 2, 66-70。在IL-4的活化下，Th2 T細胞後續以正向回饋迴圈產生額外IL-4。IL-4亦刺激B細胞增生及第II型MHC表現，且誘導B細胞類型轉換至表現IgE及IgG1。適用於本發明之重組人IL-4可購自多個供應商，包括ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-211)及ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人IL-15重組蛋白質，產品編號Gibco

CTP0043)。適用於本發明之重組人IL-4的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:5)。

【0276】用語「IL-7」(在本文中亦稱為「IL7」)係指稱為介白素7的糖基化組織衍生性細胞介素，其可獲自基質細胞及上皮細胞以及樹突細胞。Fry及Mackall, *Blood* 2002, 99, 3892-904。IL-7可刺激T細胞的發育。IL-7與IL-7受體(由IL-7受體 α 及常見 γ 鏈受體組成的異二聚體)結合，其為對於T細胞在胸腺內的發育及在周邊內的存活而言重要的一系列信號。適用於本發明之重組人類IL-7可購自多個供應商，包括 ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-254)及 ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人類IL-15重組蛋白質，產品編號Gibco PHC0071)。適用於本發明之重組人IL-7的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:6)。

【0277】用語「IL-15」(在本文中亦稱為「IL15」)係指稱為介白素-15的T細胞生長因子，且包括所有形式的IL-2，包括其人及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及變體。IL-15係描述於例如 Fehniger 及 Caligiuri, *Blood* 2001, 97, 14-32，其揭露以引用方式併入本文中。IL-15與IL-2共用 β 及 γ 傳訊受體次單位。重組人IL-15係含有114個胺基酸(及一個N端甲硫胺酸)的單一、非糖基化多肽鏈，分子量為12.8 kDa。重組人IL-15可購自多個供應商，包括 ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-230-b)及 ThermoFisher

Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人IL-15重組蛋白質，產品編號34-8159-82)。適用於本發明之重組人IL-15的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:7)。

【0278】用語「IL-21」(在本文中亦稱為「IL21」)係指稱為介白素-21的多效性細胞介素蛋白質，且包括所有形式的IL-21，包括其人及哺乳動物形式、保守性胺基酸取代、糖化形式、生物類似物及變體。IL-21係描述於例如 Spolski 及 Leonard, *Nat. Rev. Drug.Disc.*, 13:379-95 (2014)，其揭露以引用方式併入本文中。IL-21主要由天然殺手T細胞及活化的人CD4⁺T細胞產生。重組人IL-21係含有132個胺基酸的單一、非糖基化多肽鏈，分子量為15.4 kDa。重組人IL-21可購自多個供應商，包括 ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA(產品編號CYT-408-b) 及 ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA(人IL-21重組蛋白質，產品編號14-8219-80)。適用於本發明之重組人IL-21的胺基酸序列在表2中給出(SEQ ID NO:8)。

【0279】用語「有效量」或「治療有效量」係指足以致效意圖應用包括但不限於疾病治療之如本文中描述之化合物或化合物組合的量。治療有效量可依意圖應用(活體外、活體內及離體)或所欲治療之個體及疾病病況(例如個體的體重、年齡及性別)、疾病病況的嚴重性、投予方式等而異，其可由所屬技術領域中具有通常知識者輕易地判定。該用語亦適用於將誘導目標細胞中之特定反應(例如

減少血小板黏著性及/或細胞遷移)的劑量。明確劑量將視所選之特定化合物、所遵循之給藥方案、化合物是否與其他化合物組合投予、投予時間點、其欲投予之組織及攜帶化合物之物理遞送系統而異。

【0280】本文所使用之用語「治療效應」涵蓋治療性優點及/或預防性優點。預防性效應包括延緩或清除疾病或病況的出現、延緩或清除疾病或病況症狀的開始、減緩、停止或反轉疾病或病況的進展或彼等之任何組合。

【0281】「醫藥上可接受之載劑」或「醫藥上可接受之賦形劑」意圖包括任何及所有溶劑、分散培養基、包覆劑、抗細菌劑、抗真菌劑、等滲劑、吸收延緩劑及惰性成分。活性醫藥成分所使用的該等醫藥上可接受之載劑或醫藥上可接受之賦形劑係所屬技術領域中廣知的。除非任何習知醫藥上可接受之載劑或醫藥上可接受之賦形劑與活性醫藥成分不相容，彼於本發明之治療組成物中之用途係經考慮。額外活性醫藥成分(諸如其他藥物)亦可併入所述之組成物及方法中。

【0282】當本文中使用的範圍來描述例如物理或化學性質諸如分子量或化學式時，意圖包括範圍的所有組合及次組合及其中的特定實施例。使用用語「約」來指稱數字或數字範圍時是指該所指稱之數字或數字範圍係在實驗變異性內(或在統計實驗誤差內)之近似值，且因此該數字或數字範圍可有所變化。變異一般係所述數量或數字範圍的0%至15%，較佳地0%至10%，更佳的是0%至5%。用語

「包含 (comprising)」(及相關用語諸如「包含 (comprise 或 comprises)」或「具有 (having)」或「包括 (including)」) 包括該些諸如例如「由所述特徵組成」或「基本上由所述特徵組成」之任何物質組成物、方法或過程的實施例。

【0283】本發明之化合物亦包括抗體。用語「抗體 (antibody 及其複數形式 antibodies)」係指完整免疫球蛋白及其任何抗原結合片段(「抗原結合部分」)或單一鏈。「抗體」進一步指包含藉由雙硫鍵互相連接之至少二個重(H)鏈及二個輕(L)鏈的糖蛋白或其抗原結合部分。各重鏈包含重鏈可變區(在本文中縮寫為 V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域(CH1、CH2及CH3)。各輕鏈包含輕鏈可變區(在本文中縮寫為 V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個結構域(C_L)。抗體的 V_H 及 V_L 區可進一步細分為超變異的區域，該等區域稱為互補決定區(CDR)或超變異區(HVR)，且可與較為保守的區域(稱為架構區(FR))穿插。各 V_H 及 V_L 係由三個 CDR及四個 FR構成，以下列順序自胺基端至羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原表位(epitope或 epitopes)交互作用之結合結構域。抗體之恆定區可媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子之結合，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及典型補體系統之第一組分(C1q)。

【0284】如本文中所使用之抗體之用語「抗原結合部位」或「抗原結合片段」(或簡稱「抗體部分」)係指保留

與抗原特異性結合能力之一或多個抗體片段(例如 IL-33、ST2、CD20、PD-1、PD-L1或PD-L2)。研究顯示，抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段進行。由抗體之用語「抗原結合部分」所涵蓋之結合片段實例包括：(i)Fab片段，由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 $CH1$ 結構域所組成之單價片段；(ii)F(ab')₂片段，包含二個由鉸鏈區之雙硫鍵連接之Fab片段的雙價片段；(iii)由 V_H 及 $CH1$ 結構域所組成之Fd片段；(iv)由抗體之單臂的 V_L 及 V_H 結構域組成之Fv片段；(v)結構域抗體(dAb)片段(Ward *et al.*, *Nature*, **1989**, 341, 544-546)，其可由 V_H 或 V_L 結構域組成；及(vi)經單離之互補決定區(CDR)。另外，雖然Fv片段之二個結構域 V_L 及 V_H 係由分開之基因編碼，可使用重組方法藉由合成的連接子將它們聯結，以使它們能夠被製備為單一蛋白質鏈，其中 V_L 及 V_H 區域配對以形成稱為單鏈Fv(scFv)之單價分子；見例如 Bird *et al.*, *Science* **1988**, 242, 423-426；及Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5879-5883)。該等scFv抗體亦為抗體之用語「抗原結合部分」或「抗原結合片段」所意圖涵蓋。這些抗體片段係使用所屬技術領域中具有通常知識者已知之習知技術獲得，且片段之效用係以和完整抗體相同之方式篩選。

【0285】如本文中所使用之用語「人抗體」意圖包括其中可變區之架構區及CDR區皆衍生自人種系免疫球蛋白序列之抗體。另外，若該抗體包含恆定區，該恆定區亦源自人種系免疫球蛋白序列。本發明之人抗體可包括非由人

種系免疫球蛋白序列所編碼之胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或定點突變形成或藉由活體內體突變導入之突變)。如本文中所使用之用語「人抗體」無意包括其中衍生自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之種系的CDR序列被移植至人類架構序列之抗體。

【0286】用語「人單株抗體」係指展示單一結合特異性之抗體，其具有其中架構區及CDR區皆衍生自人種系免疫球蛋白序列之可變區。在一實施例中，人單株抗體可藉由包括B細胞之融合瘤產生，該B細胞獲自具有包含人重鏈轉殖基因及輕鏈轉殖基因之基因體的基因轉殖非人動物(例如基因轉殖小鼠)並融合至永生細胞。

【0287】本文中所使用之用語「重組人抗體」包括所有藉由重組手段製備、表現、產生或單離之人抗體，諸如(a)自人免疫球蛋白基因之基因轉殖或染色體轉殖動物(例如小鼠)或自其製備的融合瘤所單離之抗體(進一步描述於下)；(b)自經轉形以表現人抗體之宿主細胞例如轉染瘤(transfectoma)單離之抗體；(c)自重組的組合式人抗體庫單離之抗體；及(d)藉由任何涉及將人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的其他手段製備、表現、產生、或單離之抗體。該重組人抗體具有其中架構區及CDR區係衍生自人種系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，該重組人抗體可經活體外突變形成處理(或者，當使用人Ig序列之基因轉殖動物時，該重組人抗體經活體內體突變形成處理)，因此重組抗體之V_H及V_L區之胺基酸序

列雖然是衍生自及關於人種系 V_H 及 V_L 序列之序列，但不是天然存在於活體內人抗體種系貯庫內的序列。

【0288】如本文中所使用，「同型(isotype)」係指由重鏈恆定區基因所編碼之抗體類型(例如，IgM或IgG1)。在哺乳動物中，有五種抗體同型：IgA、IgD、IgG、IgM及IgE。在人中，IgG同型有四種亞型：IgG1、IgG2、IgG3及IgG4，且IgA同型有二種亞型：IgA1及IgA2。

【0289】用語「辨識抗原之抗體」及「對抗原具特異性之抗體」在本文中可與用語「與抗原特異性結合之抗體」互換使用。

【0290】用語「人抗體衍生物」係指人抗體之任何經修飾的形式，例如抗體及另一活性醫藥成分或抗體之接合物。用語「接合物(conjugate)」、「抗體-藥物接合物」、「ADC」或「免疫接合物(immunconjugate)」係指與一治療部份(諸如細菌性毒素、細胞毒性藥物或含放射性核種之毒素)接合之抗體或其片段。毒性部份可使用在所屬技術領域中可用之方法與本發明之抗體接合。

【0291】用語「人化抗體」及「人化」意指其中衍生自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之種系的CDR序列被移植至人架構序列之抗體。額外的架構區修飾可在人架構序列內製備。人化形式之非人(例如鼠)抗體係含有最少衍生自非人免疫球蛋白之序列的嵌合抗體。普遍來說，人化抗體係其中來自接受者之超變異區的殘基被來自非人物種(供體抗體)之15超變異區的殘基所取代之人免疫球蛋白(接受

者抗體)，該非人物種諸如小鼠、大鼠或兔或具有所欲特異性、親和性及能力之非人靈長動物。在一些情況中，人免疫球蛋白之Fv架構區(FR)殘基被對應之非人殘基取代。另外，人化抗體可包含不見於接受者抗體或供體抗體之殘基。這些修飾係用來進一步改善抗體之表現。整體而言，人化抗體將包含實質上所有至少一個且通常兩個可變結構域，其中所有或實質上所有超變異圈環對應非人免疫球蛋白之超變異圈環且所有或實質上所有FR區係人免疫球蛋白序列之FR區。人化抗體亦將可選地包含至少部分之免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常為人免疫球蛋白之恆定區。進一步細節見 Jones *et al.*, *Nature* **1986**, 321, 522-525；Riechmann *et al.*, *Nature* **1988**, 332, 323-329；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* **1992**, 2, 593-596。

【0292】用語「嵌合抗體」意指其中可變區序列源自一物種且恆定區序列源自另一物種之抗體，諸如其中可變區序列源自小鼠抗體且恆定區序列源自人抗體之抗體。

【0293】「雙體抗體(diabody)」係具有二個抗原結合部位之小抗體片段。片段包含與相同多肽鏈中之輕鏈可變結構域(V_L)連接之重鏈可變結構域(V_H)(V_H-V_L或V_L-V_H)。藉由使用過短以致不允許相同鏈上之二個結構域之間配對的连接子，迫使結構域與另一鏈之互補結構域配對且產生二個抗原結合部位。雙體抗體係於例如歐洲專利第EP 404,097號、國際專利公開號WO 93/11161；及 Bolliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6444-6448中更充

分地描述。

【0294】用語「糖基化(glycosylation)」係指抗體之經修飾的衍生物。無糖基化抗體缺乏糖基化。糖基化可經改變以例如增加抗體對抗原之親和性。該等碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來完成。例如，可製備一或多個胺基酸取代以導致清除一或多個可變區架構糖基化位點以藉此清除該位點的糖基化。無糖基化可增加抗體對抗原之親和性，如美國專利第5,714,350及6,350,861號所述。此外或替代地，可製備具有改變糖基化類型之抗體，諸如具有減少量之岩藻糖基殘基之低岩藻糖基化抗體或具有增加平分型GlcNac結構之抗體。該等改變之糖基化模式已顯示可增加抗體的能力。該等碳水化合物修飾可藉由例如在改變糖基化機轉之宿主細胞中表現抗體來完成。改變糖基化機轉之細胞已在所屬技術領域中描述且可用來作為表現本發明之重組抗體之宿主細胞以藉此產生具有改變糖基化之抗體。例如，細胞系Ms704、Ms705及Ms709缺乏岩藻糖基轉移酶基因FUT8($\alpha(1,6)$ 岩藻糖基轉移酶)，使得在Ms704、Ms705及Ms709細胞系中表現之抗體在它們的碳水化合物上缺乏岩藻糖。Ms704、Ms705及Ms709 FUT8^{-/-}細胞系藉由使用二個置換載體在CHO/DG44細胞中靶向破壞FUT8基因來產生(見例如美國專利公開號2004/0110704或Yamane-Ohnuki, *et al. Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 87, 614-622)。作為另一實例，歐洲專利第EP 1,176,195號描述一種具有功能性破

壞 FUT8 基因之細胞系，該基因編碼岩藻糖基轉移酶，以使在該細胞系中表現之抗體藉由減少或清除 α 1,6 鍵結相關酶來展現低岩藻糖基化，且亦描述對於添加岩藻糖至與抗體之 Fc 區結合 N-乙醯葡萄糖胺具有低酶活性或不具有酶活性之細胞系，例如大鼠骨髓瘤細胞系 YB2/0 (ATCC CRL 1662)。國際專利公開號 WO 03/035835 描述一種變體 CHO 細胞系 Lec 13 細胞，其具有減少之連接岩藻糖至 Asn(297) 連接碳水化合物之能力，亦導致在該宿主細胞表現之抗體的低岩藻糖基化 (亦見 Shields, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26733-26740)。國際專利公開號 WO 99/54342 描述經工程改造以表現糖蛋白修飾性糖基轉移酶 (例如 β (1,4)-N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶 III (GnTIII)) 之細胞系，以使在經工程改造之細胞系表現之抗體展現增加之平分型 GlcNac 結構，導致增加之抗體 ADCC 活性 (亦見 Umana, *et al.*, *Nat. Biotech.* **1999**, 17, 176-180)。替代地，抗體之岩藻糖殘基可使用岩藻糖苷酶切割。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, *et al.*, *Biochem.* **1975**, 14, 5516-5523 所述。

【0295】「聚乙二醇化 (Pegylation)」係指一種經修飾之抗體 (或其片段)，其通常在使一或多個聚乙二醇 (PEG) 基團變成與抗體或抗體片段連接之條件下與 PEG 諸如 PEG 之反應性酯或醛衍生物反應。聚乙二醇化可例如增加抗體之生物 (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性聚合物) 之醯基化

反應或烷基化反應進行。如本文中所使用之用語「聚乙二醇」意圖涵蓋已被用於衍生化其他蛋白質之任何形式之 PEG，諸如單(C₁-C₁₀)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。欲聚乙二醇化之抗體可為無糖基化抗體。聚乙二醇化之方法係所屬技術領域中已知及可應用至本發明之抗體，如例如歐洲專利號 EP 0154316 及 EP 0401384 所述。

【0296】用語「生物類似物(biosimilar)」是指一種與美國許可之參考生物產品高度類似之生物產品，儘管其臨床非活性組分存在微小差異，但該生物產品與該參考產品之間就產品安全性、純度及效力方面並無臨床上有意義的差異。另外，類似的生物性或「生物類似」藥品係與另一已獲得歐洲藥品管理局使用授權之生物藥品類似的生物藥品。用語「生物類似物」亦由其他國家及地區管理機關同義地使用。生物產品或生物藥品係由生物來源(諸如細菌或酵母菌)製備或衍生自生物來源(諸如細菌或酵母菌)之藥品。它們可由相對小分子(諸如人胰島素或紅血球生成素)或複合物分子(諸如單株抗體)組成。例如，如果參考抗 CD20 單株抗體係利妥昔單抗(rituximab)，則由藥物主管機關參照利妥昔單抗所核准之抗 CD20 生物類似物單株抗體係與利妥昔單抗「生物類似」或係利妥昔單抗之「生物類似物」。在歐洲，類似的生物性或「生物類似」藥品係與另一已獲得歐洲藥品管理局(EMA)使用授權之生物藥品類似的生物藥品。在歐洲類似生物應用之相關法律基礎係經

修訂的 Regulation(EC)No 726/2004 第 6 條及 Directive 2001/83/EC 第 10(4) 條，因此在歐洲生物類似物可依照 Regulation(EC)No 726/2004 第 6 條及 Directive 2001/83/EC 第 10(4) 條獲得授權、核准授權或為申請授權之主題。已經獲得授權之原始生物藥品可稱為歐洲的「參考藥品」。考慮為生物類似物產品的一些規定概述於類似生物藥品 CHMP 準則 (CHMP Guideline on Similar Biological Medicinal Products)。此外，產品特定準則(包括與單株抗體生物類似物有關的準則)係由 EMA 基於個別產品提供且公布於網站上。如本文所述之生物類似物可在品質特徵、生物活性、作用機制、安全性特性及/或療效方面類似於參考藥品。此外，生物類似物可用於或意圖用於治療與參考藥品相同之病況。因此，如本文所述之生物類似物可被視為具有與參考藥品類似或高度類似之品質特徵。替代地或此外，如本文所述之生物類似物可被視為具有與參考藥品類似或高度類似之生物活性。替代地或此外，如本文所述之生物類似物可被視為具有與參考藥品類似或高度類似之安全性特性。替代地或此外，如本文所述之生物類似物可被視為具有與參考藥品類似或高度類似之療效。如本文所述，歐洲的生物類似物係與已獲得 EMA 授權之參考藥品比較。然而，在一些情況中，生物類似物可與在某些研究中獲得歐洲經濟區以外授權之生物藥品(非 EEA 授權「比較物(comparator)」)比較。該等研究包括例如某些臨床及活體內非臨床研究。如本文中所使用，用語「生物類似

物」亦關於已與或可與非 EEA 授權比較品比較之生物藥品。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。蛋白質生物類似物可具有在胺基酸結構中稍微修飾(包括例如胺基酸的刪除、添加及/或取代)而不顯著影響多肽功能之胺基酸序列。生物類似物可包含與其參考藥品之胺基酸序列具有 97% 或高於 97%(例如 97%、98%、99% 或 100%) 序列一致性之胺基酸序列。生物類似物可包含一或多個與參考藥品之轉譯後修飾不同的轉譯後修飾，例如但不限於糖基化、氧化、脫醯胺及/或截短，惟該差異不導致藥品安全性及/或療效的改變。生物類似物可具有與參考藥品相同或不同的糖基化模式。特別是(但非排他性)，如果該差異處理或意圖處理與參考藥品相關之安全性顧慮，則生物類似物可具有不同的糖基化模式。此外，生物類似物可在例如其強度、醫藥形式、調配物、賦形劑及/或外觀上偏離參考藥品，只要藥品的安全性及療效不受影響。生物類似物相較於參考藥品可包含例如藥物動力學(PK)及/或藥效動力學(PD)特性上的差異，但仍被視為足夠類似於參考藥品而可獲得授權或考慮適合授權。在某些情況中，生物類似物展現與參考藥品不同的結合特徵，其中該不同的結合特徵不被主管機關(諸如 EMA)視為授權為類似生物產品的屏障。用語「生物類似物」亦由其他國家及地區管理機關同義地使用。

【0297】 用語「血液惡性病」係指哺乳動物造血及淋巴組織(包括但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統的

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 ALL、CLL、SLL、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、何杰金氏淋巴瘤及非何杰金氏淋巴瘤。用語「B細胞血液惡性病」係指影響B細胞的血液惡性病。

【0298】用語「實性腫瘤」係指組織的異常團塊，通常不含囊腫或液體區域。實性腫瘤可為良性或惡性。用語「實性腫瘤癌」係指惡性、腫瘤性或癌性實性腫瘤。實性腫瘤癌包括但不限於肉瘤、癌(carcinoma)及淋巴瘤，諸如肺癌、乳癌、前列腺癌、結腸癌、直腸癌及膀胱癌。實性腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0299】用語「液體腫瘤」係指具流體本質之細胞的異常團塊。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。獲自液體腫瘤的TIL在本文中亦稱為骨髓浸潤性淋巴細胞(MIL)。

【0300】如本文中所使用之用語「微環境」可指整個實質或血液腫瘤微環境或可指在微環境中的個別細胞子集。如本文中所使用之腫瘤微環境係指如 Swartz, *et al.*, *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473所描述之一種「促進腫瘤性轉換、支持腫瘤生長及入侵、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成長空間的細胞、可溶

因子、傳訊分子、細胞外基質及機械刺激」的複雜混合物。雖然腫瘤表現出應被T細胞辨識的抗原，但免疫系統因為微環境的免疫抑制作用而很少進行腫瘤廓清。

【0301】在一實施例中，本發明包括用TIL族群治療癌症之方法，其中病患在根據本發明輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一些實施例中，可提供TIL族群，其中病患在根據本發明輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一實施例中，非骨髓清除式化療係環磷醯胺 60 mg/kg/d 共 2 天 (TIL 輸注之前第 27 及 26 天) 及氟達拉濱 25 mg/m²/d 共 5 天 (TIL 輸注之前第 27 至 23 天)。在一實施例中，在根據本發明之非骨髓清除式化療及 TIL 輸注 (第 0 天) 之後，病患每 8 小時接受 720,000 IU/kg 靜脈內 IL-2 的靜脈內輸注至生理耐受。

【0302】實驗發現指示在過繼性轉移腫瘤特異性 T 淋巴細胞之前，藉由清除調節 T 細胞且競爭免疫系統的元件 (「細胞介素匯 (cytokine sinks)」) 進行淋巴細胞耗盡扮演增強治療療效的關鍵角色。因此，本發明之一些實施例在導入本發明之 rTIL 之前，對病患進行淋巴細胞耗盡步驟 (有時亦稱為「免疫抑制性調理」)。

【0303】在提及二或多個核酸或多肽時，用語「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)」係指當二或更多個序列或子序列經比較及排比 (需要時導入間格) 以達最高對應性且不把任何保守性胺基

酸取代當作序列一致性之部分時，該二或多個序列或子序列係相同或具有相同之特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基。一致性百分比可利用序列比較軟體或演算法測量，或藉由目視檢查測量。各種演算法及軟體係所屬技術領域中已知，可用於獲得胺基酸或核苷酸序列之排比。可判定序列一致性百分比之合適程式包括例如可得自美國政府的國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)BLAST網站的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是用來比較核酸序列，而BLASTP是用來比較胺基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(Genentech, South San Francisco, California)或MegAlign(可得自DNASTAR)是其他可供大眾使用的排比序列軟體程式。所屬技術領域中具有通常知識者可判定用於特定排比軟體以求最大排比的適當參數。在某些實施例中，使用排比軟體的內建參數。

【0304】本發明之某些實施例包含抗體之變體，例如抗IL-33或抗ST2抗體及/或抗CD20抗體及/或抗PD-1抗體、抗PD-L1及/或抗PD-L2抗體。如本文中所使用，用語「變體」涵蓋但不限於包含與參考抗體的胺基酸序列不同之胺基酸序列的抗體，該不同處在於在該參考抗體的胺基酸序列之內或相鄰的某些位置有一或多個取代、刪除及/或添加。相較於參考抗體的胺基酸序列，變體的胺基酸序列中可包含一或多個保守性取代。保守性取代可涉及例如類似地帶電或不帶電胺基酸的取代。變體保留與參考抗體之抗

原特異性結合的能力。

【0305】為避免疑義，在本文中的意圖是搭配本發明之特定態樣、實施例或實例所描述之特定特徵(例如整數、特徵、值、用途、疾病、式、化合物或基團)應理解為適用於本文所述之任何其他態樣、實施例或實例，除非與之不相容。因此該特徵當適當時可搭配在本文中定義之任何定義、請求項或實施例使用。在本說明書(包括任何隨附之請求項、摘要及圖式)中揭示之所有特徵及/或如此揭示之任何方法或過程的所有步驟可組合為任何組合，但至少一些特徵及/或步驟係互相排斥之組合例外。本發明不限於任何揭示實施例之任何細節。本發明延伸至在本說明書(包括任何隨附之請求項、摘要及圖式)中揭示之任一新穎特徵或新穎之特徵組合或延伸至如此揭示之任何方法或過程的任一新穎步驟或任何新穎之步驟組合。

腫瘤冷凍保存方法

【0306】本發明提供一種冷凍保存用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之腫瘤組織之方法，該方法包含：

- (i)碎斷該腫瘤組織；
- (ii)於冷凍保存培養基中培育該等片段；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【0307】在一實施例中，腫瘤組織係經碎斷成具有約1.5 mm至約6 mm之直徑的大約球形片段。在一較佳實施

例中，大約球形片段具有約6 mm之直徑。在一實施例中，大約球形片段具有約3 mm之直徑。

【0308】在一些實施例中，腫瘤組織係經碎斷成具有至少1.5 mm之最短邊緣長度及約6 mm之最長邊緣長度的大致上矩形片段。在一實施例中，腫瘤組織係經碎斷成具有介於約1.5 mm與6 mm之間之邊緣長度的大致上立方片段。在一實施例中，大致上立方片段具有約6 mm之邊緣長度。在一實施例中，大致上立方片段具有約3 mm之邊緣長度。

【0309】在一些實施例中，組織樣本係經修剪以分離非腫瘤組織與腫瘤組織。

【0310】在一些實施例中，腫瘤組織係來自經分割之腫瘤。在一實施例中，腫瘤組織係來自腫瘤活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤組織係來自切開式活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤組織係來自切除式活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤組織可來自一或多個粗針活體組織切片。

【0311】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成具有約1.5 mm × 1.5 mm、約2 mm × 2 mm、約2.5 mm × 2.5 mm、約3 mm × 3 mm、約3.5 mm × 3.5 mm、約4 mm × 4 mm、約4.5 mm × 4.5 mm、約5 mm × 5 mm、約5.5 mm × 約5.5 mm或約6 mm × 約6 mm之橫截面的片段。

【0312】在一實施例中，腫瘤組織係小於12小時齡。在一實施例中，腫瘤組織係小於8小時齡。在一實施例

中，腫瘤組織係小於3、小於2或小於1小時齡。

【0313】在一些實施例中，冷凍保存培養基包含2至12% v/v(體積:體積)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含5% v/v DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含10% v/v DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含介於5與10% v/v之間的DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含選自由1% v/v、2% v/v、3% v/v、4% v/v、5% v/v、6% v/v、7% v/v、8% v/v、9% v/v、10% v/v、11% v/v、12% v/v、13% v/v、14% v/v及15% v/v所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的冷凍保存培養基係水介質。

【0314】在一些實施例中，冷凍保存培養基包含2至12% w/w(重量:重量)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含5% w/w DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含10% w/w DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含介於5與10% w/w之間的DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含選自由1% w/w、2% w/w、3% w/w、4% w/w、5% w/w、6% w/w、7% w/w、8% w/w、9% w/w、10% w/w、11% w/w、12% w/w、13% w/w、14% w/w及15% w/w所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的冷凍保存培養基係水介質。

【0315】在一實施例中，冷凍保存培養基包含至少一種抗微生物劑。在一實施例中，至少一種抗微生物劑係濃

度至少 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之建它黴素。在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係青黴素；在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係鏈黴素。在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係抗真菌劑。在一些實施例中，抗真菌劑係兩性黴素 B；在一些實施例中，抗真菌劑係 Fungin™。在一些實施例中，使用抗微生物劑之組合。在一些實施例中，至少一種抗真菌劑係與一或多種抗細菌劑組合使用。

【0316】在一些實施例中，腫瘤片段係於冷凍保存培養基中經培育約 20 分鐘至約 70 分鐘。在一些實施例中，腫瘤片段係於冷凍保存培養基中經培育約 30 分鐘至約 60 分鐘。在一些實施例中，培育係至少 10 分鐘；至少 20 分鐘；至少 25 分鐘；至少 30 分鐘；至少 35 分鐘；至少 40 分鐘；至少 45 分鐘；至少 50 分鐘；至少 55 分鐘；至少 60 分鐘；或至少 70 分鐘。在一些實施例中，培育係約 10 分鐘；約 20 分鐘；約 25 分鐘；約 30 分鐘；約 35 分鐘；約 40 分鐘；約 45 分鐘；約 50 分鐘；約 55 分鐘；約 60 分鐘；或約 70 分鐘。在一些實施例中，培育係少於 10 分鐘；少於 20 分鐘；少於 25 分鐘；少於 30 分鐘；少於 35 分鐘；少於 40 分鐘；少於 45 分鐘；少於 50 分鐘；少於 55 分鐘；少於 60 分鐘；或少於 70 分鐘。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段密度成正比。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段表面對體積比成正比。

【0317】在一些實施例中，腫瘤片段在約 2°C 至約 8°C 之溫度下經培育在冷凍保存培養基中。

【0318】在一些實施例中，腫瘤組織係於生理緩衝之等張鹽水溶液中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之三次連續洗滌，其中在每次連續洗滌之後置換生理緩衝之等張鹽水溶液。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含tris緩衝鹽水(TBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含Dulbecco氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)。在一些實施例中，在一次連續洗滌中之生理緩衝之等張鹽水溶液可與一或多次其他連續洗滌所使用之生理緩衝之等張鹽水溶液不同。

【0319】在一實施例中，冷凍發生在約 -125°C 至約 -196°C 之溫度範圍下。在一實施例中，冷凍發生在約 -140°C 至約 -185°C 之溫度範圍下。在一實施例中，冷凍發生在約 -140°C 至約 -175°C 之溫度範圍下。在一實施例中，冷凍發生在約 -145°C 之溫度下。在一些實施例中，冷凍發生在汽相液態氮中。

【0320】所屬技術領域中廣為周知之問題是在冷凍過程期間在不損害細胞或組織下冷凍保存該細胞或組織。在不受理論之束縛下，在冷凍期間的一個損害來源係細胞內冰成核導致細胞破裂。Muldrew及McGann在“The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury”, *Biophysical Journal*, **66**:532-41(1994)中概述此廣為周知且

廣泛公認之細胞及特別是全組織冷凍保存困難的定量理論。Acker及McGann進一步在稍後一篇文獻“Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice,” *Cryo Letter*, **22**:241-54(2001)中發展細胞內冰形成及細胞損害的基本機制。

【0321】在冷凍期間的損害係經偵測，其中在解凍時，組織實質上已損失彼等之生理結構或包含該組織之細胞實質上已損失彼等之存活性。存活性可藉由導入培養基中的細胞部分相較於生長或顯示正常細胞功能之標誌的該細胞數量來判定。許多方法係所屬技術領域中已知可識別存活細胞部分，例如且不限於染料排除測試，諸如台盼藍排除。見例如，Strober, *Curr. Protoc. Immunol.*, **2001**, Appendix 3B，可見於 <https://dx.doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>。在不設限下，存活性亦可藉由代謝活性測定判定，諸如MTT測定，其中MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物)係由細胞性酶代謝成甲臍。此酶催化性反應將黃色MTT轉換成紫色甲臍。見例如，Berridge *et al.*, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, **11**: 127-152(2005)；Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods* **65**(1-2): 55-63(1983)。

【0322】在不受理論之束縛下，假設緩慢冷卻產生無

害的細胞內冰，見 Acker 及 McGann, “Protective effect of intracellular ice during freezing?” *Cryobiology*, **46**(2): 197-202(2003)。採用達成冷凍但不過度損害細胞或達成冷凍但不顯著減少細胞存活性之習知方案以延緩冷凍速率。Watson *et al.*(美國專利第 5,891,617 號)強調此方案，例如請求項一步驟 (c) 揭示非常緩慢的冷卻速率：「約每分鐘 -0.3°C 或低於每分鐘 -0.3°C 」。類似地，Comhaire *et al.*(美國專利第 9,938,495 號)揭示用於幹細胞之「藉由使用無 DMSO 冷凍保存培養基進行緩慢冷凍獲得在解凍之後的高細胞存活性」。

【0323】基於這些例示性揭示，本揭露之方法及產物令人意外且非預期。進一步地，本揭露(包括其中的實例及資料)顯示對於快速及有效地冷凍保護用於製造用於治療性用途之腫瘤浸潤性淋巴細胞的腫瘤組織、腫瘤片段或腫瘤樣品之問題的技術解決方案。

【0324】在一些實施例中，冷凍保存用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之腫瘤組織之方法進一步包含步驟(iv)在低於至少 -130°C 之溫度下儲存經冷凍之片段。在一些實施例中，經冷凍之片段係儲存於汽相液態氮中。在一些實施例中，該等經冷凍之片段係浸沒於液態氮中儲存。在一些實施例中，經冷凍保存之片段係經儲存以用於稍後製造用於自體治療性用途之 TIL。

【0325】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含下列步

驟：

- (a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含在冷凍之前在約2°C至約8°C之溫度下於儲存培養基中培育該腫瘤組織一段約20分鐘至約70分鐘的期間；
- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)在氣體可通透容器中以包含介白素2(IL-2)及可選地OKT-3抗體之第一細胞培養基處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (d)移走至少複數個該等TIL；及
- (e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0326】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含下列步驟：

- (a)碎斷腫瘤樣本；
- (b)於儲存培養基中培育該等腫瘤片段；
- (c)將該等腫瘤片段以冷凍狀態儲存；
- (d)解凍該等腫瘤片段；
- (e)在氣體可通透容器中以包含介白素2(IL-2)及可選地OKT-3抗體之第一細胞培養基處理該等腫瘤片段以提供TIL；
- (f)移走至少複數個該等TIL；及

(g)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0327】在一些實施例中，儲存培養基包含2至12% v/v(體積:體積或體積對體積)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，儲存培養基包含5% v/v DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含10% v/v DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含介於5與10% v/v之間的DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含選自由1% v/v、2% v/v、3% v/v、4% v/v、5% v/v、6% v/v、7% v/v、8% v/v、9% v/v、10% v/v、11% v/v、12% v/v、13% v/v、14% v/v及15% v/v所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的儲存培養基係水介質。

【0328】在一些實施例中，儲存培養基包含2至12% w/w(重量:重量或重量對重量)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，儲存培養基包含5% w/w DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含10% w/w DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含介於5與10% w/w之間的DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含選自由1% w/w、2% w/w、3% w/w、4% w/w、5% w/w、6% w/w、7% w/w、8% w/w、9% w/w、10% w/w、11% w/w、12% w/w、13% w/w、14% w/w及15% w/w所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的儲存培養基係水介質。

【0329】在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在

約2°C至約8°C之溫度下於儲存培養基中培育介於約20分鐘與約70分鐘之間。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度下於儲存培養基中培育至少30分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度下於儲存培養基中培育介於30分鐘與約60分鐘之間。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約15分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約30分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約45分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約60分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約75分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約60分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度下於儲存培養基中培育60分鐘。

【0330】 在一些實施例中，儲存培養基包含約5% v/v DMSO且腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度下於儲存培養基中培育約60分鐘。在一些實施例中，儲存培養基包含約10% v/v DMSO且腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少30分鐘至約60分鐘。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段密度

成正比。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段表面對體積比成正比。

經冷凍保存之腫瘤片段

【0331】在一些實施例中，本發明提供一種藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之經冷凍保存之腫瘤片段，該程序包含下列步驟：

- (i)碎斷腫瘤樣本；
- (ii)於冷凍保存培養基中培育該等片段；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【0332】在一些實施例中，本發明提供一種藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之經冷凍保存之腫瘤片段，該程序包含下列步驟：

- (i)碎斷腫瘤樣本；
- (ii)於包含10% v/v DMSO之冷凍保存培養基中，在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育該等片段約20分鐘至約70分鐘；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【0333】在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約1.5 mm至6 mm之直徑的大約球形片段。在一實施例中，大約球形片段具有約6 mm之直徑。在一實施例中，大約球形片段具有約3 mm之直徑。在一實施例中，大約球形

片段具有選自由約 20 mm、約 19 mm、約 18 mm、約 17 mm、約 16 mm、約 15 mm、約 14 mm、約 13 mm、約 12 mm、約 11 mm、約 10 mm、約 9 mm、約 8 mm、約 7 mm、約 6 mm、約 5 mm、約 4 mm、約 3 mm、約 2 mm及約 1 mm 所組成之群組的直徑。

【0334】在一些實施例中，腫瘤組織係經碎斷成具有至少 1.5 mm之最短邊緣長度及約 6 mm之最長邊緣的大致上矩形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有長度介於約 1.5 mm與 6 mm之間之邊緣的大致上立方片段。在一實施例中，大致上立方片段具有長度約 6 mm之邊緣。在一實施例中，大致上立方片段具有長度約 3 mm之邊緣。在一實施例中，大致上立方片段具有選自由約 20 mm、約 19 mm、約 18 mm、約 17 mm、約 16 mm、約 15 mm、約 14 mm、約 13 mm、約 12 mm、約 11 mm、約 10 mm、約 9 mm、約 8 mm、約 7 mm、約 6 mm、約 5 mm、約 4 mm、約 3 mm、約 2 mm及約 1 mm所組成之群組的邊緣長度。

【0335】在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 2 mm³至約 200 mm³之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 5 mm³至約 150 mm³之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 25 mm³至約 150 mm³之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 50 mm³至約 150 mm³之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係

經碎斷成具有約 100 mm^3 至約 125 mm^3 之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 50 mm^3 至約 75 mm^3 之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 75 mm^3 至約 100 mm^3 之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 200 mm^3 至約 1000 mm^3 之體積的大約球形片段。在一實施例中，腫瘤樣本係經碎斷成具有約 500 mm^3 至約 800 mm^3 之體積的大約球形片段。在一實施例中，大約球形片段具有選自由約 20 mm 、約 19 mm 、約 18 mm 、約 17 mm 、約 16 mm 、約 15 mm 、約 14 mm 、約 13 mm 、約 12 mm 、約 11 mm 、約 10 mm 、約 9 mm 、約 8 mm 、約 7 mm 、約 6 mm 、約 5 mm 、約 4 mm 、約 3 mm 、約 2 mm 及約 1 mm 所組成之群組的直徑。

【0336】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成片段，其中片段具有約 $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$ 、約 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 、約 $2.5 \text{ mm} \times 2.5 \text{ mm}$ 、約 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 、約 $3.5 \text{ mm} \times 3.5 \text{ mm}$ 、約 $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ 、約 $4.5 \text{ mm} \times 4.5 \text{ mm}$ 、約 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 、約 $5.5 \text{ mm} \times 5.5 \text{ mm}$ 、約 $6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ 、約 $6.5 \text{ mm} \times 6.5 \text{ mm}$ 、約 $7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ 、約 $7.5 \text{ mm} \times 7.5 \text{ mm}$ 、約 $8 \text{ mm} \times 8 \text{ mm}$ 、約 $8.5 \text{ mm} \times 8.5 \text{ mm}$ 、約 $9 \text{ mm} \times 9 \text{ mm}$ 、約 $9.5 \text{ mm} \times 9.5 \text{ mm}$ 、約 $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ 、約 $10.5 \text{ mm} \times 10.5 \text{ mm}$ 、約 $11 \text{ mm} \times 11 \text{ mm}$ 、約 $11.5 \text{ mm} \times 11.5 \text{ mm}$ 、約 $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ 之橫截面。

【0337】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成

片段，其中片段具有約 2 mm^2 至約 3 mm^2 、約 3 mm^2 至約 4 mm^2 、約 4 mm^2 至約 5 mm^2 、約 5 mm^2 至約 6 mm^2 、約 6 mm^2 至約 7 mm^2 、約 7 mm^2 至約 8 mm^2 、約 8 mm^2 至約 9 mm^2 、約 9 mm^2 至約 10 mm^2 、約 10 mm^2 至約 11 mm^2 、約 11 mm^2 至約 12 mm^2 、約 12 mm^2 至約 20 mm^2 、約 20 mm^2 至約 50 mm^2 、約 50 mm^2 至約 100 mm^2 或約 100 mm^2 至約 500 mm^2 的截面積。在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成片段，其中片段具有約 1.5 mm^2 、約 2 mm^2 、約 2.5 mm^2 、約 3 mm^2 、約 3.5 mm^2 、約 4 mm^2 、約 4.5 mm^2 、約 5 mm^2 、約 5.5 mm^2 、約 6 mm^2 、約 6.5 mm^2 、約 7 mm^2 、約 7.5 mm^2 、約 8 mm^2 、約 8.5 mm^2 、約 9 mm^2 、約 9.5 mm^2 、約 10 mm^2 、約 10.5 mm^2 、約 11 mm^2 、約 11.5 mm^2 、約 12 mm^2 、約 20 mm^2 、約 25 mm^2 、約 30 mm^2 、約 40 mm^2 、約 50 mm^2 、約 100 mm^2 、約 200 mm^2 、約 300 mm^2 、約 400 mm^2 、約 500 mm^2 、約 750 mm^2 或約 1000 mm^2 的截面積。

【0338】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成片段，其中片段具有約 2 mm^3 至約 3 mm^3 、約 3 mm^3 至約 4 mm^3 、約 4 mm^3 至約 5 mm^3 、約 5 mm^3 至約 6 mm^3 、約 6 mm^3 至約 7 mm^3 、約 7 mm^3 至約 8 mm^3 、約 8 mm^3 至約 9 mm^3 、約 9 mm^3 至約 10 mm^3 、約 10 mm^3 至約 11 mm^3 、約 11 mm^3 至約 12 mm^3 及約 12 mm^3 至約 20 mm^3 的體積。在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成片段，其中片段具有約 1.5 mm^3 、約 2 mm^3 、約 2.5 mm^3 、約 3 mm^3 、約 3.5 mm^3 、約 4 mm^3 、約 4.5 mm^3 、約 5 mm^3 、約 5.5 mm^3 、約 6 mm^3 、約 6.5

mm³、約7 mm³、約7.5 mm³、約8 mm³、約8.5 mm³、約9 mm³、約9.5 mm³、約10 mm³、約10.5 mm³、約11 mm³、約11.5 mm³、約12 mm³、約20 mm³、約25 mm³、約30 mm³、約40 mm³、約50 mm³、約100 mm³、約200 mm³、約300 mm³、約400 mm³、約500 mm³、約750 mm³或約1000 mm³的體積。

【0339】在一些實施例中，腫瘤樣本係來自經分割之腫瘤。在一實施例中，腫瘤樣本係來自腫瘤活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤樣本係來自切開式活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤樣本係來自切除式活體組織切片。在一些實施例中，腫瘤樣本可來自一或多個粗針活體組織切片。

【0340】在一實施例中，腫瘤樣本在冷凍之前係小於12小時齡。在一實施例中，腫瘤樣本在冷凍之前係小於8小時齡。在一實施例中，腫瘤樣本在冷凍之前係小於3、小於2或小於1小時齡。

【0341】在一些實施例中，冷凍保存培養基包含2至12% v/v(體積:體積或體積對體積)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含5% v/v DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含10% v/v DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含介於5與10% v/v之間的DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含選自由1% v/v、2% v/v、3% v/v、4% v/v、5% v/v、6% v/v、7% v/v、8% v/v、9% v/v、10% v/v、11% v/v、12% v/v、13%

v/v、14% v/v及15% v/v所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的冷凍保存培養基係水介質。

【0342】在一些實施例中，冷凍保存培養基包含2至12% w/w(重量:重量或重量對重量)二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含5% w/w DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含10% w/w DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含介於5與10% w/w之間的DMSO。在一些實施例中，冷凍保存培養基包含選自由1% w/w、2% w/w、3% w/w、4% w/w、5% w/w、6% w/w、7% w/w、8% w/w、9% w/w、10% w/w、11% w/w、12% w/w、13% w/w、14% w/w及15% w/w所組成之群組的DMSO百分比。在一些前述實施例中，剩餘的冷凍保存培養基係水介質。

【0343】在一實施例中，冷凍保存培養基包含至少一種抗微生物劑。在一實施例中，至少一種抗微生物劑係濃度至少20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之建它黴素。在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係濃度至少50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之建它黴素。在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係青黴素；在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係鏈黴素。在一些實施例中，至少一種抗微生物劑係抗真菌劑。在一些實施例中，抗真菌劑係兩性黴素B；在一些實施例中，抗真菌劑係Fungin™。在一些實施例中，使用抗微生物劑之組合。在一些實施例中，至少一種抗真菌劑係與一或多種抗細菌劑組合使用。

【0344】在一些實施例中，腫瘤片段係於冷凍保存培

養基中經培育約30分鐘至約60分鐘。在一些實施例中，培育係至少10分鐘；至少20分鐘；至少25分鐘；至少30分鐘；至少30分鐘；約35分鐘；約40分鐘；約45分鐘；約50分鐘；約55分鐘；或約60分鐘。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段密度成正比。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段表面對體積比成正比。

【0345】在一些實施例中，腫瘤片段在約2°C至約8°C之溫度下經培育在冷凍保存培養基中。

【0346】在一些實施例中，腫瘤樣本係於生理緩衝之等張鹽水溶液中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之三次連續洗滌，其中在每次連續洗滌之後置換生理緩衝之等張鹽水溶液。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含tris緩衝鹽水(TBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含Dulbecco氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)。在一些實施例中，在一次連續洗滌中之生理緩衝之等張鹽水溶液可與一或多次其他連續洗滌所使用之生理緩衝之等張鹽水溶液不同。

【0347】在一實施例中，冷凍發生在約-125°C至約-180°C之溫度範圍下。在一實施例中，冷凍發生在約-140°C至約-175°C之溫度範圍下。在一實施例中，冷凍發生在約-145°C之溫度下。在一些實施例中，冷凍發生在汽相液

態氮中。

【0348】在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係一。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係二。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係三。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係四。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係五。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係六。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係七。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係八。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係九。在一實施例中，根據以上或在本文中任何實施例所使用之腫瘤片段數量係十。

製造來自經冷凍保存之腫瘤片段之 TIL

【0349】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍保存之腫瘤片段之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)成治療性 TIL 族群之方法，該方法包含下列步驟：

- (i)自經冷凍保存之腫瘤片段獲得第一 TIL 族群；
- (ii)執行第一擴增，其藉由在包含 IL-2 及可選地 OKT-3 之細胞培養基中培養第一 TIL 族群，以產生第二 TIL 族群；及

(iii)藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 以執行第二擴增而產生第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群於數量上高於該第二 TIL 族群至少 50 倍或 100 倍，且其中該第二擴增執行至少 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，該治療性 TIL 族群包含相對於該第二 TIL 族群增加的效應 T 細胞及 / 或中央記憶 T 細胞子族群。

【0350】 本發明提供一種用於製備供過繼性 T 細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，該方法包含：

- (a) 在包含介白素 2 (IL-2) 及可選地 OKT-3 抗體之第一細胞培養基中培養經冷凍保存之腫瘤片段以提供 TIL；
- (b) 在包含經照射的餵養細胞、OKT-3 抗體及 IL-2 之第二細胞培養基中擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL；及
- (c) 可選地冷凍保存該等經擴增數量的 TIL。

【0351】 本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，其包含下列步驟：

- (a) 將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含在冷凍之前在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育該腫瘤組織約 30 分鐘；

- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (d)移走至少複數個該等 TIL；及
- (e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0352】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含下列步驟：

- (a)碎斷腫瘤樣本；
- (b)在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育該等腫瘤片段約 30 分鐘；
- (c)將該等腫瘤片段以冷凍狀態儲存；
- (d)解凍該等腫瘤片段；
- (e)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2)處理該等腫瘤片段以提供 TIL；
- (f)移走至少複數個該等 TIL；及
- (g)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0353】在一些實施例中，儲存培養基包含 2% v/v DMSO 至 12% v/v 二甲亞砜(DMSO)。在一些實施例中，儲存培養基包含 5% v/v DMSO。在一些實施例中，儲存培養

基包含 10% v/v DMSO。在一些實施例中，儲存培養基包含介於約 5% v/v DMSO 與 10% v/v DMSO 之間。

【0354】在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度下於儲存培養基中培育至少 30 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育介於 30 分鐘與約 60 分鐘之間。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育約 45 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育約 60 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織在冷凍之前係在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下於儲存培養基中培育約 60 分鐘。

【0355】在一些實施例中，腫瘤組織係於冷凍保存培養基中經培育約 20 分鐘至約 70 分鐘。在一些實施例中，腫瘤組織係於冷凍保存培養基中經培育約 30 分鐘至約 60 分鐘。在一些實施例中，培育係至少 10 分鐘；至少 20 分鐘；至少 25 分鐘；至少 30 分鐘；約 35 分鐘；約 40 分鐘；約 45 分鐘；約 50 分鐘；約 55 分鐘；或約 60 分鐘。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段密度成正比。在一些實施例中，培育時間與腫瘤片段表面對體積比成正比。

【0356】在一些實施例中，具有約 1.5 mm × 1.5 mm 之橫截面的腫瘤片段係經培育於冷凍保存培養基中約 20 分鐘、約 30 分鐘、約 35 分鐘、約 40 分鐘或少於約 60 分鐘。在一些實施例中，具有約 2 mm × 2 mm 之橫截面的腫瘤片段

係經培育於冷凍保存培養基中約20分鐘、約30分鐘、約35分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘或約60分鐘。在一些實施例中，具有約3 mm × 3 mm之橫截面的腫瘤片段係經培育於冷凍保存培養基中至少20分鐘、約30分鐘、約35分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘或約60分鐘。在一些實施例中，具有約4 mm × 4 mm之橫截面的腫瘤片段係經培育於冷凍保存培養基中約30分鐘、約35分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘、約60分鐘或約70分鐘。在一些實施例中，具有約5 mm × 5 mm之橫截面的腫瘤片段係經培育於冷凍保存培養基中約30分鐘、約35分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘、約60分鐘或約70分鐘。在一些實施例中，具有約6 mm × 6 mm之橫截面的腫瘤片段係經培育於冷凍保存培養基中至少20分鐘、約30分鐘、約40分鐘、約45分鐘、約50分鐘、約60分鐘或約70分鐘。

【0357】在一些實施例中，儲存培養基包含約5% v/v DMSO且腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約60分鐘。在一些實施例中，儲存培養基包含約10% v/v DMSO且腫瘤組織在冷凍之前係在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少約30分鐘至約60分鐘。

【0358】在一些實施例中，用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之TIL的方法包含於包含IL-2之培養基中培育經冷凍保存之腫瘤片段，其中TIL數量係經擴增。在一些實施例中，TIL數量擴增100倍。在一些實施例中，TIL數量擴

增 150 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增 200 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增 250 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 300 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 350 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 400 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 450 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 500 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 550 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 600 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 700 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 750 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 800 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 850 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 900 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 1000 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 1200 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 1500 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 1600 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 2000 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 2100 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 2200 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增約 2500 倍。在一些實施例中，TIL 數量擴增大於 2500 倍。

【0359】在一些實施例中，一種用於製造來自經冷凍之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

(a) 將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：

(i) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉

容器中；

(iii)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20分鐘至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(iv)冷凍該容器；及

(v)儲存該容器以使該容器維持冷凍；

(b)解凍該容器；

(c)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；

(d)移走至少複數個該等TIL；及

(e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0360】 在一些實施例中，一種用於製造來自經冷凍之腫瘤組織之TIL之方法，其包含：

(a)自病患獲得腫瘤組織；

(b)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(c)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(d)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20分鐘至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(e)冷凍該容器；

(f)儲存該容器以使該容器維持冷凍；

- (g)解凍該容器；
- (h)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (i)移走至少複數個該等 TIL；及
- (j)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及 IL-2之第二細胞培養基擴增該等 TIL以提供經擴增數量的 TIL。

【0361】在一些實施例中，製造來自經冷凍保存之腫瘤片段之 TIL 之方法進一步包含添加 OKT-3 至第一培養基。

【0362】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成直徑介於 1.5 mm 與 6 mm 之間及厚度介於 1.5 mm 與 6 mm 之間。在仍其他實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成約 6 mm × 6 mm × 6 mm。在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成具有約 1.5 mm × 1.5 mm、約 2 mm × 2 mm、約 2.5 mm × 2.5 mm、約 3 mm × 3 mm、約 3.5 mm × 3.5 mm、約 4 mm × 4 mm、約 4.5 mm × 4.5 mm、約 5 mm × 5 mm、約 5.5 mm × 約 5.5 mm 或約 6 mm × 6 mm 之橫截面的片段。

【0363】在一些實施例中，儲存培養基進一步包含抗細菌劑。在一些實施例中，抗細菌劑係建它黴素 (gentamicin)。在一些實施例中，儲存培養基包含濃度至少 20 µg/mL 之建它黴素。在一些實施例中，儲存培養基包含濃度至少 50 µg/mL 之建它黴素。在一些實施例中，儲存培養基包含抗細菌劑、抗真菌劑及彼等之組合。在一些實

施例中，抗真菌劑係兩性黴素 B 且係以約 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在。在一些實施例中，抗真菌劑係 Fungin™ 且係以約 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在。

【0364】在一些實施例中，腫瘤組織係於生理緩衝之等張鹽水溶液中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之三次連續洗滌，其中在每次連續洗滌之後置換生理緩衝之等張鹽水溶液。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含 Hank 氏平衡鹽溶液 (HBSS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含 tris 緩衝鹽水 (TBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含磷酸鹽緩衝鹽水 (PBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含 Dulbecco 氏磷酸鹽緩衝鹽水 (DPBS)。在一些實施例中，在一次連續洗滌中之生理緩衝之等張鹽水溶液可與一或多次其他連續洗滌所使用之生理緩衝之等張鹽水溶液不同。

【0365】在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入 37°C 水浴中約 5 分鐘。

【0366】在一些實施例中，冷凍步驟包含在約 -125°C 至約 -195°C 下冷凍該容器。在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -150°C；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約 -125°C 至約 -145°C；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約 -135°C。

【0367】在一些實施例中，該方法係以來自人個體之新鮮腫瘤樣本執行。

【0368】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)組織及HPV陽性腫瘤組織。

【0369】在一些實施例中，該方法進一步包含在第一擴增(或第一培養)步驟及第二擴增(或第二培養)步驟之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在約第16天。在一些實施例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(c)至(e)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以約21天完成；在一些實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以約16天完成。

【0370】在一些實施例中，第一細胞培養基包含OKT-3。

【0371】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含：

(a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之

方法包含：

- (i) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv) 使用汽相液態氮冷凍該容器；及
 - (v) 在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (b) 解凍該腫瘤組織；
- (c) 將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (d) 藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；
- (e) 藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞。

- 孢子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；
- (f)收集獲自步驟(f)之該治療性TIL族群，其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；
- (g)將得自步驟(f)之該經收集之TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(f)轉移至步驟(g)無需打開該系統而發生；
- (h)使用冷凍保存程序將來自步驟(g)之包含該經收集之TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (i)投予治療有效劑量的來自步驟(g)之該輸注袋的該第三TIL族群至該個體。

【0372】 在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含投予經擴增之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)，該方法包含：

- (a)自該個體獲得腫瘤組織；
- (b)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (c)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
- (d)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
- (e)使用汽相液態氮冷凍該容器；
- (f)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (g)解凍該腫瘤組織；

- (h)將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (i)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來在密閉系統中執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生；
- (j)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(i)轉變至步驟(j)無需打開該系統而發生；
- (k)收集獲自步驟(j)之該治療性TIL族群，其中自步驟(j)轉變至步驟(k)無需打開該系統而發生；
- (l)將步驟(k)收集之該治療性TIL轉移至輸注袋，其中自步驟(k)轉移至步驟(l)無需打開該系統而發生；
- (m)使用冷凍保存程序將來自步驟(l)之包含該治療性TIL族群之該輸注袋冷凍保存；

(n)解凍來自步驟(m)之該輸注袋中之該治療性TIL族群；及

(o)投予治療有效劑量的來自步驟(n)之該輸注袋的該治療性TIL族群至該個體。

【0373】 在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包括例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠質母細胞瘤、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結直腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、黑色素瘤、難治療性黑色素瘤、轉移性黑色素瘤及非小細胞肺癌。實性腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0374】 本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

(a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含TIL；

(b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含在冷凍之前在 2°C 至 8°C 下於儲存培養基中培育該腫瘤組織30分鐘；

(c)解凍該腫瘤組織；

(d)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；

(e)移走至少複數個該等TIL；及

(f)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴

增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0375】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；
- (b)在 2°C 至 8°C 下於儲存培養基中培育該腫瘤組織 30 分鐘；
- (c)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存；
- (d)解凍該腫瘤組織；
- (e)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (f)移走至少複數個該等 TIL；及
- (g)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3 抗體及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0376】在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；
- (b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：
 - (i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii)將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 30 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存

培養基；

(iv) 冷凍該容器；及

(v) 儲存該容器以使該容器維持冷凍；

(c) 解凍該容器；

(d) 在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素

2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；

(e) 移走至少複數個該等 TIL；及

(f) 在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的

餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該

等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0377】 在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

(a) 自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；

(b) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(c) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(d) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 30

分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(e) 冷凍該容器；

(f) 儲存該容器以使該容器維持冷凍；

(g) 解凍該容器；

(h) 在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素

2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；

(i) 移走至少複數個該等 TIL；及

(j)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0378】在一些實施例中，腫瘤組織係於生理緩衝之等張鹽水溶液中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之三次連續洗滌，其中在每次連續洗滌之後置換生理緩衝之等張鹽水溶液。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含tris緩衝鹽水(TBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。在一些實施例中，生理緩衝之等張鹽水溶液包含Dulbecco氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)。在一些實施例中，在一次連續洗滌中之生理緩衝之等張鹽水溶液可與一或多次其他連續洗滌所使用之生理緩衝之等張鹽水溶液不同。

【0379】在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入37°C水浴中約5分鐘。

【0380】在一些實施例中，冷凍步驟包含在約-125°C至約-195°C下冷凍該容器。在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約-125°C至約-150°C；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係約-125°C至約-145°C；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約-135°C。

【0381】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫

瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)組織及HPV陽性腫瘤組織。

【0382】在一些實施例中，該方法進一步包含在第一擴增(或第一培養)步驟及第二擴增(或第二培養)步驟之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在約第16天。在一些實施例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(h)至(j)(如適用)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(h)至(j)(如適用)以約21天完成；在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(h)至(j)(如適用)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(h)至(j)(如適用)以約16天完成。

【0383】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含：

(a)自該個體獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含
TIL；

(b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織
之方法包含：

(i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

- (ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 20 至約 70 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv) 使用汽相液態氮冷凍該容器；及
 - (v) 在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (c) 解凍該腫瘤組織；
- (d) 將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (e) 藉由在包含 IL-2 之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 3 至 14 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (d) 轉變至步驟 (e) 無需打開該系統而發生；
- (f) 藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 以執行第二擴增而產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，該治療性 TIL 族群包含相對於該第二 TIL 族群增加的效應 T 細胞及 / 或中央記憶 T 細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (e) 轉

- 變至步驟(f)無需打開該系統而發生；
- (g)收集獲自步驟(f)之該治療性TIL族群，其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；
- (h)將得自步驟(g)之該經收集之TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(g)轉移至步驟(h)無需打開該系統而發生；
- (i)使用冷凍保存程序將來自步驟(h)之包含該經收集之TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (j)投予治療有效劑量的來自步驟(i)之該輸注袋的該第三TIL族群至該個體。

【0384】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含：

- (a)自該個體獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含TIL；
- (b)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (c)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
- (d)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
- (e)使用汽相液態氮冷凍該容器；
- (f)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (g)解凍該腫瘤組織；
- (h)將該腫瘤組織添加至密閉系統；

- (i)藉由在包含 IL-2 之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一 TIL 族群來在密閉系統中執行第一擴增以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約 3 至 14 天以獲得該第二 TIL 族群，其中該第二 TIL 族群於數量上高於該第一 TIL 族群至少 50 倍，且其中自步驟 (h) 轉變至步驟 (i) 無需打開該系統而發生；
- (j)藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 以執行第二擴增而產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，該治療性 TIL 族群包含相對於該第二 TIL 族群增加的效應 T 細胞及 / 或中央記憶 T 細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (i) 轉變至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；
- (k)收集獲自步驟 (j) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (j) 轉變至步驟 (k) 無需打開該系統而發生；
- (l)將步驟 (k) 收集之該治療性 TIL 族群轉移至輸注袋，其中自步驟 (k) 轉移至步驟 (l) 無需打開該系統而發生；
- (m)使用冷凍保存程序將來自步驟 (l) 之包含該治療性 TIL 族群之該輸注袋冷凍保存；

(o)解凍來自步驟(m)之該輸注袋中之該治療性TIL族群；及

(p)投予治療有效劑量的來自步驟(o)之該輸注袋的該治療性TIL族群至該個體。

【0385】 在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之TIL之方法，其包含：

(a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：

(i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(iii)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(iv)冷凍該容器；及

(v)儲存該容器以使該容器維持冷凍；

(b)解凍該容器；

(c)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；

(d)移走至少複數個該等TIL；及

(e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0386】 在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍

之腫瘤組織之TIL之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織；
- (b)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (c)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
- (d)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
- (e)冷凍該容器；
- (f)儲存該容器以使該容器維持冷凍；
- (g)解凍該容器；
- (h)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (i)移走至少複數個該等TIL；及
- (j)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0387】在一些實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成直徑介於1.5 mm與6 mm之間及厚度介於約1.5 mm與約6 mm之間。在仍其他實施例中，新鮮腫瘤組織係經修剪成約6 mm × 6 mm × 6 mm。

【0388】在一些實施例中，儲存培養基進一步包含抗細菌劑。在一些實施例中，抗細菌劑係建它黴素(gentamicin)。在一些實施例中，儲存培養基包含濃度至少20 µg/mL之建它黴素。在一些實施例中，儲存培養基包

含濃度至少 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之建它黴素。在一些實施例中，儲存培養基包含抗細菌劑、抗真菌劑及彼等之組合。在一些實施例中，抗真菌劑係兩性黴素 B 且係以約 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在。在一些實施例中，抗真菌劑係黴菌素 (fungin) 且係以約 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至約 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在。

【0389】在一些實施例中，在執行該方法的修剪步驟之前首先將新鮮腫瘤組織於 Hank 氏平衡鹽溶液 (HBSS) 中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之至少三次連續洗滌，其中在每次洗滌之後置換 HBSS。

【0390】在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入 37°C 水浴中約 5 分鐘。

【0391】在一些實施例中，冷凍步驟包含在約 -125°C 至約 -195°C 下冷凍該容器。在一些實施例中，容器在約 -125°C 至約 -150°C 下冷凍；在一些實施例中，容器在約 -125°C 至約 -145°C 下冷凍；在仍進一步實施例中，容器在約 -135°C 下冷凍。

【0392】在一些實施例中，該方法係以來自人個體之新鮮腫瘤樣本執行。

【0393】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞

癌 (HNSCC) 及 HPV 陽性腫瘤組織。

【0394】 在一些實施例中，該方法進一步包含在第一擴增(或第一培養)步驟及第二擴增(或第二培養)步驟之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在第16天。在一些實施例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以21天完成；在一些實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(c)至(e)或步驟(h)至(j)(如適用)以約16天完成。

【0395】 在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含：

(a) 將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：

(i) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(iii) 將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(iv) 使用汽相液態氮冷凍該容器；及

- (v)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)將該等腫瘤片段加入密閉系統；
- (d)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；
- (e)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；
- (f)收集獲自步驟(f)之該治療性TIL族群，其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；
- (g)將得自步驟(f)之該經收集之TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(f)轉移至步驟(g)無需打開該系統而發生；

- (h)使用冷凍保存程序將來自步驟(g)之包含該經收集之TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (i)投予治療有效劑量的來自步驟(g)之該輸注袋的該第三TIL族群至該個體。

【0396】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含：

- (a)自該個體獲得腫瘤組織；
- (b)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (c)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
- (d)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
- (e)使用汽相液態氮冷凍該容器；
- (f)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (g)解凍該腫瘤組織；
- (h)將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (i)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生；

- (j)藉由對該第二 TIL 族群的該細胞培養基補充額外的 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 以執行第二擴增而產生第三 TIL 族群，其中該第二擴增執行約 7 至 14 天以獲得該第三 TIL 族群，其中該第三 TIL 族群係治療性 TIL 族群，該治療性 TIL 族群包含相對於該第二 TIL 族群增加的效應 T 細胞及 / 或中央記憶 T 細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟 (i) 轉變至步驟 (j) 無需打開該系統而發生；
- (k) 收集獲自步驟 (j) 之該治療性 TIL 族群，其中自步驟 (j) 轉變至步驟 (k) 無需打開該系統而發生；
- (l) 將步驟 (k) 收集之該治療性 TIL 族群轉移至輸注袋，其中自步驟 (k) 轉移至步驟 (l) 無需打開該系統而發生；
- (m) 使用冷凍保存程序將來自步驟 (l) 之包含該治療性 TIL 族群之該輸注袋冷凍保存；
- (n) 解凍來自步驟 (m) 之輸注袋中之該治療性 TIL 族群；及
- (o) 投予治療有效劑量的來自步驟 (n) 之該輸注袋的該治療性 TIL 族群至該個體。

【0397】 在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌 (包括例如頭頸鱗狀細胞癌 (HNSCC))、神經膠質母細胞瘤、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結直腸癌、卵巢癌、肉瘤、胰癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌、黑色素瘤、難治

療性黑色素瘤、轉移性黑色素瘤及非小細胞肺癌。實性腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0398】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含TIL；
- (b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含在冷凍之前在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育該腫瘤組織約20至約70分鐘；
- (c)解凍該腫瘤組織；
- (d)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (e)移走至少複數個該等TIL；及
- (f)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0399】本發明提供一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含TIL；
- (b)在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育該腫瘤組織約20至約70分鐘；
- (c)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存；

- (d)解凍該腫瘤組織；
- (e)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (f)移走至少複數個該等 TIL；及
- (g)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【0400】在一些實施例中，一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含 TIL；
- (b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：
 - (i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii)將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 30 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv)冷凍該容器；及
 - (v)儲存該容器以使該容器維持冷凍；
- (c)解凍該容器；
- (d)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (e)移走至少複數個該等 TIL；及

(f)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【0401】在一些實施例中，在執行組織修剪步驟之前首先將新鮮腫瘤組織於Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之至少三次連續洗滌，其中在每次洗滌之後置換HBSS。

【0402】在一些實施例中，解凍步驟包含將容器浸入37°C水浴中約5分鐘。

【0403】在一些實施例中，冷凍步驟包含在介於約-125°C至約-195°C之溫度下冷凍該容器。在一些實施例中，容器的冷凍溫度係介於約-125°C至約-150°C；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係介於約-125°C至約-145°C；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約-135°C。

【0404】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)及HPV陽性腫瘤組織。

【0405】在一些實施例中，該方法進一步包含在第一擴增(或第一培養)步驟及第二擴增(或第二培養)步驟之間的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在第16天。在一些實施

例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(e)至(g)(如適用)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(e)至(g)(如適用)以約21天完成；在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(e)至(g)(如適用)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(d)至(f)或步驟(e)至(g)(如適用)以約16天完成。

【0406】在一些實施例中，本發明提供治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含：

- (a)自該個體獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含
TIL；
- (b)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：
 - (i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20分鐘至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv)使用汽相液態氮冷凍該容器；及
 - (v)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (c)解凍該腫瘤組織；

- (d)將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (e)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；
- (f)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；
- (g)收集獲自步驟(f)之該治療性TIL族群，其中自步驟(f)轉變至步驟(g)無需打開該系統而發生；
- (h)將得自步驟(g)之該經收集之TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(g)轉移至步驟(h)無需打開該系統而發生；
- (i)使用冷凍保存程序將來自步驟(h)之包含該經收集之TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及

(j)投予治療有效劑量的來自步驟(i)之該輸注袋的該第三TIL族群至該個體。

【0407】在一些實施例中，在執行腫瘤組織儲存方法之步驟(i)之前首先將新鮮腫瘤組織於Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。在一些實施例中，洗滌包含每次至少三分鐘之至少三次連續洗滌，其中在每次洗滌之後置換HBSS。

【0408】在一些實施例中，步驟(c)包含將容器浸入37°C水浴中約5分鐘。

【0409】在一些實施例中，腫瘤組織儲存方法之步驟(iv)包含在介於約-125°C至約-195°C之溫度下冷凍該容器。在一些實施例中，容器的冷凍溫度係介於約-125°C至約-150°C；在一些實施例中，容器的冷凍溫度係介於約-125°C至約-145°C；在仍進一步實施例中，容器的冷凍溫度係約-135°C。

【0410】在一些實施例中，腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、子宮內膜腫瘤組織、甲狀腺腫瘤組織、卵巢腫瘤組織、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)及HPV陽性腫瘤組織。

【0411】在一些實施例中，該方法進一步包含在第一擴增(或第一培養)步驟及第二擴增(或第二培養)步驟之間

的分瓶。在一實施例中，分瓶發生在第16天。在一些實施例中，第一培養步驟以約11天完成。在其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約7天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約14天完成。在一些實施例中，步驟(e)至(g)以約22天完成。在仍其他實施例中，步驟(e)至(g)以約21天完成；在一些實施例中，步驟(e)至(g)以約20天完成；且在一些實施例中，步驟(e)至(g)以約16天完成。

【0412】在一些實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約5天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約3天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約5天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約11天完成。在仍其他實施例中，第一擴增(或第一培養)步驟以約3天完成，且第二擴增(或第二培養)步驟以約13天完成。可選地，第二擴增(或第二培養)可在第二擴增(或第二培養)之第五天或第六天或約第五天或第六天分瓶至二個或超過二個培養。

【0413】在上述製造或擴增TIL之方法的一些實施例中，OKT-3係自第0天開始存在於培養基中。

【0414】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述治療個體的癌症之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約5天完成。

【0415】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述治療個體的癌症之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成。

【0416】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述治療個體的癌症之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約5天完成且該第二擴增(或第二培養)以約11天完成。

【0417】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述治療個體的癌症之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約5天完成，第二擴增(或第二培養)以約11天完成，且第二擴增(或第二培養)在第二擴增(或第二培養)之第五天或約第五天分瓶至二個或超過二個培養。

【0418】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成且該第二擴增(或第二培養)以約13天完成。

【0419】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成，第二擴增(或第二培養)以約13天完成，且第二擴增(或第二培養)在第二

擴增(或第二培養)之第六天或約第六天分瓶至二個或超過二個培養。

【0420】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約5天完成。

【0421】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成。

【0422】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約5天完成且該第二擴增(或第二培養)以約11天完成。

【0423】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約5天完成，第二擴增(或第二培養)以約11天完成，且第二擴增(或第二培養)在第二擴增(或第二培養)之第五天或約第五天分瓶至二個或超過二個培養。

【0424】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴

細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成且該第二擴增(或第二培養)以約13天完成。

【0425】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成，第二擴增(或第二培養)以約13天完成，且第二擴增(或第二培養)在第二擴增(或第二培養)之第六天或約第六天分瓶至二個或超過二個培養。

【0426】在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述用於製備供過繼性T細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成且該第二擴增(或第二培養)以約13天完成。

【0427】在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述製備用於過繼性T細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，以使在第一擴增(或第一培養)之步驟中，該第一擴增(或第一培養)以約3天完成，第二擴增(或第二培養)以約13天完成，且第二擴增(或第二培養)在第二擴增(或第二培養)之第六天或約第六天分瓶至二個或超過二個培養。

【0428】在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述製備用於過繼性T細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴

細胞 (TIL) 之方法，以使在第一擴增 (或第一培養) 之步驟中，該第一擴增 (或第一培養) 以約 5 天完成。

【0429】 在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述製備用於過繼性 T 細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，以使在第一擴增 (或第一培養) 之步驟中，該第一擴增 (或第一培養) 以約 3 天完成。

【0430】 在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述製備用於過繼性 T 細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，以使在第一擴增 (或第一培養) 之步驟中，該第一擴增 (或第一培養) 以約 5 天完成且該第二擴增 (或第二培養) 以約 11 天完成。

【0431】 在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述製備用於過繼性 T 細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，以使在第一擴增 (或第一培養) 之步驟中，該第一擴增 (或第一培養) 以約 5 天完成，第二擴增 (或第二培養) 以約 11 天完成，且第二擴增 (或第二培養) 在第二擴增 (或第二培養) 之第五天或約第五天分瓶至二個或超過二個培養。

【0432】 在一些實施例中，本發明提供視情況經修改的任何前述製備用於過繼性 T 細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，以使在第一擴增 (或第一培養) 之步驟中，該第一擴增 (或第一培養) 以約 3 天完成且該第二擴增 (或第二培養) 以約 13 天完成。

【0433】 在一些實施例中，本發明提供視情況經修改

的任何前述製備用於過繼性 T 細胞療法之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，以使在第一擴增 (或第一培養) 之步驟中，該第一擴增 (或第一培養) 以約 3 天完成，第二擴增 (或第二培養) 以約 13 天完成，且第二擴增 (或第二培養) 在第二擴增 (或第二培養) 之第六天或約第六天分瓶至二個或超過二個培養。

【0434】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述方法，以使第一擴增 (或第一培養) 係於確定培養基中執行。

【0435】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述方法，以使第二擴增 (或第二培養) 係於確定培養基中執行。

【0436】在一些實施例中，本發明提供視情況經修飾的任何前述方法，以使第一擴增 (或第一培養) 及第二擴增 (或第二培養) 係於相同或不同的確定培養基中執行。

TIL 製造過程

【0437】有各種所屬技術領域中具有通常知識者已知之擴增 TIL 之方法。例如，Jin *et al.*, *J. Immunother.* **35**(3): 283-292(2012), “Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes in Gas-permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment”，其揭露係以引用方式併入本文中且揭示產生臨床使用之 TIL 之簡單方法。Jin *et al.* 揭示第一 TIL 培養及隨後的快速擴增

(REP)規程，彼等組合使所屬技術領域中具有通常知識者得以產生臨床有用量之TIL。在一些實施例中，本發明提供製造TIL之方法，該方法包含冷凍保存腫瘤之步驟、解凍腫瘤及執行Jin *et al.*所述過程。簡言之，此過程涉及下列過程。TIL起初可自酶催化性腫瘤消化物及藉由銳器分割產生之腫瘤片段(約1至8 mm³)培養。腫瘤消化物藉由在酶培養基(RPMI 1640、2 mM GlutaMAX、10 mg/mL建它黴素、30U/mL DNA酶及1.0 mg/mL膠原酶)中培育產生，隨後機械解離(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)而成。在將腫瘤放入酶培養基之後立即將腫瘤機械解離大約1分鐘。接著可將材料在37°C下在5% CO₂中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘，並在37°C下在5% CO₂中再次培育30分鐘。接著將腫瘤機械破壞第三次大約1分鐘。如果在第三次機械破壞後大片組織仍然存在，可施加1或2次額外機械解離至樣本，不論是否再在37°C下在5% CO₂中培育30分鐘。在最終培育結束時，如果細胞懸浮液含有大量的紅血球或死亡細胞，可使用Ficoll執行密度梯度分離以移除這些細胞。當TIL培養起始於24孔板(Costar 24孔平底細胞培養板；Corning Incorporated, Corning, NY)時，各孔接種1×10⁶個腫瘤消化細胞或大小大致約1至8 mm³的一個腫瘤片段於含IL-2(6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA)的2 mL完全培養基(CM)中。CM包含補充有10%人AB血清、25mM HEPES及約10 μg/mL建它黴素之含GlutaMAX的RPMI 1640。當培養起始於具有

40 mL容量及10 cm²氣體可通透矽底的氣體可通透培養瓶(G-Rex10 ; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)時，各培養瓶裝載10至40×10⁶個存活腫瘤消化細胞或5至30個腫瘤片段於10至40 mL之含IL-2的CM中。將G-Rex10及24孔板皆培育於37°C下5% CO₂的增濕培育箱中，在培養起始後5天，將半數培養基移除並置換成新鮮CM及IL-2，且在第5天後，每2至3天更換半數培養基。TIL的REP係使用T-175培養瓶及氣體可通透袋子或氣體可通透G-Rex培養瓶執行。以在T-175培養瓶中之TIL REP而言，將懸浮於150 mL之培養基中之1×10⁶個TIL添加至各T-175培養瓶。將TIL與作為「餵養」細胞之經照射(50 Gy)的同種異體PBMC以1比100的比例培養，且將細胞培養於補充有3000 IU/mL的IL-2及30 ng/mL的抗CD3之CM與AIM-V培養基的1比1混合物(50/50培養基)中。T-175培養瓶在37°C下在5% CO₂中培育。一半的培養基在第5天使用含有3000 IU/mL的IL-2之50/50培養基更換。在第7天，將來自2個T-175培養瓶的細胞組合於3L袋子中，並將300 mL含有5%人AB血清及3000 IU/mL的IL-2之AIM-V添加至300 mL的TIL懸浮液。各袋中的細胞數量每天或每2天計數一次，且添加新鮮培養基以保持細胞計數介於0.5與2.0 × 10⁶個細胞/mL之間。以在500mL容量的具有100 cm²氣體可通透矽底之培養瓶(G-Rex100, Wilson Wolf)中之TIL REP而言，將5 × 10⁶至10 × 10⁶個TIL與經輻照的異體PBMC以1至100的比例培養於400 mL的補充有3000 IU/mL的IL-2及30 ng/mL的

抗CD3之50/50培養基中。G-Rex100培養瓶在37°C下在5% CO₂中培育。在第5天，將250 mL的上清液移除並放入離心瓶且在1500 rpm(491 g)下離心10分鐘。將TIL團塊用150 mL的含有3000 IU/mL的IL-2之新鮮50/50培養基再懸浮，並添加回原始G-Rex100培養瓶。當TIL在G-Rex100培養瓶中連續擴增時，在第7天將各G-Rex100中之TIL懸浮於存在於各培養瓶中之300 mL的培養基中，且將細胞懸浮液分成用於接種3個G-Rex100培養瓶之三個100 mL等分試樣。將150 mL之含有5%人AB血清及3000 IU/mL的IL-2的AIM-V添加至各培養瓶。G-Rex100培養瓶在37°C下在5% CO₂中培育，且在4天之後將150 mL之含有3000 IU/mL的IL-2的AIM-V添加至各G-Rex100培養瓶。細胞在培養的第14天收集。

【0438】在一些實施例中，根據本發明之擴增方法包含製備來自經冷凍之腫瘤的細胞之擴增。腫瘤樣本係自病患收集且根據在本文中揭示之方法冷凍保存。當準備擴增細胞時(以1/100規模執行之過程而言)，使用37°C水浴將約六個2至3 mm直徑之經冷凍之腫瘤片段解凍5+1分鐘，且於補充有建它黴素之無菌Hanks氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。接著將片段放入具有CM1培養基或無血清或確定培養基之G-Rex 10M培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)或其他氣體可通透容器中，該CM1培養基或無血清或確定培養基含有約6,000 IU/mL之rhIL-2。這些REP前(或第一擴增)培養係於37°C培育箱中培育5天。在第5天，收集

REP前細胞，且藉由在G-Rex 5M培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)或其他氣體可通透容器中於含有3,000 IU/mL rhIL-2及30 ng/mL的OKT-3之CM2培養基或無血清或確定培養基中共培養10%的REP前TIL與 25×10^6 或 50×10^6 個PBMC餵養細胞來起始REP(或第二擴增)。在第10天，將培養分瓶至G-Rex 5M培養瓶或其他氣體可通透容器，使該G-Rex 5M培養瓶或其他氣體可通透容器含有不超過 10×10^6 個細胞。分瓶培養係於含有3,000 IU/mL rhIL-2之CM4培養基或其他無血清或確定培養基中額外培育6天。在第16天，收集細胞且使用CryoStor10(Biolife, USA)冷凍。此過程在本文中稱為「早期REP方法1」過程或「ER-1」。

【0439】在一些實施例中，根據本發明之擴增方法包含製備來自經冷凍之腫瘤的細胞之擴增。腫瘤樣本係自病患收集且根據在本文中揭示之方法冷凍保存。當準備擴增細胞時(以1/100規模執行之過程而言)，使用37°C水浴將約六個2至3 mm直徑之經冷凍之腫瘤片段解凍5+1分鐘，且於補充有建它黴素之無菌Hanks氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。接著將片段放入具有CM1培養基或無血清或確定培養基之G-Rex 10M培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)或其他氣體可通透容器中，該CM1培養基或無血清或確定培養基含有約6,000 IU/mL之rhIL-2。這些REP前(或第一擴增)培養係於37°C培育箱中培育3天。在第3天，收集REP前細胞，且藉由在G-Rex 5M培養瓶(Wilson Wolf

Mfg., New Brighton, MN)或其他氣體可通透容器中於含有 3,000 IU/mL rhIL-2及 30 ng/mL的 OKT-3之 CM2培養基或無血清或確定培養基中共培養 10%的 REP前 TIL與 25×10^6 或 50×10^6 個 PBMC 餵養細胞來起始 REP(或第二擴增)。在第 9 天，將培養分瓶至 G-Rex 5M培養瓶或其他氣體可通透容器，使該 G-Rex 5M培養瓶或其他氣體可通透容器含有不超過 10×10^6 個細胞。分瓶培養係於含有 3,000 IU/mL rhIL-2之 CM4培養基或其他無血清或確定培養基中額外培育 7 天。在第 16 天，收集細胞且使用 CryoStor10(Biolife, USA)冷凍。此過程在本文中稱為「早期 REP方法 2」過程或「ER-2」。

【0440】在一些實施例中，本發明提供製造 TIL 之方法，該方法包含冷凍保存腫瘤之步驟、解凍腫瘤及執行下列過程。TIL 可藉由快速擴增產生，該快速擴增在 T 細胞生長因子(諸如 300 IU/mL IL-2 或 IL-15，以 IL-2 為較佳)存在下，使用活體外周邊血液單核細胞(PBMC)加上(一或多個)癌症抗原(包括其抗原性部分，諸如表位，或細胞)之刺激進行，該癌症抗原可選地可自載體表現，諸如 HLA-A2 結合肽，例如 $0.3 \mu\text{M}$ MART-1:26-35(27L) 或 gp100:209-217(210M)。經活體外誘導之 TIL 藉由用脈衝至 HLA-A2 表現性抗原呈現細胞上的相同癌症抗原再刺激來快速擴增。替代地，TIL 可使用例如經照射的自體淋巴細胞或用經照射的 HLA-A2⁺同種異體淋巴細胞及 IL-2 再刺激。可選擇高度急切辨識任何因各腫瘤細胞基因體所編碼之估計 10,000

個基因突變所產生之獨特抗原之 TIL。然而，抗原不需要獨特。可選擇高度急切辨識一或多個癌症抗原之 T 細胞，該癌症抗原包括一或多個癌症抗原之抗原性部分(諸如表位)或癌症細胞。「癌症抗原」及「該癌症抗原」意圖涵蓋所有前述抗原。如果癌症係黑色素瘤諸如轉移性黑色素瘤，較佳地選擇高度急切辨識 MART-1(諸如 MART-1 :26-35(27L))、gp100(諸如 gp100:209-217(210M))或衍生自腫瘤編碼突變之「獨特」或病患特異性抗原的 TIL。可選擇由 TIL 所高度急切辨識之其他合適黑色素瘤抗原，包括但不限於酪胺酸酶、酪胺酸酶相關蛋白質 (TRP)1、TRP2 及 MAGE。抗原(諸如 NY-ESO-1、端粒酶、p53、HER2/neu、癌胚抗原或前列腺特異性抗原)可用來選擇高度急切辨識用於治療肺癌、乳癌、結腸癌、前列腺癌之 TIL 且可選擇包括但不限於酪胺酸酶、酪胺酸酶相關蛋白質之類似 TIL。

【0441】基於 IL-2 的 TIL 擴增及隨後的「快速擴增過程」(REP)已因其速度及效率而成為 TIL 擴增的較佳方法。Dudley, *et al.*, *Science* **2002**, 298, 850-54; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 2346-57; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233-39; Riddell, *et al.*, *Science* **1992**, 257, 238-41; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42。REP 可在 14 天期間導致 1,000 倍的 TIL 擴增，儘管其需要大量過量(例如，200 倍)的經照射的通常來自多個供體之同種異體周邊血液單核細胞 (PBMC) 作為餵養細胞，還

需要抗 CD3 抗體 (OKT3) 及高劑量的 IL-2。Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42。經冷凍保存之腫瘤片段係製造用於治療性或其他目的之 TIL 的初始或第一培養的合適起始點。

【0442】含有一些這些特徵的例示性 TIL 過程 (稱為過程 2A) 描繪於圖 1。另一例示性 TIL 過程 (稱為過程 1C) 係於圖 5 及 6 中描述及與過程 2A 比較。過程 2A 之實施例係顯示於圖 1。

【0443】如本文中所討論，本發明可包括關於再刺激經冷凍保存之 TIL 的步驟，以增加彼等的代謝活性及因此在移植至病患中之前的相對健康，以及測試該代謝健康之方法。如在本文中大致概述，TIL 通常取自病患樣本且經操作以在移植至病患中之前擴增彼等之數量。在一些實施例中，TIL 可選地可經如下討論之基因操作。

【0444】在一些實施例中，TIL 可經冷凍保存且經解凍以投予至病患。一旦解凍後，彼等亦可經再刺激以在輸注至病患中之前增加彼等之代謝。

【0445】在一些實施例中，如以下及實例及圖式中所詳細討論的，第一擴增 (包括稱為 REP 前之過程以及圖 1 步驟 A 所示之過程) 縮短至 3 至 14 天且第二擴增 (包括稱為 REP 之過程以及圖 1 步驟 B 所示之過程) 縮短至 7 至 14 天。在一些實施例中，第一擴增 (例如，圖 1 步驟 B 所述之擴增) 縮短至 11 天且第二擴增 (例如，圖 1 步驟 D 所述之擴增) 縮短至 11 天。在一些實施例中，如以下及實例及圖式中所詳細討論

的，第一擴增與第二擴增(例如，如圖1步驟B及步驟D所描述之擴增)之組合縮短為22天。

【0446】以下的「步驟」代號A、B、C等參照圖1且參照本文所述之某些實施例。以下及圖1中的步驟順序為例示性且步驟的任何組合或順序以及額外步驟、重複步驟及/或步驟省略皆在本申請案及在本文中揭示之方法考慮。

步驟A：獲得病患腫瘤樣本

【0447】一般來說，TIL最初獲自病患腫瘤樣本(「初代TIL」)且接著擴增成較大族群以進行如本文中描述之進一步操作，可選地冷凍保存、如本文概述之再刺激及可選地評估表型及代謝參數作為TIL健康的指標。

【0448】病患腫瘤樣本可使用所屬技術領域中已知之方法獲得，通常經由手術部分切除、針吸活體組織切片或其他用於獲得含有腫瘤及TIL細胞之混合物的樣本的手段。一般來說，腫瘤樣本可來自任何實性腫瘤，包括原發性腫瘤、侵入性腫瘤或轉移性腫瘤。腫瘤樣本亦可為液體腫瘤，諸如獲自血液惡性病的腫瘤。實性腫瘤可為任何癌症種類，包括但不限於乳癌、胰癌、前列腺癌、結直腸癌、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，有用的TIL獲自惡性黑色素瘤腫瘤，因為報告指出這些腫瘤具有特別高含量的TIL。

【0449】用語「實性腫瘤」係指組織的異常團塊，通常不含囊腫或液體區域。實性腫瘤可為良性或惡性。用語「實性腫瘤癌」係指惡性、腫瘤性或癌性實性腫瘤。實性腫瘤癌包括但不限於肉瘤、癌(carcinoma)及淋巴瘤，諸如肺癌、乳癌、三陰性乳癌、前列腺癌、結腸癌、直腸癌及膀胱癌。在一些實施例中，癌症係選自子宮頸癌、頭頸癌(包括例如頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、神經膠質母細胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰癌、膀胱癌、乳癌、三陰性乳癌及非小細胞肺癌。實性腫瘤的組織結構包括相互依賴的組織隔室，包括實質(癌細胞)及有癌細胞分散其中且可提供支持性微環境的支持性基質細胞。

【0450】用語「血液惡性病」係指哺乳動物造血及淋巴組織(包括但不限於血液、骨髓、淋巴結及淋巴系統的組織)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白血病(ALL)、慢性淋巴細胞性淋巴瘤(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性單核球性白血病(AMoL)、何杰金氏淋巴瘤及非何杰金氏淋巴瘤。用語「B細胞血液惡性病」係指影響B細胞的血液惡性病。

【0451】一旦獲得，腫瘤樣本通常使用銳器分割碎斷成介於1至約8 mm³之間的小片(small pieces)，且約2至3 mm³特別有用。TIL係自這些片段使用酶催化性腫瘤消化物培養。腫瘤消化物可藉由在酶催化性培養基(例如

Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640緩衝劑、2 mM 麩胺酸、10 mcg/mL建它黴素、30單位/mL的DNA酶及1.0 mg/mL的膠原酶)中培育，隨後機械解離(例如使用組織解離器)產生。腫瘤消化物可藉由將腫瘤放入酶催化性培養基中且機械解離腫瘤大約1分鐘，隨後在37°C下在5% CO₂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到只有小組織片存在而產生。在此過程結束時，如果細胞懸浮液含有大量的紅血球或死亡細胞，可使用FICOLL分支親水性多醣執行密度梯度分離以移除這些細胞。可使用所屬技術領域中已知之替代方法，諸如該些在美國專利申請公開案第2012/0244133 A1號中描述者，其揭露以引用方式併入本文中。任何前述方法可用於本文所述之任何實施例中之擴增TIL之方法或治療癌症之方法。

【0452】一般來說，將收集到的細胞懸浮液稱為「初代細胞族群」或「新鮮收集」細胞族群。

【0453】在一些實施例中，碎斷包括物理碎斷，包括例如分割以及消化。在一些實施例中，碎斷係物理碎斷。在一些實施例中，碎斷係分割。在一些實施例中，碎斷係藉由消化。在一些實施例中，TIL最初可自獲自病患的酶催化性腫瘤消化物及腫瘤片段培養。在一實施例中，TIL最初可自獲自病患的酶催化性腫瘤消化物及腫瘤片段培養。

【0454】在一些實施例中，當腫瘤是實性腫瘤時，在例如(如圖1中提供的)步驟A中獲得腫瘤樣本後，腫瘤進行

物理碎斷。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之前。在一些實施例中，碎斷發生在冷凍保存之後。在一些實施例中，碎斷發生在獲得腫瘤之後且不進行任何冷凍保存。在一些實施例中，將腫瘤碎斷並將10、20、30、40或更多個片段或片放入各容器進行第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷並將30或40個片段或片放入各容器進行第一擴增。在一些實施例中，將腫瘤碎斷並將40個片段或片放入各容器進行第一擴增。在一些實施例中，多個片段包含約4至約50個片段，其中各片段具有約 27 mm^3 的體積。在一些實施例中，多個片段包含約30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克至約1.5克。在一些實施例中，多個片段包含約4個片段。

【0455】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，腫瘤片段係介於約 1 mm^3 與 10 mm^3 之間。在一些實施例中，腫瘤片段係介於約 1 mm^3 與 8 mm^3 之間。在一些實施例中，腫瘤片段係約 1 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 2 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 3 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 4 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 5 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 6 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 7 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 8 mm^3 。在一些實施例

中，腫瘤片段係約 9 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤片段係約 10 mm^3 。在一些實施例中，腫瘤係 $1\text{-}4 \text{ mm} \times 1\text{-}4 \text{ mm} \times 1\text{-}4 \text{ mm}$ 。在一些實施例中，腫瘤係 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 。在一些實施例中，腫瘤係 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 。在一些實施例中，腫瘤係 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 。在一些實施例中，腫瘤係 $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ 。在其中起始培養之前先將腫瘤組織冷凍之實施例中，腫瘤係約 $6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ 。

【0456】在一些實施例中，腫瘤經部分切除以最小化各片上出血性、壞死及/或脂肪組織的量。在一些實施例中，腫瘤經部分切除以最小化各片上出血性組織的量。在一些實施例中，腫瘤經部分切除以最小化各片上壞死組織的量。在一些實施例中，腫瘤經部分切除以最小化各片上脂肪組織的量。

【0457】在一些實施例中，腫瘤碎斷的執行是為了維持腫瘤內部結構。在一些實施例中，腫瘤碎斷的執行不包括使用解剖刀執行鋸切動作。在一些實施例中，TIL係獲自腫瘤消化物。在一些實施例中，腫瘤消化物的產製藉由在例如但不限於RPMI 1640、 2 mM GlutaMAX、 $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 建它黴素、 30 U/mL DNA酶及 1.0 mg/mL 膠原酶的酶培養基中培育，隨後機械解離(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)而成。在將腫瘤放入酶培養基後，可將腫瘤機械解離大約1分鐘。接著可將溶液在 37°C 下在 $5\% \text{ CO}_2$ 中培育30分鐘，且接著再次機械破壞大約1分鐘。在 37°C 下在 $5\% \text{ CO}_2$ 中再培育30分鐘後，可將腫瘤機械破壞第三次

大約1分鐘。在一些實施例中，在第三次機械破壞後如果大片組織仍然存在，則施加1或2次額外機械解離至樣本，不論是否再在37°C下在5% CO₂中培育30分鐘。在一些實施例中，在最終培育結束時，如果細胞懸浮液含有大量的紅血球或死亡細胞，可使用Ficoll執行密度梯度分離以移除這些細胞。

【0458】在一些實施例中，將第一擴增步驟之前收集到的細胞懸浮液稱為「初代細胞族群」或「新鮮收集」細胞族群。

【0459】在一些實施例中，細胞可在樣本收集後可選地冷凍且在進入步驟B描述的擴增之前冷凍儲存，該步驟B在以下進一步詳細描述且在圖1中例示。

步驟B：第一擴增

【0460】在一些實施例中，本方法提供獲得年輕TIL，該年輕TIL在投予至個體/病患後能夠增加複製循環且因此相較於較老TIL可能提供額外治療好處(例如，「較老TIL」在投予至個體/病患之前已進一步進行更多回合的離體複製)。年輕TIL的特徵已在文獻中描述，例如Donia, *et al.*, *Scandinavian Journal of Immunology*, **75**:157-167(2012)；Dudley *et al.*, *Clin Cancer Res*, **16**:6122-6131(2010)；Huang *et al.*, *J Immunother*, **28**(3):258-267(2005)；Besser *et al.*, *Clin Cancer Res*, **19**(17):OF1-OF9(2013)；Besser *et al.*, *J Immunother*, **32**:415-

423(2009) ; Robbins, *et al.*, *J Immunol*, 2004; **173**:7125-7130 ; Shen *et al.*, *J Immunother*, **30**:123-129(2007) ; Zhou, *et al.*, *J Immunother*, **28**:53-62(2005) ; 及 Tran, *et al.*, *J Immunother*, **31**:742-751(2008) , 所有全文皆以引用方式併入本文中。

【 0461 】 T及B淋巴細胞的多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段的體細胞重組產生。這些基因區段：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)的結合特異性及下游應用。本發明提供產製展現及增加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，藉由本方法獲得之TIL相較於新鮮收集TIL及/或使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1中體現之方法以外的方法)製備的TIL，展現增加的T細胞貯庫多樣性。在一些實施例中，藉由本方法獲得之TIL相較於新鮮收集TIL及/或使用稱為過程1C之方法(如在圖5及/或圖6所例示者)製備的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，增加多樣性是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，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性

存在選自由 α 、 β 、 γ 及 δ 受體所組成之群組的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 的表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR) α 的表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR) β 的表現增加。在一些實施例中，TCR $\alpha\beta$ (即TCR α/β)的表現增加。

【0462】在例如諸如圖1步驟A所述之分割或消化腫瘤片段之後，將所得細胞在有利TIL但不利腫瘤及其他細胞生長的條件下於含有IL-2的血清中培養。在一些實施例中，將腫瘤消化物培育於2 mL孔中的包含去活化人AB血清及6000 IU/mL IL-2的培養基中。將此初代細胞族群培養一段數天的期間(通常3至14天)，導致通常約 1×10^8 個主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施例中，將此初代細胞族群培養一段7至14天的期間，導致通常約 1×10^8 個主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施例中，將此初代細胞族群培養一段10至14天的期間，導致通常約 1×10^8 個主體TIL細胞的主體TIL族群。在一些實施例中，將此初代細胞族群培養一段約11天的期間，導致通常約 1×10^8 主體TIL細胞的主體TIL族群。

【0463】在一較佳實施例中，TIL的擴增可使用如以下及本文所述的初始主體TIL擴增步驟(例如諸如該些圖1步驟B中所述者，其可包括稱為REP前的過程)執行，隨後執行如以下步驟D及本文所述的第二擴增(步驟D，包括稱為快速擴增規程(REP)步驟的過程)，隨後執行可選的冷凍保存，及隨後執行如以下及本文所述的第二步驟D(包括稱

為再刺激 REP 步驟的過程)。獲自此過程的 TIL 可如本文所述之可選地以表型特徵及代謝參數表徵。

【0464】在 TIL 培養起始於 24 孔板(例如使用 Costar 24 孔平底細胞培養板(Corning Incorporated, Corning, NY))的實施例中，各孔可接種 1×10^6 個腫瘤消化細胞或一個腫瘤片段於含 IL-2(6000 IU/mL; Chiron Corp., Emeryville, CA) 的 2 mL 完全培養基(CM)中。在一些實施例中，腫瘤片段係介於約 1 mm^3 與 10 mm^3 之間。

【0465】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」(培養基的縮寫)。在一些實施例中，步驟 B 的 CM 係由補充有 10% 人 AB 血清、25 mM HEPES 及 $10 \mu\text{g/mL}$ 建它黴素之含 GlutaMAX 的 RPMI 1640 組成。在培養起始於具有 40 mL 容量及 10 cm^2 氣體可通透矽底的氣體可通透培養瓶(例如 G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN)的實施例中(圖 1)，各培養瓶裝載 10×10^6 至 40×10^6 個存活腫瘤消化細胞或 5 至 30 個腫瘤片段於 10 至 40 mL 之含 IL-2 的 CM 中。將 G-Rex10 及 24 孔板皆培育於 37°C 下 5% CO_2 的增濕培育箱中，在培養起始後 5 天，將半數培養基移除並置換成新鮮 CM 及 IL-2，且在第 5 天後，每 2 至 3 天更換半數培養基。

【0466】在製備腫瘤片段後，將所得細胞(即片段)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 的血清中。在一些實施例中，將腫瘤消化物培育於 2 mL 孔中的包含去活化人類 AB 血清(或在一些如本文概述之

情況下，在 aAPC 細胞族群存在下)及 6000 IU/mL IL-2 的培養基中。將此初代細胞族群培養一段數天的期間(通常 10 至 14 天)，導致通常約 1×10^8 主體 TIL 細胞的主體 TIL 族群。在一些實施例中，在第一擴增期間的生長培養基包含 IL-2 或其變體。在一些實施例中，該 IL 係重組人 IL-2(rhIL-2)。在一些實施例中，IL-2 原液的 1 mg 小瓶具有 20 至 30×10^6 IU/mg 的比活性。在一些實施例中，IL-2 原液的 1 mg 小瓶具有 20×10^6 IU/mg 的比活性。在一些實施例中，IL-2 原液的 1 mg 小瓶具有 25×10^6 IU/mg 的比活性。在一些實施例中，IL-2 原液的 1 mg 小瓶具有 30×10^6 IU/mg 的比活性。在一些實施例中，IL-2 原液具有 4 至 8×10^6 IU/mg 的 IL-2 之最終濃度。在一些實施例中，IL-2 原液具有 5 至 7×10^6 IU/mg 的 IL-2 之最終濃度。在一些實施例中，IL-2 原液具有 6×10^6 IU/mg 的 IL-2 之最終濃度。在一些實施例中，IL-2 原液係如實例 E 所述製備。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 10,000 IU/mL 的 IL-2、約 9,000 IU/mL 的 IL-2、約 8,000 IU/mL 的 IL-2、約 7,000 IU/mL 的 IL-2、約 6000 IU/mL 的 IL-2 或約 5,000 IU/mL 的 IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 9,000 IU/mL 的 IL-2 至約 5,000 IU/mL 的 IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 8,000 IU/mL 的 IL-2 至約 6,000 IU/mL 的 IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 7,000 IU/mL 的 IL-2 至約 6,000 IU/mL 的 IL-2。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 6,000 IU/mL 的 IL-2。在一實施例中，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 的 IL-2。在一實施例中，細胞培養基進一步包含 IL-2。在較佳實施例中，細胞培養基包含約 3000 IU/mL 的 IL-2。在一實施例中，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 的 IL-2。在一實施例中，細胞培養基包含介於 1000 與 2000 IU/mL 之間、介於 2000 與 3000 IU/mL 之間、介於 3000 與 4000 IU/mL 之間、介於 4000 與 5000 IU/mL 之間、介於 5000 與 6000 IU/mL 之間、介於 6000 與 7000 IU/mL 之間、介於 7000 與 8000 IU/mL 之間或約 8000 IU/mL 的 IL-2。

【0467】在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 500 IU/mL 的 IL-15、約 400 IU/mL 的 IL-15、約 300 IU/mL 的 IL-15、約 200 IU/mL 的 IL-15、約 180 IU/mL 的 IL-15、約 160 IU/mL 的 IL-15、約 140 IU/mL 的 IL-15、約 120 IU/mL 的 IL-15 或約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 500 IU/mL 的 IL-15 至約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 400 IU/mL 的 IL-15 至約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 300 IU/mL 的 IL-15 至約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約 200 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約 180 IU/mL 的 IL-

15。在一實施例中，細胞培養基進一步包含IL-15。在較佳實施例中，細胞培養基包含約180 IU/mL的IL-15。

【0468】在一些實施例中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL的IL-21、約15 IU/mL的IL-21、約12 IU/mL的IL-21、約10 IU/mL的IL-21、約5 IU/mL的IL-21、約4 IU/mL的IL-21、約3 IU/mL的IL-21、約2 IU/mL的IL-21、約1 IU/mL的IL-21或約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約20 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約15 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約12 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約10 IU/mL的IL-21至約0.5 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約5 IU/mL的IL-21至約1 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，第一擴增培養基包含約2 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL的IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約0.5 IU/mL的IL-21。在一實施例中，細胞培養基進一步包含IL-21。在較佳實施例中，細胞培養基包含約1 IU/mL的IL-21。

【0469】在一實施例中，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的OKT-3抗體。在一實施例中，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 μ g/mL的 OKT-3 抗體。在一實施例中，細胞培養基包含介於 0.1 ng/mL與 1 ng/mL之間、介於 1 ng/mL與 5 ng/mL之間、介於 5 ng/mL與 10 ng/mL之間、介於 10 ng/mL與 20 ng/mL之間、介於 20 ng/mL與 30 ng/mL之間、介於 30 ng/mL與 40 ng/mL之間、介於 40 ng/mL與 50 ng/mL之間及介於 50 ng/mL與 100 ng/mL之間的 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 抗體係莫羅單抗。

【0470】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 促效劑係 4-1BB 促效劑，且 4-1BB 促效劑係選自由烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及彼等之片段、衍生物、變體、生物類似物及組合所組成之群組。在一些實施例中，TNFRSF 促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於 0.1 μ g/mL與 100 μ g/mL之間的濃度。在一些實施例中，TNFRSF 促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於 20 μ g/mL與 40 μ g/mL之間的濃度。

【0471】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 的 IL-2 及初始濃度約 30 ng/mL 的 OKT-3 抗體，且其中一或

多種 TNFRSF 促效劑包含 4-1BB 促效劑。

【0472】在一些實施例中，第一擴增培養基稱為「CM」（培養基的縮寫）。在一些實施例中，其稱為 CM1（培養基 1）。在一些實施例中，CM 係由補充有 10% 人類 AB 血清、25 mM HEPES 及 10 mg/mL 建它黴素之含 GlutaMAX 的 RPMI 1640 組成。在培養起始於具有 40 mL 容量及 10cm² 氣體可通透矽底的氣體可通透培養瓶（例如 G-Rex10；Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN）的實施例中（圖 1），各培養瓶裝載 10×10^6 至 40×10^6 個存活腫瘤消化細胞或 5 至 30 個腫瘤片段於 10 至 40 mL 之含 IL-2 的 CM 中。將 G-Rex10 及 24 孔板皆培育於 37°C 下 5% CO₂ 的增濕培育箱中，在培養起始後 5 天，將半數培養基移除並置換成新鮮 CM 及 IL-2，且在第 5 天後，每 2 至 3 天更換半數培養基。在一些實施例中，CM 係實例中所述的 CM1，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發生。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。

【0473】在一些實施例中，第一擴增（包括諸如例如該些在圖 1 步驟 B 所述之過程，其可包括該些有時稱為 REP 前者）過程縮短至 3 至 14 天，如實例及圖式中所討論。在一些實施例中，第一擴增（包括諸如例如該些在圖 1 步驟 B 所述之過程，其可包括該些有時稱為 REP 前者）過程縮短至 7 至 14 天，如實例中所討論且顯示於圖 4 及 5，以及包括例如圖 1 步驟 B 所述之擴增。在一些實施例中，步驟 B 的第一擴

增縮短至 10 至 14 天。在一些實施例中，第一擴增縮短至 11 天，如在例如圖 1 步驟 B 所述之擴增中所討論。

【0474】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。

【0475】在一些實施例中，採用 IL-2、IL-7、IL-15 及 / 或 IL-21 之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-7、IL-15 及 / 或 IL-21 以及任何彼等之組合可被包括在第一擴增期間，包括例如在根據圖 1 步驟 B 過程期間以及如本文所述者。在一些實施例中，採用 IL-2、IL-15 及 IL-21 之組合作為在第一擴增期間之組合。在一些實施例中，IL-2、IL-15 及 IL-21 以及任何彼等之組合可被包括在根據圖 1 步驟 B 過程期間以及如本文所述者。

【0476】在一些實施例中，第一擴增(包括稱為 REP 前的過程；例如根據圖 1 之步驟 B)過程縮短至 3 至 14 天，如實例及圖式中所討論。在一些實施例中，步驟 B 的第一擴增縮短至 7 至 14 天。在一些實施例中，步驟 B 的第一擴增縮短至 10 至 14 天。在一些實施例中，第一擴增縮短至 11 天。

【0477】在一些實施例中，第一擴增(例如根據圖 1 之步驟 B)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所述之 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係例如 G-REX -10 或 G-REX -100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

步驟 C：第一擴增至第二擴增的轉變

【0478】 在一些情況下，獲自第一擴增的主體 TIL 族群包括例如獲自例如圖 1 所示之步驟 B 的 TIL 族群可使用本文以下討論的規程立即冷凍保存。替代地，獲自第一擴增的 TIL 族群(稱為第二 TIL 族群)可進行第二擴增(其可包括有時稱為 REP 的擴增)且接著如以下討論進行冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的 TIL 將用於療法中的情況中，第一 TIL 族群(有時稱為主體 TIL 族群)或第二 TIL 族群(其在一些實施例中可包括稱為 REP TIL 族群的族群)可在擴增之前或在第一擴增之後且在第二擴增之前經受基因修飾以用於合適治療。

【0479】 在一些實施例中，獲自第一擴增(例如圖 1 所示之步驟 B)的 TIL 係經儲存直到為了選擇而測定表型。在一些實施例中，獲自第一擴增(例如圖 1 所示之步驟 B)的 TIL 不經儲存且直接進行第二擴增。在一些實施例中，獲自第一擴增的 TIL 在第一擴增之後且在第二擴增之前不經冷凍保存。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約 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。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約 3 天至 14 天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約 4 天至 14 天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約 4 天至 10 天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約 7 天至 14 天。在一些實施例

中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的約14天。

【0480】在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的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，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的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，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的3天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的4天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的5天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的6天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的7天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的8天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的9天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的10天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的11天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的12天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的13天至14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增

發生在當碎斷發生後的14天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的1天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的2天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的3天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的4天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的5天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的6天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的7天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的8天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的9天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的10天至11天。在一些實施例中，從第一擴增轉變至第二擴增發生在當碎斷發生後的11天。

【0481】在一些實施例中，TIL在第一擴增之後且在第二擴增之前不經儲存，且TIL直接進行第二擴增(例如在一些實施例中，在如圖1所示的從步驟B至步驟D的轉變期間並不經儲存)。在一些實施例中，轉變在如本文所述之密閉系統中發生。在一些實施例中，來自第一擴增的TIL(第二TIL族群)直接進行第二擴增而無轉變期。

【0482】在一些實施例中，從第一擴增至第二擴增的

轉變(例如根據圖1之步驟C)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所述之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係例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

細胞介素

【0483】本文所述之擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)的培養基，如所屬技術領域中所知。

【0484】替代地，使用細胞介素之組合以進行TIL的快速擴增及或第二擴增是額外可能的，如同大致上在國際專利公開號WO 2015/189356及W國際專利公開號WO 2015/189357中概述的二種或超過二種IL-2、IL-15及IL-21的組合，特此明白將全文以引用方式併入本文中。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、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淋巴細胞產製，且特別是如其中所述的T細胞。

步驟D：第二擴增

【0485】在一些實施例中，TIL細胞族群於數量上在收集及初始主體處理(例如圖1所示之步驟A及步驟B)及轉變(稱為步驟C)之後擴增。此進一步擴增在本文中稱為第

二擴增，其可包括在所屬技術領域中通常稱為快速擴增過程(REP；如圖1步驟D所示之過程)的擴增過程。第二擴增通常使用包含一些組分(包括飼養細胞、細胞介素來源及抗CD3抗體)的培養基在氣體可通透容器中完成。

【0486】在一些實施例中，TIL的第二擴增或第二TIL擴增(其可包括有時稱為REP的擴增；以及如圖1步驟D所示之過程)可使用任何所屬技術領域中具有通常知識者所知之TIL培養瓶或容器執行。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。

【0487】在一實施例中，第二擴增可在氣體可通透容器中使用本揭露之方法(包括例如稱為REP之擴增；以及如圖1步驟D所示之過程)執行。例如，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細胞受體刺激快速擴增。非特異性T細胞受體刺激可包括例如抗CD3抗體諸如約30 ng/ml的OKT3、小鼠單株抗CD3抗體(可購自Ortho-McNeil, Raritan, NJ或Miltenyi Biotech, Auburn, CA)

或UHCT-1(可購自BioLegend, San Diego, CA, USA)。TIL可藉由在第二擴增期間包括一或多種癌症的抗原(包括彼等之抗原性部分諸如表位)來擴增以誘導進一步TIL活體外刺激，該等抗原可選地在T細胞生長因子諸如300 IU/mL IL-2或IL-15存在下可選地自載體表現，諸如人白血球抗原A2(HLA-A2)結合肽，例如0.3 μ M MART-1 :26-35(27 L)或gp100:209-217(210M)。其他合適抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪胺酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2及VEGFR2或彼等之抗原性部分。TIL亦可藉由用脈衝至HLA-A2表現性抗原呈現細胞上的癌症相同抗原再刺激來快速擴增。替代地，TIL可進一步用例如經照射的自體淋巴細胞或用經照射的HLA-A2⁺同種異體淋巴細胞及IL-2再刺激。在一些實施例中，再刺激發生為第二擴增的一部分。在一些實施例中，第二擴增在經照射的自體淋巴細胞或經照射的HLA-A2⁺同種異體淋巴細胞及IL-2的存在下發生。

【0488】在一實施例中，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的IL-2。在一實施例中，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的IL-2。在一實施例中，細胞培養基包含介於1000與2000

IU/mL之間、介於2000與3000 IU/mL之間、介於3000與4000 IU/mL之間、介於4000與5000 IU/mL之間、介於5000與6000 IU/mL之間、介於6000與7000 IU/mL之間、介於7000與8000 IU/mL之間或介於8000 IU/mL的IL-2。

【0489】在一實施例中，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的OKT-3抗體。在一實施例中，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 μ g/mL的OKT-3抗體。在一實施例中，細胞培養基包含介於0.1 ng/mL與1 ng/mL之間、介於1 ng/mL與5 ng/mL之間、介於5 ng/mL與10 ng/mL之間、介於10 ng/mL與20 ng/mL之間、介於20 ng/mL與30 ng/mL之間、介於30 ng/mL與40 ng/mL之間、介於40 ng/mL與50 ng/mL之間及介於50 ng/mL與100 ng/mL之間的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抗體係莫羅單抗。

【0490】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促效劑係4-1BB促效劑，且4-1BB促效劑係選自由

烏瑞魯單抗、烏圖木單抗、EU-101、融合蛋白質及彼等之片段、衍生物、變體、生物類似物及組合所組成之群組。在一些實施例中，TNFRSF促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間的濃度。在一些實施例中，TNFRSF促效劑的添加濃度足以在細胞培養基中達成介於20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間的濃度。

【0491】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的IL-2及初始濃度約30 ng/mL的OKT-3抗體，且其中一或多種TNFRSF促效劑包含4-1BB促效劑。

【0492】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，IL-2、IL-7、IL-15及/或IL-21以及任何彼等之組合可被包括在第二擴增期間，包括例如在根據圖1步驟D過程期間以及如本文所述者。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，IL-2、IL-15及IL-21以及任何彼等之組合可被包括在根據圖1步驟D過程期間以及如本文所述者。

【0493】在一些實施例中，第二擴增可在包含IL-2、OKT-3、抗原呈現餵養細胞及可選地TNFRSF促效劑的經補充的細胞培養基中進行。在一些實施例中，第二擴增在經補充的細胞培養基中發生。在一些實施例中，經補充的細胞培養基包含IL-2、OKT-3及抗原呈現餵養細胞。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；亦稱為抗原呈現餵養細胞)。在一些實施例中，第二擴增在包含 IL-2、OKT-3 及抗原呈現餵養細胞 (即抗原呈現細胞) 的細胞培養基中發生。

【0494】 在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 500 IU/mL 的 IL-15、約 400 IU/mL 的 IL-15、約 300 IU/mL 的 IL-15、約 200 IU/mL 的 IL-15、約 180 IU/mL 的 IL-15、約 160 IU/mL 的 IL-15、約 140 IU/mL 的 IL-15、約 120 IU/mL 的 IL-15 或約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 500 IU/mL 的 IL-15 至約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 400 IU/mL 的 IL-15 至約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 300 IU/mL 的 IL-15 至約 100 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 200 IU/mL 的 IL-15。在一些實施例中，細胞培養基包含約 180 IU/mL 的 IL-15。在一實施例中，細胞培養基進一步包含 IL-15。在較佳實施例中，細胞培養基包含約 180 IU/mL 的 IL-15。

【0495】 在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 20 IU/mL 的 IL-21、約 15 IU/mL 的 IL-21、約 12 IU/mL 的 IL-21、約 10 IU/mL 的 IL-21、約 5 IU/mL 的 IL-21、約 4 IU/mL 的 IL-21、約 3 IU/mL 的 IL-21、約 2 IU/mL 的 IL-21、約 1 IU/mL 的 IL-21 或約 0.5 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 20 IU/mL 的 IL-21 至約 0.5 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 15 IU/mL 的 IL-21 至約 0.5 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，

第二擴增培養基包含約 12 IU/mL 的 IL-21 至約 0.5 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 10 IU/mL 的 IL-21 至約 0.5 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 5 IU/mL 的 IL-21 至約 1 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，第二擴增培養基包含約 2 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約 1 IU/mL 的 IL-21。在一些實施例中，細胞培養基包含約 0.5 IU/mL 的 IL-21。在一實施例中，細胞培養基進一步包含 IL-21。在較佳實施例中，細胞培養基包含約 1 IU/mL 的 IL-21。

【0496】在一些實施例中，抗原呈現餵養細胞 (APC) 係 PBMC。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中 TIL 對 PBMC 及/或抗原呈現細胞的比例係約 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。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中 TIL 對 PBMC 的比例係介於 1 至 50 及 1 至 300 之間。在一實施例中，在快速擴增及/或第二擴增中 TIL 對 PBMC 的比例係介於 1 至 100 及 1 至 200 之間。

【0497】在一實施例中，REP 及/或第二擴增係在培養瓶中執行，其中主體 TIL 與 100 或 200 倍過量的去活化餵養細胞、30 mg/mL OKT3 抗 CD3 抗體及 3000 IU/mL IL-2 在 150 ml 培養基中混合。置換培養基 (通常經由抽吸新鮮培養基置換 2/3 培養基) 直到細胞轉移至替代性生長室。替代

性生長室包括G-REX培養瓶及如以下更完整討論之氣體可通透容器。

【0498】在一些實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP過程的過程)縮短至7至14天，如實例及圖式中所討論。在一些實施例中，第二擴增縮短至11天。

【0499】在一實施例中，REP及/或第二擴增可使用T-175培養瓶及如先前描述之氣體可通透袋子(Tran, *et al.*, *J. Immunother*, **2008**, 31, 742-51 ; Dudley, *et al.*, *J. Immunother*, **2003**, 26, 332-42)或氣體可通透培養器皿(G-Rex培養瓶)執行。在一些實施例中，第二擴增(包括稱為快速擴增之擴增)係於T-175培養瓶中執行，且可將懸浮於150 mL的培養基中之約 1×10^6 個TIL添加至各T-175培養瓶中。TIL可培養於CM及AIM-V培養基的1比1混合物中，補充有每mL 3000 IU的IL-2及每ml 30 ng的抗CD3。T-175培養瓶可在37°C下在5% CO₂中培育。一半的培養基可在第5天使用含有每mL 3000 IU的IL-2之50/50培養基交換。在一些實施例中，在第7天可將來自二個T-175培養瓶的細胞組合於3 L袋子中並將300 mL含有5%人AB血清及每mL 3000 IU的IL-2之AIM V添加至300 ml的TIL懸浮液。各袋中的細胞數量每天或每二天計數一次，且添加新鮮培養基以保持細胞計數介於0.5與 2.0×10^6 個細胞/mL之間。

【0500】在一實施例中，第二擴增(其可包括稱為REP之擴增，以及該些於圖1步驟D中指稱者)可在500 mL容量的具有100 cm氣體可通透矽底之氣體可通透培養瓶(G-Rex

100，可購自 Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA)中執行， 5×10^6 或 10×10^6 TIL可與 PBMC在400 mL的補充有5%人AB血清、每mL 3000 IU的IL-2及每ml 30 ng的抗CD3(OKT3)之50/50培養基中培養。G-Rex 100培養瓶可在37°C下在5% CO₂中培育。在第5天，可將250 mL的上清液移除並放入離心瓶且在1500 rpm($491 \times g$)下離心10分鐘。可將TIL團塊用150 mL的含有5%人AB血清、每mL 3000 IU的IL-2之新鮮培養基再懸浮，並添加回原始G-Rex 100培養瓶。當TIL在G-Rex 100培養瓶中連續擴增時，在第7天可將各G-Rex 100中之TIL懸浮於存在於各培養瓶中之300 mL的培養基中，且可將細胞懸浮液分成可用於接種3個G-Rex 100培養瓶之3個100 mL等分試樣。接著可將150 mL之含有5%人AB血清及每mL 3000 IU的IL-2的AIM-V添加至各培養瓶。G-Rex 100培養瓶可在37°C下在5% CO₂中培育，且在4天之後可將150 mL之含有每mL 3000 IU的IL-2的AIM-V添加至各G-REX 100培養瓶。細胞可在培養的第14天收集。

【0501】在一實施例中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)係在培養瓶中執行，其中主體TIL與100或200倍過量的去活化餵養細胞、30 mg/mL OKT3抗CD3抗體及3000 IU/mL IL-2在150 ml培養基中混合。在一些實施例中，進行置換培養基直到細胞轉移至替代性生長室。在一些實施例中，藉由抽吸新鮮培養基置換掉2/3的培養基。在一些實施例中，替代性生長室包括G-REX培養瓶及如以下更完

整討論之氣體可通透容器。

【0502】在一實施例中，第二擴增(包括稱為REP之擴增)係經執行且進一步包含其中選擇具有優異腫瘤反應性之TIL的步驟。可使用任何所屬技術領域中已知之選擇方法。例如，美國專利申請公開案第2016/0010058 A1號(其揭露以引用方式併入本文中)所述之方法可用於選擇優異腫瘤反應性之TIL。

【0503】可選地，在第二擴增(包括稱為REP擴增之擴增)之後可使用所屬技術領域中已知之標準測定執行細胞存活性測定。例如，可在主體TIL的樣本上進行台盼藍排除測定，其選擇性標示死亡細胞且允許存活性評估。在一些實施例中，TIL樣本可使用Cellometer K2自動細胞計數器(Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA)計數及判定存活性。在一些實施例中，存活性係根據標準細胞計數器K2 Image Cytometer自動細胞計數器規程判定。

【0504】在一些實施例中，TIL之第二擴增(包括稱為REP之擴增)可使用如先前描述之T-175培養瓶及氣體可通透袋子(Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, *et al.*, 2008, *J Immunother.*, 31:742-751 及 Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, *et al.* 2003, *J Immunother.*, 26:332-342)或氣體可通透G-Rex培養瓶執行。在一些實施例中，第二擴增使用培養瓶執行。在一些實施例中，第二擴增使用氣體可通透G-Rex培養瓶執行。在一些實施例中，第二擴增係於T-175培養瓶中執行，且約 1×10^6 TIL懸浮於150 mL的培養

基中且將其添加至各 T-175 培養瓶中。將 TIL 與作為「餵養」細胞之經照射 (50 Gy) 的同種異體 PBMC 以 1 比 100 的比例培養，且將細胞培養於補充有 3000 IU/mL 的 IL-2 及 30 ng/mL 的抗 CD3 之 CM 與 AIM-V 培養基的 1 比 1 混合物 (50/50 培養基) 中。T-175 培養瓶在 37°C 下在 5% CO₂ 中培育。在一些實施例中，一半的培養基在第 5 天使用含有 3000 IU/mL 的 IL-2 之 50/50 培養基更換。在一些實施例中，在第 7 天將來自 2 個 T-175 培養瓶的細胞組合於 3 L 袋子中，並將 300 mL 含有 5% 人 AB 血清及 3000 IU/mL 的 IL-2 之 AIM-V 添加至 300 mL 的 TIL 懸浮液。各袋中的細胞數量可每天或每二天計數一次，且可添加新鮮培養基以保持細胞計數介於約 0.5 與約 2.0×10^6 個細胞/mL 之間。

【0505】在一些實施例中，第二擴增 (包括稱為 REP 之擴增) 在 500 mL 容量的具有 100 cm² 氣體可通透矽底之培養瓶 (G-Rex 100, Wilson Wolf) 中執行 (圖 1)，將約 5×10^6 或 10×10^6 個 TIL 與經輻照的異體 PBMC 以 1 至 100 的比例培養於 400 mL 的補充有 3000 IU/mL 的 IL-2 及 30 ng/mL 的抗 CD3 之 50/50 介質中。G-Rex 100 培養瓶在 37°C 下在 5% CO₂ 中培育。在一些實施例中，在第 5 天將 250 mL 的上清液移除並放入離心瓶且在 1500 rpm (491g) 下離心 10 分鐘。接著可將 TIL 團塊用 150 mL 的含有 3000 IU/mL 的 IL-2 之新鮮 50/50 培養基再懸浮，並添加回原始 G-Rex 100 培養瓶。在將 TIL 在 G-Rex 100 培養瓶中連續擴增的實施例中，在第 7 天將各 G-Rex 100 中之 TIL 懸浮於存在於各培養瓶中之 300 mL 的培養

基中，且將細胞懸浮液分成用於接種3個G-Rex 100培養瓶之三個100 mL等分試樣。接著將150 mL之含有5%人AB血清及3000 IU/mL的IL-2的AIM-V添加至各培養瓶。G-Rex 100培養瓶在37°C下在5% CO₂中培育，且在4天之後將150 mL之含有3000 IU/mL的IL-2的AIM-V添加至各G-Rex 100培養瓶。細胞在培養的第14天收集。

【0506】T及B淋巴細胞的多樣抗原受體係藉由有限但大量的基因區段的體細胞重組產生。這些基因區段：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)的結合特異性及下游應用。本發明提供產製展現及增加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，增加多樣性是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，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白重鏈中。在一些實施例中，多樣性存在免疫球蛋白中、存在免疫球蛋白輕鏈中。在一些實施例中，多樣性存在T細胞受體中。在一些實施例中，多樣性存在選自由 α 、 β 、 γ 及 δ 受體所組成之群組的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 的表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR) α 的表現增加。在一些實施例中，T細胞受體(TCR) β 的表現增加。在一些實施例中，TCRab(即TCR α/β)的表現增加。

【0507】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以及如以下更詳細討論之抗原呈現餵養細胞(APC)。

【0508】在一些實施例中，第二擴增(例如根據圖1之步驟D)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所述之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係例如G-REX-10或G-REX-100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

餵養細胞及抗原呈現細胞

【0509】在一實施例中，本文所述之第二擴增程序(例如包括諸如該些圖1步驟D所述以及該些稱為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餵養細胞。在許多實施例中，餵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係使用標準方法諸如Ficoll-Paque梯度分離獲得，見例如“Isolation of mononuclear cells: Methodology and Application”, GE Life Sciences technical publication 18-1152-69-AE，可見於https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/16286835/contents。

【0510】一般來說，同種異體PBMC係經由照射或熱處理去活化，且如實例所述用於REP程序，其提供用於評估照射同種異體PBMC的複製不能之例示性規程。

【0511】 在一些實施例中，如果第14天存活細胞總數小於在REP第0天及/或第二擴增第0天(即第二擴增的起始日)放入培養中的初始存活細胞數量，則認為PBMC是複製不能且接受其用於本文所述之TIL擴增程序。

【0512】 在一些實施例中，如果在OKT3及IL-2存在下培養第7天及第14天的存活細胞總數並未從在REP第0天及/或第二擴增第0天(即第二擴增的起始日)放入培養中的初始存活細胞數量增加，則認為PBMC是複製不能且接受其用於本文所述之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。

【0513】 在一些實施例中，如果在OKT3及IL-2存在下培養第7天及第14天的存活細胞總數並未從在REP第0天及/或第二擴增第0天(即第二擴增的起始日)放入培養中的初始存活細胞數量增加，則認為PBMC是複製不能且接受其用於本文所述之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。

【0514】 在一些實施例中，抗原呈現餵養細胞係PBMC。在一些實施例中，抗原呈現餵養細胞係人工抗原呈現餵養細胞。在一實施例中，在第二擴增中TIL對抗原

呈現餵養細胞的比例係約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。在一實施例中，在第二擴增中TIL對抗原呈現餵養細胞的比例係介於1至50及1至300之間。在一實施例中，在第二擴增中TIL對抗原呈現餵養細胞的比例係介於1至100及1至200之間。

【0515】在一實施例中，本文所述之第二擴增程序需要約 2.5×10^9 個餵養細胞對約 100×10^6 個TIL的比例。在另一實施例中，本文所述之第二擴增程序需要約 2.5×10^9 個餵養細胞對約 50×10^6 個TIL的比例。在又一實施例中，本文所述之第二擴增程序需要約 2.5×10^9 個餵養細胞對約 25×10^6 個TIL。

【0516】在一實施例中，本文所述之第二擴增程序在第二擴增期間需要過量的餵養細胞。在許多實施例中，餵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。在一實施例中，使用人工抗原呈現(aAPC)細胞代替PBMC。

【0517】一般來說，異體PBMC經由照射或熱處理去活化，且用於本文所述之TIL擴增程序，包括在圖式及實例中所述之例示性程序。

【0518】在一實施例中，在第二擴增中使用人工抗原呈現細胞來置換PBMC或與PBMC組合使用。

細胞介素

【0519】本文所述之TIL擴增方法通常使用具有高劑量細胞介素(特別是IL-2)的培養基，如所屬技術領域中所知。

【0520】替代地，使用細胞介素之組合以進行TIL的快速擴增及或第二擴增是額外可能的，如同大致上在國際專利公開號WO 2015/189356及W國際專利公開號WO 2015/189357中概述的二種或超過二種IL-2、IL-15及IL-21的組合，特此明白將全文以引用方式併入本文中。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、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淋巴細胞產製，且特別是如其中所述的T細胞。

步驟E：收集TIL

【0521】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所提供之一、二、三、四或更多個擴增步驟之後收集TIL。在一些實施例中，在例如圖1所提供之二個擴增步驟之後收集TIL。

【0522】TIL可以任何適當且無菌之方式收集，包括例如離心。收集TIL之方法係所屬技術領域中廣知的且本過程可採用任何該等已知之方法。在一些實施例中，使用自動化系統收集TIL。

【0523】細胞收集器及/或細胞處理系統可購自多個來源，包括例如 Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer及 Inotech Biosystems International, Inc.。本方法可採用任何基於細胞的收集器。在一些實施例中，細胞收集器及/或細胞處理系統是基於膜的細胞收集器。在一些實施例中，細胞收集是經由細胞處理系統諸如 LOVO 系統(由 Fresenius Kabi製造)進行。用語「LOVO細胞處理系統」亦指由任何供應商製造的任何可將包含細胞的溶液泵送通過無菌及/或密閉系統環境中的膜或過濾器諸如旋轉膜或旋轉過濾器的儀器或裝置，允許連續流動及細胞處理以在無需團塊化下移除上清液或細胞培養基。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執行細胞分離、洗滌、流體交換、濃縮及/或其他細胞處理步驟。

【0524】在一些實施例中，收集(例如根據圖1之步驟E)係於密閉系統生物反應器中執行。在一些實施例中，採用密閉系統進行如本文所述之 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係例如 G-REX -10或 G-REX -100。在一些實施例中，密閉系統生物反應器係單一生物反應器。

【0525】在一些實施例中，根據圖1之步驟E係根據實例7所述之過程執行。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由針筒進入以維持系統的無菌性及密閉特性。在一些實施例中，採用如實例7所述的密閉系統。

【0526】在一些實施例中，根據實例7所述之方法收集TIL。在一些實施例中，使用如本文所述之方法，收集介於第1天與第11天之間的TIL(在實例7中稱為第11天TIL收集)。在一些實施例中，使用如本文所述之方法，收集介於第12天與第22天之間的TIL(在實例7中稱為第22天TIL收集)。

步驟F：最終調配/轉移至輸注袋

【0527】在如圖1以例示性順序提供且如以上及本文詳細概述之步驟A至E完成之後，將細胞轉移至容器以用於投予至病患。在一些實施例中，一旦使用上述之擴增方法獲得治療足夠數量的TIL後，將彼等轉移至容器以用於投予至病患。

【0528】在一實施例中，使用本揭露之APC擴增之TIL係作為醫藥組成物投予至病患。在一實施例中，醫藥組成物係TIL於無菌緩衝劑中之懸浮液。本揭露之使用PBMC擴增之TIL可藉由所屬技術領域中已知之任何合適途徑投予。在一些實施例中，T細胞係作為單一動脈內或靜脈內輸注投予，其較佳地持續大約30至60分鐘。其他合適的投予途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴內。

抗CD3抗體作為可選的培養基組分

【0529】在一些實施例中，用於本文所述之擴增方法(包括該些稱為REP者，見例如圖1)中之培養基亦包括抗

CD3抗體。抗CD3抗體與IL-2之組合誘導TIL族群中之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；見例如Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.*, **1985**, 135, 1719，全文特此以引用方式併入本文中。

【0530】所屬技術領域中具有通常知識者將會理解，一些合適的抗人CD3抗體可用於本發明，包括來自各種哺乳動物的抗人CD3多株及單株抗體，包括但不限於鼠、人、靈長動物、大鼠及犬抗體。在具體實施例中，使用OKT3抗CD3抗體莫羅單抗(包括表1顯示之實施例)(可購自Ortho-McNeil, Raritan, NJ或Miltenyi Biotech, Auburn, CA)。抗CD3抗體亦包括UHCT1株，亦稱為T3及CD3 ϵ 。其他抗CD3抗體包括例如，奧昔珠單抗(otelixizumab)、替利珠單抗(teplizumab)及維西珠單抗(visilizumab)。

4-1BB(CD137)促效劑作為可選的培養基組分

【0531】在一實施例中，TNFRSF促效劑係4-1BB(CD137)促效劑。4-1BB促效劑可為任何所屬技術領域中已知之4-1BB結合分子。4-1BB結合分子可為能夠與人或哺乳動物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)、類型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞型的免疫球蛋白重鏈。4-1BB促效劑或4-1BB結合分子可具有重鏈及

輕鏈。如本文中所使用，用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、人化或嵌合抗體及抗體片段例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現庫產生的片段、任何上述者之表位結合片段、及抗體之經工程改造形式例如與4-1BB結合之scFv分子。在一實施例中，4-1BB促效劑係一種全人抗體的抗原結合蛋白質。在一實施例中，4-1BB促效劑係一種人化抗體的抗原結合蛋白質。在一些實施例中，用於本揭示方法及組成物中之4-1BB促效劑包括抗4-1BB抗體、人抗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黏連蛋白、抗4-1BB結構域抗體、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、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體、或生物類似物。已知促效性抗4-1BB抗體可誘導強烈免疫反應。Lee, *et al.*, *PLOS One*, **2013**, 8:e69677。在一較佳實施例中，4-1BB促效劑係促效性抗4-1BB人化或全人單株抗體(即衍生自單一細胞系之抗體)。在一實施例中，4-1BB促效劑係EU-101(Eutilex Co. Ltd.)、烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物。在較佳實施例中，4-1BB促效劑係烏圖木單抗或烏瑞魯單抗或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物。

【0532】 在一較佳實施例中，4-1BB促效劑或4-1BB

結合分子亦可為融合蛋白質。在一較佳實施例中，相較於一般擁有二個配體結合結構域的促效性單株抗體而言，多聚體 4-1BB 促效劑諸如三聚體或六聚體 4-1BB 促效劑(具有三個或六個配體結合結構域)可誘導優異的受體(4-1BBL)叢聚及內部細胞性傳訊複合物形成。包含三個 TNFRSF 結合結構域及 IgG1-Fc 且可選地進一步連接二或更多個這些融合蛋白質的三聚體(三價)或六聚體(或六價)或更大融合蛋白質係描述於例如 Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics*, **2013**, 12:2735-47 中。

【0533】已知促效性 4-1BB 抗體及融合蛋白質可誘導強烈免疫反應。在一較佳實施例中，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 促效劑係廢除抗體依賴性細胞毒性(ADCC)例如 NK 細胞細胞毒性之促效性 4-1BB 單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，4-1BB 促效劑係廢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 促效劑係廢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 促效劑係廢除 Fc 區功能性之促效性 4-1BB 單株抗體或融合蛋白質。

【0534】在一些實施例中，4-1BB 促效劑係由以高親和性及促效性活性與人 4-1BB(SEQ ID NO:9)結合來表徵。在一實施例中，4-1BB 促效劑係與人 4-1BB(SEQ ID NO:9)結合之結合分子。在一實施例中，4-1BB 促效劑係與鼠 4-

1BB(SEQ ID NO:10)結合之結合分子。4-1BB促效劑或結合分子所結合之4-1BB抗原的胺基酸序列係總結於表3中。

表 3. 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:9 人 4-1BB, 腫瘤壞死因子 受體超家族成 員9(智人(Homo sapiens)) | MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWYNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEEE GGCEL 255 |
| SEQ ID NO:10 鼠 4-1BB, 腫瘤壞死因子受 體超家族成員9 (家鼯鼠(Mus musculus)) | MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSS HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTENDQNGT GVCRPWYNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTFL LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256 |

【 0535 】 在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約 100 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 90 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 80 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 70 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 60 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 50 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB、以約 40 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB 或以約 30 pM 或較低之 K_D 結合人或鼠 4-1BB 之 4-1BB 促效劑。

【 0536 】 在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約 7.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 7.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 8×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 8.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約 9×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 4-1BB 結合、以約

9.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠4-1BB結合或以約 1×10^6 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠4-1BB結合之4-1BB促效劑。

【0537】在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約 2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.1×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.4×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.5×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.6×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合或以約 2.7×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.8×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合、以約 2.9×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合或以約 3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠4-1BB結合之4-1BB促效劑。

【0538】在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約10 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約9 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約8 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約7 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約6 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約5 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約4 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約3 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合、以約2 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合或以約1 nM或較低之 IC_{50} 與人或鼠4-1BB結合之

4-1BB 促效劑。

【0539】在較佳實施例中，4-1BB 促效劑係烏圖木單抗(亦稱為 PF-05082566 或 MOR-7480)或其片段、衍生物、變體或生物類似物。烏圖木單抗可得自 Pfizer, Inc.。烏圖木單抗係免疫球蛋白 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(全人)單株抗體。烏圖木單抗之胺基酸序列係如表 4 所示。烏圖木單抗包含位於 Asn59 及 Asn292 之糖基化位點；位於位置 22-96(V_H - V_L)、143-199(C_H1 - C_L)、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 - C_L)之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於 IgG2A 異構體位置 218-218、219-219、222-222 及 225-225、位於 IgG2A/B 異構體位置 218-130、219-219、222-222 及 225-225、及位於 IgG2B 異構體位置 219-130(2)、222-222 及 225-225 之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於 IgG2A 異構體位置 130-213'(2)、IgG2A/B 異構體位置 218-213' 及 130-213' 及位於 IgG2B 異構體位置 218-213'(2)之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。烏圖木單抗及其變體及片段之製備及特性係描述於美國專利第 8,821,867、8,337,850 及 9,468,678 號及國際專利申請公開案 WO 2012/032433 A1，彼等各者之揭露以引用方式併入本文中。烏圖木單抗之臨床前特徵係描述於 Fisher, *et al.*, *Cancer Immunolog. & Immunother.*, **2012**, 61:1721-33。目前烏圖木單抗在多種血液及實性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。

【0540】在一實施例中，4-1BB 促效劑包含由 SEQ ID NO:11 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:12 給出之輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含分別具有 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab 片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 所示序列具有至少 99% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 所示序列具有至少 98% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 所示序列具有至少 97% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 所示序列具有至少 96% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:11 及 SEQ ID NO:12 所示序列具有至少 95% 一致性之重鏈及輕鏈。

【0541】在一實施例中，4-1BB 促效劑包含烏圖木單抗之重鏈及輕鏈 CDR 或可變區(VR)。在一實施例中，4-1BB 促效劑重鏈可變區(V_H)包含 SEQ ID NO:13 所示之序列且 4-1BB 促效劑輕鏈可變區(V_L)包含 SEQ ID NO:14 所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:13 及 SEQ ID NO:14 所

示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自與SEQ ID NO:13及SEQ ID NO:14所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。

【0542】在一實施例中，4-1BB促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16及SEQ ID NO:17所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19及SEQ ID NO:20所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0543】在一實施例中，4-1BB促效劑係藥物管理機構參照烏圖木單抗所核准的4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係烏圖木單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中該4-1BB促效劑抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係烏圖木單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國FDA及/或歐盟的EMA授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係烏圖木單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係烏圖木單抗。

表 4. 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:11 烏圖木單抗重鏈 | EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN SPSFQGGVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G | 60 120 180 240 300 360 420 441 |
| SEQ ID NO:12 烏圖木單抗輕鏈 | 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:13 烏圖木單抗重鏈 可變區 | EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN YSPSFQGGVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS | 60 118 |
| SEQ ID NO:14 烏圖木單抗輕鏈 可變區 | SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL | 60 108 |
| SEQ ID NO:15 烏圖木單抗重鏈 CDR1 | STYWIS | 6 |
| SEQ ID NO:16 烏圖木單抗重鏈 CDR2 | KIYPGDSYTN YSPSFQG | 17 |
| SEQ ID NO:17 烏圖木單抗重鏈 CDR3 | RGYGIFDY | 8 |
| SEQ ID NO:18 烏圖木單抗輕鏈 CDR1 | SGDNIGDQYA H | 11 |
| SEQ ID NO:19 烏圖木單抗輕鏈 CDR2 | QDKNRPS | 7 |
| SEQ ID NO:20 烏圖木單抗輕鏈 CDR3 | ATYTGFGSLA V | 11 |

【0544】在較佳實施例中，4-1BB促效劑係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、變體或生物類似物。烏瑞魯單抗可得自Bristol-Myers Squibb, Inc.及Creative Biolabs, Inc.。烏瑞魯單抗係免疫球蛋白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(全人)單株抗體。烏瑞魯單抗之胺基酸序列係如表5所示。烏瑞魯單抗包含位於位置298(及298”)之N-糖基化位點；位於位置22-95(V_H-V_L)、148-204(C_H1-C_L)、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-C_L)(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。烏瑞魯單抗及其變體及片段之製備及特性係描述於美國專利第 7,288,638 及 8,962,804 號，彼等揭露以引用方式併入本文中。烏瑞魯單抗之臨床前及臨床特徵係描述於 Segal, *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2016**，可見於 <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性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 NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992 及 NCT01471210。

【0545】在一實施例中，4-1BB 促效劑包含由 SEQ ID NO:21 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:22 給出之輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含分別具有 SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:22 所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab 片段、單鏈可變片段 (scFv)、變體或接合物。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:22 所示序列具有至少 99% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:21 及 SEQ ID NO:22 所示序列具有至少 98% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB 促效劑包含各自分別與

SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:21及SEQ ID NO:22所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0546】在一實施例中，4-1BB促效劑包含烏瑞魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，4-1BB促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:23所示之序列且4-1BB促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:24所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，4-1BB促效劑包含scFv抗體，該scFv抗體包含各自與SEQ ID NO:23及SEQ ID NO:24所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。

【0547】在一實施例中，4-1BB促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26及SEQ ID NO:27所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29及SEQ ID NO:30所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0548】在一實施例中，4-1BB促效劑係藥物管理機構參照烏瑞魯單抗所核准的4-1BB促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係烏瑞魯單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之4-1BB促效劑抗體，其中該4-1BB促效劑抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係烏瑞魯單抗。4-1BB促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國FDA及/或歐盟的EMA授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係烏瑞魯單

抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係烏瑞魯單抗。

表 5. 與烏瑞魯單抗相關之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:21 烏瑞魯單抗重鏈 | QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSV TVPSSSLGK TYTCNVDHK SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK | 60 120 180 240 300 360 420 448 |
| SEQ ID NO:22 烏瑞魯單抗 輕鏈 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC | 60 120 180 216 |
| SEQ ID NO:23 烏瑞魯單抗 可變重鏈 | MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP | 60 120 |
| SEQ ID NO:24 烏瑞魯單抗 可變輕鏈 | MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ | 60 110 |
| SEQ ID NO:25 烏瑞魯單抗重鏈 CDR1 | GYWS | 5 |
| SEQ ID NO:26 烏瑞魯單抗重鏈 CDR2 | EINHGGYVTY NPSLES | 16 |
| SEQ ID NO:27 烏瑞魯單抗重鏈 CDR3 | DYGPNGYDWY FDL | 13 |
| SEQ ID NO:28 烏瑞魯單抗輕鏈 CDR1 | RASQSVSSYL A | 11 |
| SEQ ID NO:29 烏瑞魯單抗輕鏈 CDR2 | DASNRAT | 7 |
| SEQ ID NO:30 烏瑞魯單抗輕鏈 CDR3 | QQRSDWPPAL T | 11 |

【0549】在一實施例中，4-1BB促效劑係選自由下列所組成之群組：1D8、3E1or、4B4(BioLegend 309809)、H4-1BB-M127(BD Pharmingen 552532)、BBK2(Thermo Fisher MS621PABX)、145501(Leinco Technologies B591)、由寄存編號 ATCC No. HB-11248之細胞系產生且

揭示於美國專利第6,974,863號之抗體、5F4(BioLegend 311503)、C65-485(BD Pharmingen 559446)、揭示於美國專利申請公開案第US 2005/0095244號之抗體、揭示於美國專利第7,288,638號之抗體(諸如20H4.9-IgG1(BMS-663031))、揭示於美國專利第6,887,673號之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、揭示於美國專利第7,214,493號之抗體、揭示於美國專利第6,303,121號之抗體、揭示於美國專利第6,569,997號之抗體、揭示於美國專利第6,905,685號之抗體(諸如4E9或BMS-554271)、揭示於美國專利第6,362,325號之抗體(諸如1D8或BMS-469492; 3H3或BMS-469497; 或3E1)、揭示於美國專利第6,974,863號之抗體(諸如53A2); 揭示於美國專利第6,210,669號之抗體(諸如1D8、3B8或3E1)、描述於美國專利第5,928,893號之抗體、揭示於美國專利第6,303,121號之抗體、揭示於美國專利第6,569,997號之抗體、揭示於國際專利申請公開案WO 2012/177788、WO 2015/119923及WO 2010/042433之抗體、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物,其中前述專利或專利申請公開案各者之揭露以引用方式併入本文中。

【0550】在一實施例中,4-1BB促效劑係國際專利申請公開案號WO 2008/025516 A1、WO 2009/007120 A1、WO 2010/003766 A1、WO 2010/010051 A1及WO 2010/078966 A1;美國專利申請公開案號US 2011/0027218 A1、US 2015/0126709 A1、US 2011/0111494 A1、US

2015/0110734 A1及US 2015/0126710 A1；及美國專利第9,359,420、9,340,599、8,921,519及8,450,460號所述之4-1BB促效性融合蛋白質，彼等揭露以引用方式併入本文中。

【0551】在一實施例中，4-1BB促效劑係如圖25之結構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)所描繪之4-1BB促效性融合蛋白質、或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物：

如圖25之結構I-A及I-B所示，圓柱體係指個別多肽結合結構域。結構I-A及I-B包含三個線性連接的衍生自例如4-1BBL或結合4-1BB之抗體的TNFRSF結合結構域，該TNFRSF結合結構域摺疊以形成三價蛋白質，該三價蛋白質接著與第二三價蛋白質經由IgG1-Fc(包括C_H3及C_H2結構域)連接，且該IgG1-Fc接著用於經由雙硫鍵(小長橢圓形)將二個三價蛋白質連接在一起，藉以穩定結構且提供能夠將六個受體的細胞內傳訊結構域與傳訊蛋白質集合在一起以形成傳訊複合物的促效劑。表示為圓柱體的TNFRSF結合結構域可為scFv結構域，其包含例如由連接子連接的V_H及V_L鏈，該連接子可包含親水性殘基及提供柔軟度的Gly及Ser序列以及提供溶解度的Glu及Lys。可使用任何scFv結構域設計，諸如該些描述於de Marco, *Microbial Cell Factories*, **2011**, 10, 44；Ahmad, *et al.*, *Clin. & Dev. Immunol.*, **2012**, 980250；Monnier, *et al.*, *Antibodies*, **2013**, 2, 193-208；或在本文中他處參照併入者。此形式的

融合蛋白質結構係描述於美國專利第 9,359,420、9,340,599、8,921,519 及 8,450,460 號，彼等揭露以引用方式併入本文中。

【0552】結構 I-A 之其他多肽結構域之胺基酸序列係在表 6 中給出。Fc 結構域較佳地包含完整恆定結構域 (SEQ ID NO:31 之胺基酸 17 至 230)、完整絞鏈結構域 (SEQ ID NO:31 之胺基酸 1 至 16) 或絞鏈結構域之一部分 (例如 SEQ ID NO:31 之胺基酸 4 至 16)。用於連接 C 端 Fc 抗體之較佳連接子可選自 SEQ ID NO:32 至 SEQ ID NO:41 給出之實施例，包括適用於融合額外多肽之連接子。

表 6. TNFRSF 融合蛋白質之胺基酸序列，包括 4-1BB 融合蛋白質，具有 C 端 Fc-抗體片段融合蛋白質設計 (結構 I-A)。

| 識別號 | 序列(單字母胺基酸符號) | |
|------------------------|---|-------------------------|
| SEQ ID NO:31 Fc 結構域 | KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSGDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK | 60 120 180 230 |
| SEQ ID NO:32 連接子 | GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE | 22 |
| SEQ ID NO:33 連接子 | GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE | 22 |
| SEQ ID NO:34 連接子 | GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE | 27 |
| SEQ ID NO:35 連接子 | GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE | 27 |
| SEQ ID NO:36 連接子 | GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE | 29 |
| SEQ ID NO:37 連接子 | GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE | 29 |
| SEQ ID NO:38 連接子 | GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE | 24 |
| SEQ ID NO:39 連接子 | GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE | 23 |
| SEQ ID NO:40 連接子 | GGPSSSGSDK THTCPPCPA P E | 21 |
| SEQ ID NO:41 連接子 | GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE | 25 |

【0553】結構 I-B 之其他多肽結構域之胺基酸序列係在表 7 中給出。如果 Fc 抗體片段如結構 I-B 中融合至

TNFRSF融合蛋白質的N端，則Fc模組的序列較佳地顯示於SEQ ID NO:42，且連接子序列較佳地選自如SEQ ID NO:43至SEQ ID NO:45所示之該些實施例。

表 7. TNFRSF融合蛋白質之胺基酸序列，包括4-1BB融合蛋白質，具有N端Fc-抗體片段融合蛋白質設計(結構I-B)。

| 識別號 | 序列(單字母胺基酸符號) | |
|------------------------|--|--------------------------------|
| SEQ ID NO:42 Fc 結構域 | METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG | 60 120 180 240 246 |
| SEQ ID NO:43 連接子 | SGSGSGSGSG S | 11 |
| SEQ ID NO:44 連接子 | SSSSSSGSGS GS | 12 |
| SEQ ID NO:45 連接子 | SSSSSSGSGS GSGSGS | 16 |

【0554】在一實施例中，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下列所組成之群組的4-1BB結合結構域：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4或表5所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、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體及生物類似物。

【0555】在一實施例中，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結合結構域，該4-1BB結合結構域包含4-1BBL序列。在一實施例中，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結合結構域，該4-1BB結合結構域包含根據SEQ ID NO:46

之序列。在一實施例中，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 結合結構域，該 4-1BB 結合結構域包含可溶性 4-1BBL 序列。在一實施例中，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 結合結構域，該 4-1BB 結合結構域包含根據 SEQ ID NO:47 之序列。

【0556】在一實施例中，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 結合結構域，該 4-1BB 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:13 及 SEQ ID NO:14 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 4-1BB 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:23 及 SEQ ID NO:24 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 4-1BB 結合結構域係包含各自與表 8 給出之 V_H 及 V_L 序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。

表 8. 可用來作為融合蛋白質或scFv 4-1BB促效劑抗體中之4-1BB結合結構域之額外多肽結構域。

| 識別號 | 序列(單字母胺基酸符號) |
|-------------------------------------|--|
| SEQ ID NO:46 4-1BBL | MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254 |
| SEQ ID NO:47 4-1BBL 可溶性結構域 | LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDL PASEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168 |
| SEQ ID NO:48 4B4-1-1版本1之 可變重鏈 | QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118 |
| SEQ ID NO:49 4B4-1-1版本1之 可變輕鏈 | DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107 |
| SEQ ID NO:50 4B4-1-1版本2之 可變重鏈 | QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119 |
| SEQ ID NO:51 4B4-1-1版本2之 可變輕鏈 | DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108 |
| SEQ ID NO:52 H39E3-2 可變重鏈 | MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTYA PSLTNRFTIS RDNANKSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120 |
| SEQ ID NO:53 H39E3-2 可變輕鏈 | MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110 |

【0557】在一實施例中，4-1BB促效劑係4-1BB促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性4-1BB結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性4-1BB結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，且其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域。在一實施例中，4-1BB促效劑係4-1BB促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性4-1BB結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性4-1BB結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性4-1BB結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域，其中該可

溶性4-1BB結構域之各者缺乏莖區域(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某些距離，但不是4-1BB結合結構域的一部分)且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度。

【0558】在一實施例中，4-1BB促效劑係4-1BB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)超家族細胞介素結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素結構域，其中可溶性TNF超家族細胞介素結構域之各者缺乏莖區域且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度，且其中各TNF超家族細胞介素結構域係4-1BB結合結構域。

【0559】在一實施例中，4-1BB促效劑係4-1BB促效性scFv抗體，其包含任何前述者之V_H結構域連接至任何前述者之V_L結構域。

【0560】在一實施例中，4-1BB促效劑係BPS Bioscience的4-1BB促效劑抗體(產品編號79097-2，可購自BPS Bioscience, San Diego, CA, USA)。在一實施例中，4-1BB促效劑係Creative Biolabs的4-1BB促效劑抗體(產品編號MOM-18179，可購自Creative Biolabs, Shirley, NY, USA)。

OX40(CD134)促效劑作為可選的培養基組分

【0561】在一實施例中，TNFRSF促效劑係OX40

(CD134)促效劑。OX40促效劑可為任何所屬技術領域中已知之OX40結合分子。OX40結合分子可為能夠與人或哺乳動物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)、類型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞型的免疫球蛋白重鏈。OX40促效劑或OX40結合分子可具有重鏈及輕鏈。如本文中所使用，用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、人化或嵌合抗體及抗體片段例如Fab片段、F(ab')片段、由Fab表現庫產生的片段、任何上述者之表位結合片段、及抗體之經工程改造形式例如與OX40結合之scFv分子。在一實施例中，OX40促效劑係一種全人抗體的抗原結合蛋白質。在一實施例中，OX40促效劑係一種人化抗體的抗原結合蛋白質。在一些實施例中，用於本揭示方法及組成物中之OX40促效劑包括抗OX40抗體、人抗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黏連蛋白、抗OX40結構域抗體、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、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體、或生物類似物。在一較佳實施例中，OX40促效劑係促效性抗OX40人化或全人單株抗體(即衍生自單一細胞系之抗體)。

【0562】在一較佳實施例中，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結構域的OX40融合蛋白質係描述於例如 Sadun, *et al.*, *J. Immunother.*, **2009**, 182, 1481-89。在一較佳實施例中，相較於一般擁有二個配體結合結構域的促效性單株抗體而言，多聚體OX40促效劑諸如三聚體或六聚體OX40促效劑(具有三個或六個配體結合結構域)可誘導優異的受體(OX40L)叢聚及內部細胞性傳訊複合物形成。包含三個TNFRSF結合結構域及IgG1-Fc且可選地進一步連接二或更多個這些融合蛋白質的三聚體(三價)或六聚體(或六價)或更大融合蛋白質係描述於例如 Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics*, **2013**, 12, 2735-47中。

【0563】已知促效性OX40抗體及融合蛋白質可誘導強烈免疫反應。Curti, *et al.*, *Cancer Res.*, **2013**, 73, 7189-98。在一較佳實施例中，OX40促效劑係以足以減少毒性之方式與OX40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，OX40促效劑係廢除抗體依賴性細胞性毒性(ADCC)例如NK細胞細胞毒性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。在一些實施例中，OX40促效劑係廢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促效劑係廢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促效劑係廢除Fc區功能性之促效性OX40單株抗體或融合蛋白質。

【0564】在一些實施例中，OX40促效劑係由以高親和性及促效性活性與人OX40(SEQ ID NO:54)結合來表徵。在一實施例中，OX40促效劑係與人OX40(SEQ ID NO:54)結合之結合分子。在一實施例中，OX40促效劑係與鼠OX40(SEQ ID NO:55)結合之結合分子。OX40促效劑或結合分子所結合之OX40抗原的胺基酸序列係總結於表9中。

表9. 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:54 人OX40 (智人 (Homo sapiens)) | MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ | 60 |
| | NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK | 120 |
| | PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQFASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ | 180 |
| | GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL | 240 |
| | RRDQRLPPDA HKPPGGGSEF TPIQEEQADA HSTLAKI | 277 |
| SEQ ID NO:55 鼠OX40 (家鼯鼠 (Mus musculus)) | MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSTGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC | 60 |
| | HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG | 120 |
| | VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLI ATLLWETQRP | 180 |
| | TERPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPPEG PAFVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW | 240 |
| | RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI | 272 |

【0565】在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約100 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約90 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約80 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約70 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約60 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約50 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40、以約40 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40或以約30 pM或較低之 K_D 結合人或鼠OX40之OX40促效劑。

【0566】在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約 7.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠OX40結

合、以約 7.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 8×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 8.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 9×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 9.5×10^5 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 OX40 結合或以約 1×10^6 1/M·s 或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人或鼠 OX40 結合之 OX40 促效劑。

【0567】在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約 2×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.1×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.2×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.3×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.4×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.5×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.6×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合或以約 2.7×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.8×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合、以約 2.9×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合或以約 3×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人或鼠 OX40 結合之 OX40 促效劑。

【0568】在一些實施例中，所述之組成物、過程及方法包括以約 10 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 9 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 8 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 7 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 6 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 5 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 4 nM 或

較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 3 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合、以約 2 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合或以約 1 nM 或較低之 IC_{50} 與人或鼠 OX40 結合之 OX40 促效劑。

【0569】在一些實施例中，OX40 促效劑係塔伏利西單抗，亦稱為 MEDI0562 或 MEDI-0562。塔伏利西單抗可得自 AstraZeneca, Inc. 的子公司 MedImmune。塔伏利西單抗係免疫球蛋白 G1- κ 抗[智人 TNFRSF4(腫瘤壞死因子受體(TNFR)超家族成員 4，OX40，CD134)]人化及嵌合單株抗體。塔伏利西單抗之胺基酸序列係如表 10 所示。塔伏利西單抗包含位於位置 301 及 301'' 之 N-糖基化位點，附接岩藻糖基化複合物雙觸角 CHO 型聚糖；位於位置 22-95(V_H - V_L)、148-204(C_H1 -CL)、265-325(C_H2)及 371-429(C_H3)(及位於位置 22''-95''、148''-204''、265''-325''及 371''-429'')之重鏈鏈內雙硫鍵；位於位置 23'-88'(V_H - V_L)及 134'-194'(C_H1 - C_L)(及位於位置 23'''-88'''及 134'''-194''')之輕鏈鏈內雙硫鍵；位於位置 230-230''及 233-233''之鏈間重鏈-重鏈雙硫鍵；及位於 224-214'及 224''-214'''之鏈間重鏈-輕鏈雙硫鍵。目前塔伏利西單抗在多種實性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 NCT02318394 及 NCT02705482。

【0570】在一實施例中，OX40 促效劑包含由 SEQ ID NO:56 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:57 給出之輕鏈。在一實施例中，OX40 促效劑包含分別具有 SEQ ID NO:56 及 SEQ

ID NO:57所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:56及SEQ ID NO:57所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0571】在一實施例中，OX40促效劑包含塔伏利西單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:58所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:59所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:58及SEQ ID NO:59所示序列具有至少97%一致性之V_H

及 V_L 區。在一實施例中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:58 及 SEQ ID NO:59 所示序列具有至少 96% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:58 及 SEQ ID NO:59 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，OX40 促效劑包含 scFv 抗體，該 scFv 抗體包含各自與 SEQ ID NO:58 及 SEQ ID NO:59 所示序列具有至少 99% 一致性之 V_H 及 V_L 區。

【0572】在一實施例中，OX40 促效劑包含具有分別如 SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61 及 SEQ ID NO:62 所示之序列的重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如 SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64 及 SEQ ID NO:65 所示之序列的輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0573】在一實施例中，OX40 促效劑係藥物管理機構參照塔伏利西單抗所核准的 OX40 促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係塔伏利西單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之 OX40 促效劑抗體，其中該 OX40 促效劑

抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係塔伏利西單抗。OX40 促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及 / 或 歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係塔伏利西單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係塔伏利西單抗。

表 10. 與塔伏利西單抗相關之OX40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:56 塔伏利西單抗重鏈 | QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEIYIGY ISYNGITYHN PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K | 60 120 180 240 300 360 420 451 |
| SEQ ID NO:57 塔伏利西單抗輕鏈 | DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVEIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKDT STYSLSSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK | 60 120 180 214 |
| SEQ ID NO:58 塔伏利西單抗重鏈 可變區 | QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEIYIGY ISYNGITYHN PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGLVTVS | 60 118 |
| SEQ ID NO:59 塔伏利西單抗輕鏈 可變區 | DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR | 60 108 |
| SEQ ID NO:60 塔伏利西單抗重鏈 CDR1 | GSFSSGYWN | 9 |
| SEQ ID NO:61 塔伏利西單抗重鏈 CDR2 | YIGYISYNGI TYH | 13 |
| SEQ ID NO:62 塔伏利西單抗重鏈 CDR3 | RYKYDYDGGH AMDY | 14 |
| SEQ ID NO:63 塔伏利西單抗輕鏈 CDR1 | QDISNYLN | 8 |
| SEQ ID NO:64 塔伏利西單抗輕鏈 CDR2 | LLIYYTSKLN S | 11 |
| SEQ ID NO:65 塔伏利西單抗輕鏈 CDR3 | QQGSALPW | 8 |

【0574】在一些實施例中，OX40促效劑係11D4，其係可得自Pfizer, Inc.的全人抗體。11D4之製備及特性係描述於美國專利第7,960,515、8,236,930及9,028,824號，彼等揭露以引用方式併入本文中。11D4之胺基酸序列係如表11所示。

【0575】在一實施例中，OX40促效劑包含由SEQ ID NO:66給出之重鏈及由SEQ ID NO:67給出之輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一

實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:66及SEQ ID NO:67所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0576】在一實施例中，OX40促效劑包含11D4之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:68所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:69所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。

在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:68及SEQ ID NO:69所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0577】在一實施例中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71及SEQ ID NO:72所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74及SEQ ID NO:75所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0578】在一實施例中，OX40促效劑係藥物管理機構參照11D4所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係11D4。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之OX40促效劑抗體，其中該OX40促效劑抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係11D4。OX40促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國FDA及/或歐盟的EMA授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一

或多種賦形劑之組成物，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係 11D4。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 11D4。

表 11. 與11D4相關之OX40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:66 11D4重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTKVERK CVECPCPAP 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:67 11D4輕鏈 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN | 60 120 180 214 |
| SEQ ID NO:68 11D4重鏈可變區 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS | 60 118 |
| SEQ ID NO:69 11D4輕鏈可變區 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK | 60 107 |
| SEQ ID NO:70 11D4重鏈CDR1 | SYSMN | 5 |
| SEQ ID NO:71 11D4重鏈CDR2 | YISSSSSTID YADSVKG | 17 |
| SEQ ID NO:72 11D4重鏈CDR3 | ESGWYLFDY | 9 |
| SEQ ID NO:73 11D4輕鏈CDR1 | RASQGISSWL A | 11 |
| SEQ ID NO:74 11D4輕鏈CDR2 | AASSLQS | 7 |
| SEQ ID NO:75 11D4輕鏈CDR3 | QQYNSYPPT | 9 |

【0579】在一些實施例中，OX40促效劑係 18D8，其係可得自 Pfizer, Inc.的全人抗體。18D8之製備及特性係描

述於美國專利第7,960,515、8,236,930及9,028,824號，彼等揭露以引用方式併入本文中。18D8之胺基酸序列係如表12所示。

【0580】在一實施例中，OX40促效劑包含由SEQ ID NO:76給出之重鏈及由SEQ ID NO:77給出之輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含分別具有SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:76及SEQ ID NO:77所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0581】在一實施例中，OX40促效劑包含18D8之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:78所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:79所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包

含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:78及SEQ ID NO:79所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0582】在一實施例中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81及SEQ ID NO:82所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84及SEQ ID NO:85所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0583】在一實施例中，OX40促效劑係藥物管理機構參照18D8所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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

考生物產品係 18D8。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之 OX40 促效劑抗體，其中該 OX40 促效劑抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係 18D8。OX40 促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及 / 或歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 18D8。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 18D8。

表 12. 與18D8相關之OX40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:76 18D8重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLV SVVTVPSNF GTQYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSD HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSIVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK | 60 120 180 240 300 360 420 450 |
| SEQ ID NO:77 18D8輕鏈 | EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNRFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC | 60 120 180 213 |
| SEQ ID NO:78 18D8重鏈可變區 | EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS | 60 120 124 |
| SEQ ID NO:79 18D8輕鏈可變區 | EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK | 60 106 |
| SEQ ID NO:80 18D8重鏈CDR1 | DYAMH | 5 |
| SEQ ID NO:81 18D8重鏈CDR2 | GISWNSGSIG YADSVKG | 17 |
| SEQ ID NO:82 18D8重鏈CDR3 | DQSTADYYFY YGMDV | 15 |
| SEQ ID NO:83 18D8輕鏈CDR1 | RASQSVSSYL A | 11 |
| SEQ ID NO:84 18D8輕鏈CDR2 | DASNRAT | 7 |
| SEQ ID NO:85 18D8輕鏈CDR3 | QQRSNWPT | 8 |

【0584】 在一些實施例中，OX40促效劑係Hu119-122，其係可得自GlaxoSmithKline plc.的人化抗體。Hu119-122之製備及特性係描述於美國專利第9,006,399及9,163,085號及國際專利公開號WO 2012/027328號，彼等揭露以引用方式併入本文中。Hu119-122之胺基酸序列係如表13所示。

【0585】 在一實施例中，OX40促效劑包含Hu119-122之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，OX40促效劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:86所示之序列且OX40促效劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:87所示之序

列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，OX40促效劑包含各自分別與SEQ ID NO:86及SEQ ID NO:87所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0586】在一實施例中，OX40促效劑包含具有分別如SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:92及SEQ ID NO:93所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0587】在一實施例中，OX40促效劑係藥物管理機構參照Hu119-122所核准的OX40促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係 Hu119-122。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之 OX40 促效劑抗體，其中該 OX40 促效劑抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係 Hu119-122。OX40 促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及 / 或歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 Hu119-122。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 Hu119-122。

表 13. 與Hu119-122相關之OX40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:86 Hu119-122 重鏈可變區 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS 120 |
| SEQ ID NO:87 Hu119-122 輕鏈可變區 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QOKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111 |
| SEQ ID NO:88 Hu119-122 重鏈CDR1 | SHDMS 5 |
| SEQ ID NO:89 Hu119-122 重鏈CDR2 | AINSDGGSTY YPDTMER 17 |
| SEQ ID NO:90 Hu119-122 重鏈CDR3 | HYDDYYAWFA Y 11 |
| SEQ ID NO:91 Hu119-122 輕鏈CDR1 | RASKSVSTSG YSYMH 15 |
| SEQ ID NO:92 Hu119-122 輕鏈CDR2 | LASNLES 7 |
| SEQ ID NO:93 Hu119-122 輕鏈CDR3 | QHSRELPLT 9 |

【 0588 】 在一些實施例中， OX40促效劑係 Hu106-222， 其係可得自 GlaxoSmithKline plc. 的人化抗體。 Hu106-222之製備及特性係描述於美國專利第 9,006,399 及 9,163,085 號及國際專利公開號 WO 2012/027328 號， 彼等揭露以引用方式併入本文中。 Hu106-222之胺基酸序列係如表 14 所示。

【 0589 】 在一實施例中， OX40促效劑包含 Hu106-222 之重鏈及輕鏈 CDR 或可變區 (VR)。 在一實施例中， OX40 促效劑重鏈可變區 (V_H) 包含 SEQ ID NO:94 所示之序列且 OX40 促效劑輕鏈可變區 (V_L) 包含 SEQ ID NO:95 所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。 在一實施例中， OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 99% 一致性之 V_H 及 V_L 區。 在一實施例中，

OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 98% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 97% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 96% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，OX40 促效劑包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區。

【0590】在一實施例中，OX40 促效劑包含具有分別如 SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:97 及 SEQ ID NO:98 所示之序列的重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如 SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:100 及 SEQ ID NO:101 所示之序列的輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代。

【0591】在一實施例中，OX40 促效劑係藥物管理機構參照 Hu106-222 所核准的 OX40 促效劑生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係 Hu106-222。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：糖基化、氧化、

脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之 OX40 促效劑抗體，其中該 OX40 促效劑抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係 Hu106-222。OX40 促效劑抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及 / 或歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 Hu106-222。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係 Hu106-222。

表 14. 與 Hu106-222 相關之 OX40 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:94 Hu106-222 重鏈可變區 | QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTTVTV SS | 60 120 122 |
| SEQ ID NO:95 Hu106-222 輕鏈可變區 | DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCKASQDVS TAVAWYQQKPK GAKPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK | 60 107 |
| SEQ ID NO:96 Hu106-222 重鏈CDR1 | DYSMH | 5 |
| SEQ ID NO:97 Hu106-222 重鏈CDR2 | WINTETGEPT YADDFKG | 17 |
| SEQ ID NO:98 Hu106-222 重鏈CDR3 | PYYDYVSYA MDY | 13 |
| SEQ ID NO:99 Hu106-222 輕鏈CDR1 | KASQDVSTAV A | 11 |
| SEQ ID NO:100 Hu106-222 輕鏈CDR2 | SASYLYT | 7 |
| SEQ ID NO:101 Hu106-222 輕鏈CDR3 | QQHYSTPRT | 9 |

【 0592 】 在一些實施例中，OX40促效劑抗體係MEDI6469(又稱為9B12)。MEDI6469係鼠單株抗體。Weinberg, *et al.*, *J. Immunother.*, **2006**, 29, 575-585。在一些實施例中，OX40促效劑係由9B12融合瘤產生之抗體(由Biovest Inc.(Malvern, MA, USA)寄存)，其描述於Weinberg, *et al.*, *J. Immunother.*, **2006**, 29, 575-585，其揭露全文特此以引用方式併入本文中。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。

【 0593 】 在一實施例中，OX40促效劑係L106 BD (Pharminen Product #340420)。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體L106(BD Pharminen Product #340420)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體L106(BD Pharminen Product #340420)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一實施例中，OX40促效劑係ACT35(Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073)。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073)之CDR。在一些實施例中，OX40促效劑包含抗體ACT35(Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073)之重鏈可變區序列及/或輕鏈可變區序列。在一實施例中，OX40促效劑係鼠單株抗體抗mCD134/mOX40(克隆OX86)，其可購自InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH。

【 0594 】 在一實施例中，OX40促效劑係選自描述於

國際專利申請公開案號 WO 95/12673、WO 95/21925、WO 2006/121810、WO 2012/027328、WO 2013/028231、WO 2013/038191 及 WO 2014/148895；歐洲專利申請案 EP 0672141；美國專利申請公開案號 US 2010/136030、US 2014/377284、US 2015/190506 及 US 2015/132288(包括克隆 20E5 及 12H3)；及美國專利第 7,504,101、7,550,140、7,622,444、7,696,175、7,960,515、7,961,515、8,133,983、9,006,399 及 9,163,085 號中之 OX40 促效劑，彼等各者之揭露全文以引用方式併入本文中。

【0595】在一實施例中，OX40 促效劑係如結構 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)所描繪之 OX40 促效性融合蛋白質、或彼等之片段、衍生物、接合物、變體或生物類似物。結構 I-A 及 I-B 之特性係描述於以上及美國專利第 9,359,420、9,340,599、8,921,519 及 8,450,460 號，彼等揭露以引用方式併入本文中。結構 I-A 之多肽結構域之胺基酸序列係在表 6 中給出。Fc 結構域較佳地包含完整恆定結構域(SEQ ID NO:31 之胺基酸 17 至 230)、完整絞鏈結構域(SEQ ID NO:31 之胺基酸 1 至 16)或絞鏈結構域之一部分(例如 SEQ ID NO:31 之胺基酸 4 至 16)。用於連接 C 端 Fc 抗體之較佳連接子可選自 SEQ ID NO:32 至 SEQ ID NO:41 給出之實施例，包括適用於融合額外多肽之連接子。類似地，結構 I-B 之多肽結構域之胺基酸序列係在表 7 中給出。如果 Fc 抗體片段如結構 I-B 中融合至 TNFRFSF 融合蛋白質的 N 端，則 Fc 模組的序列

較佳地顯示於SEQ ID NO:42，且連接子序列較佳地選自如SEQ ID NO:43至SEQ ID NO:45所示之該些實施例。

【0596】在一實施例中，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下列所組成之群組的OX40結合結構域：塔伏利西單抗之可變重鏈及可變輕鏈、11D4之可變重鏈及可變輕鏈、18D8之可變重鏈及可變輕鏈、Hu119-122之可變重鏈及可變輕鏈、Hu106-222之可變重鏈及可變輕鏈、選自表19所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、及彼等之片段、衍生物、接合物、變體及生物類似物。

【0597】在一實施例中，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結合結構域，該OX40結合結構域包含OX40L序列。在一實施例中，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結合結構域，該OX40結合結構域包含根據SEQ ID NO:102之序列。在一實施例中，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結合結構域，該OX40結合結構域包含可溶性OX40L序列。在一實施例中，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結合結構域，該OX40結合結構域包含根據SEQ ID NO:103之序列。在一實施例中，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結合結構域，該OX40結合結構域包含根據SEQ ID NO:104之序列。

【0598】在一實施例中，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 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:58 及 SEQ ID NO:59 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:68 及 SEQ ID NO:69 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:78 及 SEQ ID NO:79 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:86 及 SEQ ID NO:87 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各自分別與 SEQ ID NO:94 及 SEQ ID NO:95 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。在一實施例中，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 結合結構域，該 OX40 結合結構域係包含各

自與表 15 給出之 V_H 及 V_L 序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區的 scFv 結構域，其中該 V_H 及 V_L 結構域藉由連接子連接。

表 15. 可用來作為融合蛋白質(例如結構 I-A 及 I-B)或 scFv OX40 促效劑抗體中之 OX40 結合結構域之額外多肽結構域。

| 識別號 | 序列(單字母胺基酸符號) | |
|---------------------------------------|---|-------------------------|
| SEQ ID NO:102 OX40L | MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL | 60 120 180 183 |
| SEQ ID NO:103 OX40L可溶性 結構域 | SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNS VIINCDGFYL ISLKGYSQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L | 60 120 131 |
| SEQ ID NO:104 OX40L可溶性 結構域(替代性) | YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLVNVT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL | 60 120 128 |
| SEQ ID NO:105 008可變重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGLVTVS | 60 120 |
| SEQ ID NO:106 008可變輕鏈 | DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYVNHPT TTFGQGTK | 60 108 |
| SEQ ID NO:107 011可變重鏈 | EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMMWRQA PGKGLEWVSS ISGSGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQNAFDYWG QGTLVTVSSA | 60 120 |
| SEQ ID NO:108 011可變輕鏈 | DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYVNHPT TTFGQGTK | 60 108 |
| SEQ ID NO:109 021可變重鏈 | EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPAALDY WGQGLVTVS | 60 120 |
| SEQ ID NO:110 021可變輕鏈 | DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNQYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK | 60 108 |
| SEQ ID NO:111 023可變重鏈 | EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFYDW GQGLVTVSS | 60 120 |
| SEQ ID NO:112 023可變輕鏈 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQK GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR | 60 108 |
| SEQ ID NO:113 重鏈可變區 | EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANY YGSSLSMDYWG QGTSVTVSS | 60 119 |
| SEQ ID NO:114 輕鏈可變區 | DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQK DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR | 60 108 |
| SEQ ID NO:115 重鏈可變區 | EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMHWVKQS HGKSLWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS P | 60 120 121 |
| SEQ ID NO:116 輕鏈可變區 | DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQK GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPFTFGG GTKLEIKR | 60 108 |
| SEQ ID NO:117 人化抗體之 重鏈可變區 | QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNE D TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV SS | 60 120 122 |
| SEQ ID NO:118 人化抗體之 重鏈可變區 | QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWQGGTTVTV SS | 60 120 122 |
| SEQ ID NO:119 人化抗體之 輕鏈可變區 | DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQK GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK | 60 107 |

| | | |
|---------------------------------|--|------------------|
| SEQ ID NO:120 人化抗體之 輕鏈可變區 | DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK | 60 107 |
| SEQ ID NO:121 人化抗體之 重鏈可變區 | EVQLVESGGG LVQPGESESLK SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLLVTVSA | 60 120 |
| SEQ ID NO:122 人化抗體之 重鏈可變區 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS | 60 120 |
| SEQ ID NO:123 人化抗體之 輕鏈可變區 | DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHYVY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K | 60 111 |
| SEQ ID NO:124 人化抗體之 輕鏈可變區 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHYVY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K | 60 111 |
| SEQ ID NO:125 重鏈可變區 | MYLGLNYVFI VFLINGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFVFDYWGQ GTTLTVSS | 60 120 138 |
| SEQ ID NO:126 輕鏈可變區 | MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG TKLELK | 60 120 126 |

【0599】在一實施例中，OX40促效劑係OX40促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性OX40結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性OX40結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性OX40結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，且其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域。在一實施例中，OX40促效劑係OX40促效性單鏈融合多肽，其包含(i)第一可溶性OX40結合結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性OX40結合結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性OX40結合結構域，進一步包含在N端及/或C端之額外結構域，其中該額外結構域係Fab或Fc片段結構域，其中該可溶性OX40結合結構域之各者缺乏莖區域(其促成三聚作用且提供距離細胞膜的某些距離，但不是OX40結合結構域的一部分)且該

第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度。

【0600】在一實施例中，OX40促效劑係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)超家族細胞介素結構域、(ii)第一肽連接子、(iii)第二可溶性TNF超家族細胞介素結構域、(iv)第二肽連接子及(v)第三可溶性TNF超家族細胞介素結構域，其中可溶性TNF超家族細胞介素結構域之各者缺乏莖區域且該第一及第二肽連接子獨立地具有3至8個胺基酸長度，且其中TNF超家族細胞介素結構域係OX40結合結構域。

【0601】在一些實施例中，OX40促效劑係MEDI6383。MEDI6383係OX40促效性融合蛋白質且可如美國專利第6,312,700號所述製備，其揭露以引用方式併入本文中。

【0602】在一實施例中，OX40促效劑係OX40促效性scFv抗體，其包含任何前述者之V_H結構域連接至任何前述者之V_L結構域。

【0603】在一實施例中，OX40促效劑係Creative Biolabs的OX40促效劑單株抗體MOM-18455，可購自Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA。

【0604】在一實施例中，OX40促效劑係OX40促效性抗體克隆Ber-ACT35，可購自BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA。

可選的細胞存活性分析

【0605】可選地，在第一擴增(有時稱為初始主體擴

增)之後可使用所屬技術領域中已知之標準測定執行細胞存活性測定。例如，可在主體TIL的樣本上進行台盼藍排除測定，其選擇性標示死亡細胞且允許存活性評估。其他用於測試存活性之測定可包括但不限於阿爾瑪藍測定及MTT測定。

細胞計數、存活性、流動式細胞測量術

【0606】在一些實施例中，測量細胞計數及/或存活性。標誌之表現(諸如但不限於CD3、CD4、CD8及CD56以及任何其他本文揭示或描述者)可藉由流動式細胞測量術，使用FACSCanto™流動式細胞測量儀(BD Biosciences)以抗體(例如但不限於該些可購自BD Biosciences(BD Biosciences, San Jose, CA)者)測量。細胞可使用拋棄式c-晶片血球計(VWR, Batavia, IL)手動計數且存活性可使用任何所屬技術領域中已知之方法包括但不限於台盼藍染色評估。細胞存活性亦可基於美國申請案15/863,634 “Processes for Production of Tumor Infiltrating Lymphocytes and Uses of Same in Immunotherapy”測定，其全文以引用方式併入本文中。

【0607】在一些情況下，主體TIL族群可使用以下討論之規程立即冷凍保存。替代地，主體TIL族群可如以下討論進行REP且接著冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的TIL將用於療法中的情況中，主體或REP TIL族群可經受基因修飾以用於合適治療。

【0608】根據本揭露，一種用於測定TIL存活性及/或投予至個體之進一步用途的方法。在一些實施例中，用於測定腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法包含：

- (i)獲得第一TIL族群；
- (ii)執行第一擴增，其藉由在包含IL-2及可選地OKT-3之細胞培養基中培養第一TIL族群，以產生第二TIL族群；及
- (iii)執行第二擴增，其藉由將第二TIL族群的細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以產生第三TIL族群，其中該第三TIL族群於數量上高於第二TIL族群至少50倍；
- (iv)收集、洗滌及冷凍保存第三TIL族群；
- (v)在冷凍溫度下儲存該經冷凍保存之TIL；
- (vi)解凍第三TIL族群以提供解凍的第三TIL族群；及
- (vii)執行一部分解凍的第三TIL族群的額外第二擴增，其藉由將第三族群的細胞培養基補充IL-2、OKT-3及APC一段至少3天的額外擴增期間(有時稱為reREP期間)，其中執行第三擴增以獲得第四TIL族群，其中比較第四TIL族群中的TIL數量與第三TIL族群中的TIL數量以獲得比例；
- (viii)基於步驟(vii)中的比例判定解凍的TIL族群是否適用於投予至病患；
- (ix)當步驟(viii)中之第四TIL族群中的TIL數量對第三TIL族群中的TIL數量之比例判定為大於5:1，投

予治療有效劑量的解凍的第三 TIL 族群至病患。

【0609】在一些實施例中，在步驟(vii)後測定 TIL 存活性。

【0610】本揭露亦提供測定 TIL 之進一步方法。在一些實施例中，本揭露提供一種測定 TIL 之方法，其包含：

(i) 獲得一部分的第一經冷凍保存之 TIL 族群；

(ii) 將該部分的第一經冷凍保存之 TIL 族群解凍；

(iii) 執行第一擴增，其藉由在包含 IL-2、OKT-3 及抗原呈現細胞 (APC) 之細胞培養基中培養該部分的第一 TIL 族群一段至少 3 天的額外擴增期間 (有時稱為 reREP 期間) 以產生第二 TIL 族群，其中比較來自第一 TIL 族群的該部分與第二 TIL 族群以獲得 TIL 數量的比例，其中第二 TIL 族群中的 TIL 數量對第一 TIL 族群的該部分中的 TIL 數量的比例係大於 5:1；

(iv) 基於步驟 (iii) 中的比例判定第一 TIL 族群是否適用於治療性投予至病患；

(v) 當步驟 (iv) 中之第二 TIL 族群中的 TIL 數量對第一 TIL 族群中的 TIL 數量之比例判定為大於 5:1，判定該第一 TIL 族群適用於治療性投予。

【0611】在一些實施例中，第二 TIL 族群中的 TIL 數量對第一 TIL 族群的該部分中的 TIL 數量之比例係大於 50:1。

【0612】在一些實施例中，該方法進一步包含根據本文提供之任何實施例所述之方法，執行來自步驟 (i) 之整個

第一經冷凍保存之 TIL 族群的擴增。

【0613】在一些實施例中，該方法進一步包含投予來自步驟 (i) 之整個第一經冷凍保存之 TIL 族群至病患。

細胞培養基

【0614】在一實施例中，用於擴增 TIL 之方法(包括該些以上討論以及圖 1 例示者)可包括使用約 5,000 mL 至約 25,000 mL 的細胞培養基、約 5,000 mL 至約 10,000 mL 的細胞培養基或約 5,800 mL 至約 8,700 mL 的細胞培養基。在一些實施例中，培養基係不含血清培養基。在一些實施例中，在第一擴增中之培養基係不含血清。在一些實施例中，在第二擴增中之培養基係不含血清。在一些實施例中，在第一及第二擴增中之培養基皆不含血清。在一實施例中，擴增 TIL 數量使用不超過一種細胞培養基。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 μ M 鏈黴素硫酸鹽及 10 μ M 硫酸建它黴素)細胞培養基(Invitrogen, Carlsbad CA)。就此而言，本發明方法有利地減少擴增 TIL 數量所需的培養基的量及培養基類型的數量。在一實施例中，擴增 TIL 數量可包含頻繁性不超過每三或四天一次地餵養細胞。在氣體可通透容器中擴增細胞數量藉由減少擴增細胞所需的餵養頻率，簡化擴增細胞數量所需之程序。

【0615】在一些實施例中，在本文中揭示之擴增過程中使用的培養基係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/或血清置換物。在一些實施例中，無血清或確定培養基係用於預防及/或降低部分因為含有血清培養基之批次變異所致之實驗變異。

【0616】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/或血清置換物。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、Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培養基 (DMEM)、最低必需培養基 (MEM)、Eagle 氏基礎培養基 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基 (α MEM)、Glasgow 氏最低必需培養基 (G-MEM)、RPMI 生長培養基及 Iscove 氏改良 Dulbecco 氏培養基。

【0617】在一些實施例中，血清補充劑或血清置換物包括但不限於一或多種 CTS™ OpTmizer T細胞擴增血清補充劑、CTS™ 免疫細胞血清置換物、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、一或多種轉鐵蛋白或轉鐵蛋白取代物、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下列所組成之群組的成分：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、鐵飽和轉鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部份 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-巯乙醇。

【0618】在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞免疫細胞血清置換物係與習知生長培養基使用，該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、Dulbecco氏改良Eagle氏培養基(DMEM)、最低必需培養基(MEM)、Eagle氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(α MEM)、Glasgow氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及Iscove氏改良Dulbecco氏培養基。

【0619】在一些實施例中，無血清或確定培養基中之總血清置換物濃度(vol%)係總無血清或確定培養基體積之約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，總血清置換物濃度係無血清或確定培養基之總體積的約3%。在一些實施例中，總血清置換物濃度係無血清或確定培養基之總體積的約5%。在一

些實施例中，總血清置換物濃度係無血清或確定培養基之總體積的約10%。

【0620】在一些實施例中，無血清或確定培養基係CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增 SFM(ThermoFisher Scientific)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增 SFM係1L 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%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)以及55mM的2-巰乙醇。

【0621】在一些實施例中，確定培養基係CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增 SFM(ThermoFisher Scientific)。任何CTS™ OpTmizer™調配物皆可用於本發明。CTS™ OpTmizer™ T細胞擴增 SFM係1L 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%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)以及55mM的2-巰乙醇。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增 SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)、55mM的2-巰乙醇及2mM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%的CTS™免疫細胞血清置換物

(SR)(ThermoFisher Scientific)、55mM的2-巰乙醇及2mM的L-麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)、55mM的2-巰乙醇及2mM的L-麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)、55mM的2-巰乙醇及2mM的L-麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)及55mM的2-巰乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)及55mM的2-巰乙醇，且進一步包含約3000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)及55mM的2-巰乙醇，且進一步包含約1000 IU/mL至約6000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)及約2mM麩醯胺酸，且進一步包含約1000 IU/mL至約8000 IU/mL的IL-2。在一些實施例

中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)及約2mM麩醯胺酸，且進一步包含約3000 IU/mL的IL-2。在一些實施例中，CTS™OpTmizer™ T細胞擴增SFM補充有約3%的CTS™免疫細胞血清置換物(SR)(ThermoFisher Scientific)及約2mM麩醯胺酸，且進一步包含約6000 IU/mL的IL-2。

【0622】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約0.1mM至約10mM、0.5mM至約9mM、1mM至約8mM、2mM至約7mM、3mM至約6mM或4mM至約5mM之麩醯胺酸(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約2mM之麩醯胺酸(即GlutaMAX®)。

【0623】在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約5mM至約150mM、10mM至約140mM、15mM至約130mM、20mM至約120mM、25mM至約110mM、30mM至約100mM、35mM至約95mM、40mM至約90mM、45mM至約85mM、50mM至約80mM、55mM至約75mM、60mM至約70mM或約65mM之2-巰乙醇。在一些實施例中，無血清培養基或確定培養基補充有濃度約55mM之2-巰乙醇。

【0624】在一些實施例中，國際PCT專利公開號WO/1998/030679(其以引用方式併入本文中)描述之確定培養基可用於本發明。在該公開案，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下列或藉由組合一或多種選自下列所組成之群組的成分而獲得：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、一或多種轉鐵蛋白或轉鐵蛋白取代物、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下列所組成之群組的成分：一或多種胺基酸、一或多種維生素、一或多種轉鐵蛋白或轉鐵蛋白取代物、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下列所組成之群組的成分：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、鐵飽和轉鐵蛋白、胰島素及含有微量元素部份 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，基礎細胞培養基係選自由下列所組成之群組：Dulbecco氏改良Eagle氏培養基(DMEM)、最

低必需培養基(MEM)、Eagle氏基礎培養基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最低必需培養基(α MEM)、Glasgow氏最低必需培養基(G-MEM)、RPMI生長培養基及Iscove氏改良Dulbecco氏培養基。

【0625】在一些實施例中，確定培養基中之甘胺酸的濃度係在約5至200 mg/L之範圍內，L-組胺酸的濃度係約5至250 mg/L，L-異白胺酸的濃度係約5至300 mg/L，L-甲硫胺酸的濃度係約5至200 mg/L，L-苯丙胺酸的濃度係約5至400 mg/L，L-脯胺酸的濃度係約1至1000 mg/L，L-羥基脯胺酸的濃度係約1至45 mg/L，L-絲胺酸的濃度係約1至250 mg/L，L-蘇胺酸的濃度係約10至500 mg/L，L-色胺酸的濃度係約2至110 mg/L，L-酪胺酸的濃度係約3至175 mg/L，L-纈胺酸的濃度係約5至500 mg/L，硫胺素的濃度係約1至20 mg/L，還原麩胱甘肽的濃度係約1至20 mg/L，L-抗壞血酸-2-磷酸鹽的濃度係約1至200 mg/L，鐵飽和轉鐵蛋白的濃度係約1至50 mg/L，胰島素的濃度係約1至100 mg/L，亞硒酸鈉的濃度係約0.000001至0.0001 mg/L且白蛋白(例如AlbuMAX® I)的濃度係約5000至50,000 mg/L。

【0626】在一些實施例中，確定培養基中之非微量元素部份成分係以下表A中標題「1X培養基中之濃度範圍」之欄中列出的濃度範圍存在。在其他實施例中，確定培養基中之非微量元素部份成分係以下表A中標題「1X培養基之較佳實施例」之欄中列出的最終濃度存在。在其他實施例中，確定培養基係包含無血清補充劑之基礎細胞培養

基。在一些這些實施例中，無血清補充劑包含下表A中標題「補充劑之較佳實施例」之欄中列出的種類及濃度之非微量部份成分。

表A：非微量元素部份成分之濃度

| 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 |
| 轉鐵蛋白 (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 |

【0627】在一些實施例中，確定培養基之滲透壓係介於約260與350 mOsmol之間。在一些實施例中，滲透壓係介於約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的碳酸氫鈉。確定培養基可進一步補充有L-麩醯胺酸(最終濃度約2 mM)、一或多種抗生素、非必需胺基酸(NEAA；最終濃度約100 μM)、2-巯乙醇(最終濃度約100 μM)。

【0628】 在一些實施例中，Smith, *et al.*, “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” *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™係用來作為基礎細胞培養基且補充有0、2%、5%或10% CTS™免疫細胞血清置換物。

【0629】 在一實施例中，在第一及/或第二氣體可通透容器中之細胞培養基係未經過濾。使用未經過濾細胞培養基可簡化擴增細胞數量所需的程序。在一實施例中，在第一及/或第二氣體可通透容器中之細胞培養基缺乏β-巰乙醇(BME或βME；亦稱為2-巰乙醇，CAS 60-24-2)。

【0630】 在一實施例中，該方法的期間包含獲得來自哺乳動物之腫瘤組織樣本；在其中含有細胞培養基之第一氣體可通透容器中培養腫瘤組織樣本；獲得來自腫瘤組織樣本之TIL；在含有細胞培養基之第二氣體可通透容器中擴增TIL數量一段約7至14天例如約11天的期間。在一些實施例中，REP前係約7至14天，例如約11天。在一些實施例中，REP係約7至14天，例如約11天。

【0631】 在一實施例中，TIL係在氣體可通透容器中擴增。已使用氣體可通透容器來擴增TIL，且使用PBMC、使用所屬技術領域中已知之方法、組成物及裝置，包括該些描述於美國專利申請公開案第2005/0106717 A1號者，

其揭露以引用方式併入本文中。在一實施例中，TIL係在氣體可通透袋子中擴增。在一實施例中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如Xuri細胞擴增系統W25(GE Healthcare)。在一實施例中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如WAVE生物反應器系統，亦稱為Xuri細胞擴增系統W5(GE Healthcare)。在一實施例中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如OMNI C3[®]細胞培養袋(Lampire Biological Laboratories)。在一實施例中，TIL使用在氣體可通透袋子中擴增TIL的細胞擴增系統擴增，諸如EXP-PAK[™]細胞擴增生物容器(Charter Medical)。在一實施例中，用於擴增TIL之細胞擴增系統在各擴增步驟使用相同的氣體可通透容器。在一實施例中，用於擴增TIL之細胞擴增系統在各擴增步驟使用不同的氣體可通透容器。在一實施例中，細胞擴增系統包括氣體可通透細胞袋子，該袋子的體積選自由約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所組成之群組。

【0632】在一實施例中，TIL可在G-Rex培養瓶(可購自Wilson Wolf Manufacturing)中擴增。該等實施例允許細胞族群自約 5×10^5 個細胞/cm²擴增至介於 10×10^6 與 30×10^6 個細胞/cm²之間。在一實施例中，此係未進行餵養。在一實施例中，此係未進行餵養，只要G-Rex培養瓶中的

培養基位在約 10 cm 的高度。在一實施例中，不進行餵養，但添加一或多種細胞介素。在一實施例中，細胞介素可為作為推注添加，不需要將細胞介素與培養基混合。該等容器、裝置及方法係所屬技術領域中已知且已用於擴增 TIL，且包括該些描述於美國專利申請公開案第 US 2014/0377739A1 號、國際專利公開號 WO 2014/210036 A1、美國專利申請公開案第 us 2013/0115617 A1 號、國際專利公開號 WO 2013/188427 A1、美國專利申請公開案第 US 2011/0136228 A1 號、美國專利第 US 8,809,050 B2 號、國際專利公開號 WO 2011/072088 A2、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、國際專利公開號 WO 2012/129201 A1、美國專利申請公開案第 US 2013/0102075 A1 號、美國專利第 US 8,956,860 B2 號、國際專利公開號 WO 2013/173835 A1、美國專利申請公開案第 US 2015/0175966 A1 號，彼等揭露以引用方式併入本文中。該等過程亦描述於 Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, **2012**, 35:283-292。

可選的 TIL 基因工程改造

【0633】在一些實施例中，TIL 可選地經基因工程改造以包括額外功能性，包括但不限於高親和性 T 細胞受體 (TCR)，例如靶向腫瘤相關抗原 (諸如 MAGE-1、HER2 或 NY-ESO-1) 之 TCR，或與腫瘤相關細胞表面分子 (例如間皮素) 或細胞系限制細胞表面分子 (例如 CD19) 結合之嵌合抗

原受體 (CAR)。

用於 TIL 製造的密閉系統

【0634】本發明提供在 TIL 培養過程期間使用密閉系統。該等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，密閉系統使用二個容器。

【0635】密閉系統係所屬技術領域中已知且可見於例如 <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> 及 <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>。

【0636】無菌連接裝置 (STCD) 在二件可相容管之間產生無菌接合。此程序允許無菌連接多種容器及管直徑。在一些實施例中，密閉系統包括例如實例 4 所述之魯爾鎖及熱封系統。在一些實施例中，密閉系統係在無菌條件下經由針筒進入以維持系統的無菌性及密閉特性。在一些實施例中，採用如實例 6 所述的密閉系統。在一些實施例中，將 TIL 根據實例 4 「最終調配及填充」章節所述之方法調配到最終產品調配物容器中。

【0637】在一些實施例中，密閉系統從獲得腫瘤片段之時開始一直到 TIL 即將投予至病患或冷凍保存為止，僅使用一個容器。在一些使用二個容器之實施例中，第一容器係密閉 G 容器，且 TIL 族群在無需打開第一密閉 G 容器下離心及轉移至輸注袋。在一些使用二個容器之實施例中，

輸注袋係含有 HypoThermosol 之輸注袋。密閉系統或密閉 TIL 細胞培養系統的特徵在於，一旦添加了腫瘤樣本及/或腫瘤片段，該系統即可從外面緊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。

【0638】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%。

【0639】密閉系統允許 TIL 在無微生物污染存在下及/或在微生物污染顯著減少下生長。

【0640】再者，TIL 細胞培養環境的 pH、二氧化碳分壓及氧分壓各隨細胞培養而異。因此，即使適用於細胞培養之培養基係經循環，該密閉環境仍需要持續維持為適合 TIL 增生的最佳環境。為達此目的，所欲的是藉由感測器監測密閉環境的培養液體內之 pH、二氧化碳分壓及氧分壓物理因子，其信號用於控制安裝在培養環境入口的氣體交換器，且密閉環境的氣體分壓根據培養液體中的變化即時調整，以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，其在到密閉系統的入口處包含配備有監測裝置的氣體交換器，該監測裝置測量該密閉環境的pH、二氧化碳分壓及氧分壓，且藉由基於來自該監測裝置的信號自動調整氣體濃度來最佳化細胞培養環境。

【0641】在一些實施例中，在密閉環境中的壓力係經連續或間歇控制。也就是說，在密閉環境中的壓力可藉由例如壓力維持裝置而異，因此確保空間適合TIL在正壓狀態下生長，或促進流體在負壓狀態下滲出且因此促進細胞增生。再者藉由間歇性施加負壓，有可能藉由暫時性收縮密閉環境的體積而一致地且有效地置換在密閉環境中循環的液體。

【0642】在一些實施例中，用於TIL增生的最佳培養組分可經取代或添加，且可添加包括諸如IL-2及/或OKT3的因子以及組合。

可選的TIL冷凍保存

【0643】如上所討論及如圖1中提供之步驟A至E所例示，冷凍保存可在整個TIL擴增過程的許多時間點發生，包括在TIL收集之後過程的保存治療性產物的最終階段。在一些實施例中，在第二擴增(例如根據圖1步驟D所提供)後的經擴增TIL族群可經冷凍保存。冷凍保存通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時，可選的轉移至氣態氮冷凍器

中冷凍保存。見 Sadeghi, *et al.*, *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及7所提供之方法冷凍保存。

【0644】當適當時，將細胞自冷凍器移出並在37°C水浴中解凍，直到大約4/5的溶液解凍。將細胞大致上重懸於完全培養基中且可選地洗滌一或多次。在一些實施例中，解凍的TIL可經計數且依所屬技術領域中已知之方式評估存活性。

【0645】主體TIL族群或經擴增TIL族群可選地可經冷凍保存。在一些實施例中，冷凍保存發生於治療性TIL族群。在一些實施例中，冷凍保存發生於在第二擴增後經收集的TIL。在一些實施例中，冷凍保存發生於圖1的例示性步驟F中的TIL。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係經冷凍保存然後放入輸注袋中。在一些實施例中，TIL係經冷凍保存且不放入輸注袋中。在一些實施例中，冷凍保存使用冷凍保存培養基執行。在一些實施例中，冷凍保存培養基含有二甲亞砜(DMSO)。此通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時，可選的轉移至氣態氮冷凍器中冷凍保存。見 Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica*, **2013**, *52*, 978-986。

【0646】當適當時，將細胞自冷凍器移出並在37°C水浴中解凍，直到大約4/5的溶液解凍。將細胞大致上重懸於完全培養基中且可選地洗滌一或多次。在一些實施例中，解凍的TIL可經計數且依所屬技術領域中已知之方式評估存活性。

【0647】在一較佳實施例中，TIL族群係使用CS10冷凍保存培養基(CryoStor 10, BioLife Solutions)冷凍保存。在一較佳實施例中，TIL族群係使用含有二甲亞砜(DMSO)的冷凍保存培養基冷凍保存。在一較佳實施例中，TIL族群係使用1:1(體積:體積)比例的CS10及細胞培養基冷凍保存。在一較佳實施例中，TIL族群係使用約1:1(體積:體積)比例的CS10及細胞培養基冷凍保存，進一步包含額外的IL-2。

【0648】如上於步驟A至E所討論，冷凍保存可發生在TIL擴增過程中的許多時點。在一些實施例中，在根據步驟B之第一擴增後的主體TIL族群或在一或多個根據步驟D之第二擴增後的經擴增TIL族群可經冷凍保存。冷凍保存通常可藉由將TIL族群放入冷凍溶液(例如85%補體去活化AB血清及15%二甲亞砜(DMSO))中完成。將細胞溶液放入冷凍小瓶中且儲存在-80°C下24小時，可選的轉移至氣態氮冷凍器中冷凍保存。見Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica*, **2013**, 52, 978-986。

【0649】當適當時，將細胞自冷凍器移出並在37°C水浴中解凍，直到大約4/5的溶液解凍。將細胞大致上重懸

於完全培養基中且可選地洗滌一或多次。在一些實施例中，解凍的 TIL 可經計數且依所屬技術領域中已知之方式評估存活性。

【0650】 在一些情況下，步驟 B 的 TIL 族群可使用以下討論之規程立即冷凍保存。替代地，主體 TIL 族群可經受步驟 C 及步驟 D 且接著在步驟 D 後冷凍保存。類似地，在其中基因修飾的 TIL 將用於療法中的情況中，步驟 B 或步驟 D 的 TIL 族群可經受基因修飾以用於合適治療。

醫藥組成物、劑量及給藥方案

【0651】 在一實施例中，使用本揭露之方法擴增之 TIL 係作為醫藥組成物投予至病患。在一實施例中，醫藥組成物係 TIL 於無菌緩衝劑中之懸浮液。本揭露之使用 PBMC 擴增之 TIL 可藉由所屬技術領域中已知之任何合適途徑投予。在一些實施例中，T 細胞係作為單一動脈內或靜脈內輸注投予，其較佳地持續大約 30 至 60 分鐘。其他合適的投予途徑包括腹膜內、鞘內及淋巴內投予。

【0652】 可投予任何合適劑量的 TIL。在一些實施例中，投予約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個 TIL，平均約 7.8×10^{10} 個 TIL (特別是如果癌症係黑色素瘤的話)。在一實施例中，投予約 1.2×10^{10} 至約 4.3×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，投予約 3×10^{10} 至約 12×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，投予約 4×10^{10} 至約 10×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，投予約 5×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施例

中，投予約 6×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，投予約 7×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，治療有效劑量係約 2.3×10^{10} 至約 13.7×10^{10} 個。在一些實施例中，治療有效劑量係約 7.8×10^{10} 個 TIL，特別是癌症係黑色素瘤。在一些實施例中，治療有效劑量係約 1.2×10^{10} 至約 4.3×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，治療有效劑量係約 3×10^{10} 至約 12×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，治療有效劑量係約 4×10^{10} 至約 10×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，治療有效劑量係約 5×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，治療有效劑量係約 6×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。在一些實施例中，治療有效劑量係約 7×10^{10} 至約 8×10^{10} 個 TIL。

【0653】 在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的 TIL 之數量係約 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} 。在一實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之數量係在 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} 的範圍內。

【0654】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度係小於例如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的醫藥組成物。

【0655】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度係大於90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、

12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001% w/w、w/v或v/v的醫藥組成物。

【0656】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的TIL之濃度係在約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的醫藥組成物的範圍內。

【0657】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成

物中的 TIL 之濃度係在約 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 的醫藥組成物的範圍內。

【0658】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的 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。

【0659】在一些實施例中，提供於本發明之醫藥組成物中的 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 g、3 g、3.5 g、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。

【0660】提供於本發明之醫藥組成物中的TIL在寬廣劑量範圍內有效。確切劑量將取決於投予途徑、化合物的投予形式、所欲治療之個體的性別及年齡、所欲治療之個體的體重及主治醫師的偏好及經驗。若適當亦可使用TIL的臨床建立劑量。使用在本文中之方法所投予之醫藥組成物的量(諸如TIL的劑量)將取決於所欲治療之人或哺乳動物、病症或病況的嚴重性、投予速率、活性醫藥成分的體內配置(disposition)及處方醫師的考量。

【0661】在一些實施例中，TIL可以單一劑量投予。該投予可為注射，例如靜脈注射。在一些實施例中，TIL可以多個劑量投予。給藥可為每年一次、二次、三次、四次、五次、六次或多於六次。給藥可為一個月一次、每二週一次、每週一次或每二天一次。TIL的投予可視需要持續進行。

【0662】在一些實施例中，TIL的有效劑量係約 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的有效劑量係在 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} 的範圍內。

【0663】 在一些實施例中，TIL的有效劑量係在約
 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的範圍內。

【0664】在一些實施例中，TIL的有效劑量係在約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的範圍內。

【0665】有效量的TIL可以單一或多個劑量經由任何具有類似效用的可接受的藥劑投予模式投予，包括鼻內及經皮途徑、經由動脈內注射、靜脈內、腹膜內、腸胃外、肌肉內、皮下、局部、經由移植或經由吸入。

治療病患之方法

【0666】治療方法始於初始TIL收集及培養TIL。該等方法皆已由所屬技術領域例如Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, **2012**, 35(3):283-292描述，其全文以引用方式併入本文

中。治療方法之實施例係描述於以下所有章節，包括實施例。

【0667】根據本文所述之方法包括例如以上步驟A至F所述或根據以上步驟A至F(亦如例如圖1所述)產生的擴增TIL有治療癌症病患的具體用途(例如 Goff, *et al.*, *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34(20):2389-239以及補充內容所述);其全文以引用方式併入本文中。在一些實施例中，TIL係如先前描述生長自轉移性黑色素瘤的經切除之寄存物(見Dudley, *et al.*, *J Immunother.*, **2003**, 26:332-342;其全文以引用方式併入本文中)。新鮮腫瘤可在無菌條件下分割。可收集代表性樣本進行正式病理分析。可使用2 mm³至3 mm³的單一片段。在一些實施例中，獲得每病患5、10、15、20、25或30個樣本。在一些實施例中，獲得每病患20、25或30個樣本。在一些實施例中，獲得每病患20、22、24、26或28個樣本。在一些實施例中，獲得每病患24個樣本。樣本可放入24孔板之個別孔中，維持於含有高劑量IL-2(6,000 IU/mL)之生長培養基中且監測腫瘤的破壞及/或TIL的增生。任何在處理後仍有存活細胞的腫瘤可如本文所述經酶消化成單一細胞懸浮液且經冷凍保存。

【0668】在一些實施例中，成功生長的TIL可經取樣進行表型分析(CD3、CD4、CD8及CD56)且當可用時在自體腫瘤測試。如果整夜共培養產生干擾素- γ (IFN- γ)水準>200 pg/mL且為背景的二倍，則TIL可被視為反應性。(Goff, *et al.*, *J Immunother.*, **2010**, 33:840-847;其全文以

引用方式併入本文中)。在一些實施例中，可選擇具有自體反應性或足夠生長模式證據的培養進行第二擴增(例如根據圖1步驟D提供的第二擴增)，包括有時稱為快速擴增(REP)的第二擴增。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如在第二擴增期間高增生)的擴增TIL進行額外第二擴增。在一些實施例中，選擇具有高自體反應性(例如在圖1步驟D提供的第二擴增期間的高增生)的TIL進行根據圖1步驟D的額外第二擴增。

【0669】 在一些實施例中，病患並不直接移入ACT(過繼性細胞轉移)，例如，在一些實施例中，不立即利用在腫瘤收集及/或第一擴增後的細胞。在該些實施例中，TIL可經冷凍保存且在投予至病患之前2天解凍。在該些實施例中，TIL可經冷凍保存且在投予至病患之前1天解凍。在一些實施例中，TIL可經冷凍保存且在投予至病患之前立即解凍。

【0670】 經冷凍保存之輸注袋TIL樣本的細胞表型可藉由流動式細胞測量術(例如FlowJo)分析表面標誌CD3、CD4、CD8、CCR7及CD45RA(BD BioSciences)，以及藉由本文所述之任何方法分析。使用標準連結酶免疫吸收測定技術測量血清細胞介素。血清IFN- γ 上升定義為>100 pg/mL且大於4 3基線水準。

【0671】 在一些實施例中，藉由本文提供之方法(例如該些在圖1例示者)產生之TIL提供意外改善TIL的臨床療效。在一些實施例中，藉由本文提供之方法(例如該些在

圖 1 例示者)產生之 TIL 相較於藉由除該些在本文中描述之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 例示之方法以外的方法)產生之 TIL 展現增加的臨床療效。在一些實施例中，除該些在本文中描述之方法以外的方法包括稱為過程 1C 及/或第 1 代(Gen 1)的方法。在一些實施例中，增加療效係藉由 DCR、ORR 及/或其他臨床反應測量。在一些實施例中，藉由本文提供之方法(例如該些在圖 1 例示者)產生之 TIL 相較於藉由除該些在本文中描述之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 例示之方法以外的方法，例如 Gen 1 過程)產生之 TIL 展現類似的發生反應所需時間(time to response)及安全性輪廓。

【0672】在一些實施例中，IFN- γ 表示治療療效及/或增加臨床療效。在一些實施例中，TIL 治療個體之血液中的 IFN- γ 表示活性 TIL。在一些實施例中，採用 IFN- γ 產生的效力測定。IFN- γ 產生是細胞毒性潛力的另一種測量。IFN- γ 產生可藉由判定經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖 1 中描述之方法)製備之 TIL 治療之個體的血液、血清或離體 TIL 中之細胞介素 IFN- γ 水準來測量。在一些實施例中，IFN- γ 增加指示經藉由本發明之方法產生之 TIL 治療之病患的治療療效。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，IFN- γ 增加一倍、二倍、三倍、四倍或五倍或更多倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較

於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，IFN- γ 分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，IFN- γ 分泌增加二倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，IFN- γ 分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，IFN- γ 分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，IFN- γ 分泌增加五倍。在一些實施例中，IFN- γ 係使用 Quantikine ELISA 套組測量。在一些實施例中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖 1 中描述之方法)製備之 TIL 治療之個體的離體 TIL 中測量。在一些實施例中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖 1 中描述之方法)製備之 TIL 治療之個體的血液中測量。在一些實施例中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法(包括例如該些在圖 1 中描述之方法)製備之 TIL 治療之個體的 TIL 血清中測量。

【0673】 在一些實施例中，藉由本發明之方法(包括該些在例如圖1中描述之方法)製備之TIL相較於藉由其他方法(包括該些非在圖1例示之方法，諸如例如稱為過程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，顯著改善之多株性及/或增加之多株性表示治療療效及/或增加臨床療效。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授予藉由本發明之方法產生之TIL的治療療效。在一些實施例中，相較於使用在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL，多株性增加一倍、二倍、十倍、100倍、500倍或1000倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，多株性增加二倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，多株性增加100倍。在一些

實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，多株性增加500倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，多株性增加1000倍。

【0674】療效的測量可包括疾病控制率(DCR)以及整體反應率(ORR)，如所屬技術領域中已知及本文中所述。

治療癌症及其他疾病之方法

【0675】本文所述之組成物及方法可用於治療疾病之方法中。在一實施例中，彼等用於治療過度增生性病症。彼等亦可用於治療其他如本文及以下段落所述之病症。

【0676】在一些實施例中，過度增生性病症係癌症。在一些實施例中，過度增生性病症係實性腫瘤癌症。在一些實施例中，實性腫瘤癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，過度增生性病症係血液惡性病。在一些實施例中，實性腫瘤癌係選自由下列所組成之群組：慢性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、瀰漫性大型B細胞淋巴

瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及外套細胞淋巴瘤。

【0677】在一實施例中，本發明包括用TIL族群治療癌症之方法，其中病患在根據本揭露輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一實施例中，非骨髓清除式化療係環磷醯胺 60 mg/kg/d 共 2 天 (TIL 輸注之前第 27 及 26 天) 及氟達拉濱 25 mg/m²/d 共 5 天 (TIL 輸注之前第 27 至 23 天)。在一實施例中，在根據本揭露之非骨髓清除式化療及 TIL 輸注 (第 0 天) 之後，病患每 8 小時接受 720,000 IU/kg 靜脈內 IL-2 的靜脈內輸注至生理耐受。

【0678】在本文中描述之化合物及化合物之組合在治療、預防及/或處理所示疾病或病症的療效可使用各種所屬技術領域中已知之模型測試，該等模型提供人疾病治療之指南。例如，用於判定卵巢癌治療療效的模型係描述於例如 Mullany, *et al.*, *Endocrinology* **2012**, 153, 1585-92；及 Fong, *et al.*, *J. Ovarian Res.* **2009**, 2, 12。用於判定胰癌治療療效的模型係描述於 Herreros-Villanueva, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* **2012**, 18, 1286-1294。用於判定乳癌治療療效的模型係描述於例如 Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006**, 8, 212。用於判定黑色素瘤治療療效的模型係描述於例如 Damsky, *et al.*, *Pigment Cell & Melanoma Res.* **2010**, 23, 853-859。用於判定肺癌治療療效的模型係描述於例如 Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, **2005**, 19, 643-664。用於判定肺癌治療療效的模型係描述於例如

Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009**, 2, 55-60; and Sano, *Head Neck Oncol.* **2009**, 1, 32。

【0679】在一些實施例中，IFN- γ 指示過度增生性病
症治療的治療療效。在一些實施例中，TIL治療個體之血
液中的IFN- γ 表示活性TIL。在一些實施例中，採用IFN- γ
產生的效力測定。IFN- γ 產生是細胞毒性潛力的另一種測
量。IFN- γ 產生可藉由判定經藉由本發明之方法(包括例如
該些在圖1中描述之方法)製備之TIL治療之個體的血液中
之細胞介素IFN- γ 水準來測量。在一些實施例中，藉由本
方法獲得之TIL提供經本方法之TIL治療之個體相較於經使
用稱為過程1C(如圖5及/或圖6例示)之方法所製備的TIL治
療之個體的血液中增加之IFN- γ 。在一些實施例中，IFN- γ
增加指示經藉由本發明之方法產生之TIL治療之病患的治
療療效。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較
於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如
除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病
患，IFN- γ 增加一倍、二倍、三倍、四倍或五倍或更多
倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經
使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該
些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病
患，IFN- γ 分泌增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療病
患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方
法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之
TIL治療的病
患，IFN- γ 分泌增加二倍。在一些實施例中，

相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，IFN- γ 分泌增加三倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，IFN- γ 分泌增加四倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖1體現之方法以外的方法)製備之TIL治療的病患，IFN- γ 分泌增加五倍。在一些實施例中，IFN- γ 係使用Quantikine ELISA套組測量。在一些實施例中，IFN- γ 係使用Quantikine ELISA套組測量。在一些實施例中，IFN- γ 係於來自經藉由本發明之方法產生之TIL治療之病患的離體TIL中測量。在一些實施例中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法產生之TIL治療之病患的血液中測量。在一些實施例中，IFN- γ 係於經藉由本發明之方法產生之TIL治療之病患的血清中測量。

【0680】在一些實施例中，藉由本發明之方法(包括該些在例如圖1中描述之方法)製備之TIL相較於藉由其他方法(包括該些非在圖1例示之方法，諸如例如稱為過程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，顯著改善之多株性及/或增加之多株性表示治療療效及/或增加癌症治療的臨床療效。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

可指示關於投予藉由本發明之方法產生之 TIL 的治療療效。在一些實施例中，相較於使用在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL，多株性增加一倍、二倍、十倍、100 倍、500 倍或 1000 倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，多株性增加一倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，多株性增加二倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，多株性增加十倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，多株性增加 100 倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，多株性增加 500 倍。在一些實施例中，相較於未治療病患及/或相較於經使用其他在本文中提供之方法以外的方法(包括例如除該些在圖 1 體現之方法以外的方法)製備之 TIL 治療的病患，多株性增加 1000 倍。

【0681】在一些實施例中，本發明提供治療病患的癌症之方法，該方法包含向該病患投予治療有效劑量的TIL，該TIL使用任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之TIL之方法製備。在一些實施例中，癌症係實性腫瘤癌症。在一些實施例中，實性腫瘤癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係血液惡性疾病。在一些實施例中，血液惡性病係選自由下列所組成之群組：慢性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、瀰漫性大型B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及外套細胞淋巴瘤。

【0682】在一些實施例中，本發明提供包含TIL及醫藥上可接受之載劑之醫藥組成物，該TIL使用任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之TIL之方法製備。

【0683】在一些實施例中，本發明提供包含TIL及醫藥上可接受之載劑之醫藥組成物，該TIL使用任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之TIL之方法製備，該醫藥組成物用於治療病患的癌症之方法，該方法包含向該病患投予治療有效劑量之該醫藥組成物。在一些實施例中，癌症係實性腫瘤癌症。在一些實施例中，實性腫瘤癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲

狀腺癌、結直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係血液惡性疾病。在一些實施例中，血液惡性病係選自由下列所組成之群組：慢性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、瀰漫性大型B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及外套細胞淋巴瘤。

【0684】在一些實施例中，本發明提供包含TIL及醫藥上可接受之載劑之醫藥組成物於治療病患的癌症之方法中的用途，該方法包含向該病患投予治療有效劑量之該醫藥組成物，該TIL使用任何前述擴增來自經冷凍之腫瘤組織之TIL之方法製備。在一些實施例中，癌症係實性腫瘤癌症。在一些實施例中，實性腫瘤癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、卵巢癌、子宮內膜癌、甲狀腺癌、結直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、由人乳突瘤病毒所造成的癌症、頭頸癌(包括頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC))、腎癌及腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係血液惡性疾病。在一些實施例中，血液惡性病係選自由下列所組成之群組：慢性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、瀰漫性大型B細胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及外套細胞淋巴瘤。

共投方法

【0685】在一些實施例中，如本文所述產生之TIL(包括例如衍生自圖1之步驟A至F所述之方法的TIL)可與一或多種免疫檢查點調節劑(諸如以下描述之抗體)組合投予。例如，靶向PD-1且可與本發明之TIL共同投予之抗體包括例如但不限於尼沃魯單抗(BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®)、派姆單抗(lambrolizumab, MK03475或MK-3475, Merck; Keytruda®)、人化抗PD-1抗體JS001(ShangHai JunShi)、單株抗PD-1抗體TSR-042(Tesaro, Inc.)、匹利珠單抗(抗PD-1 mAb CT-011, Medivation)、抗PD-1單株抗體BGB-A317(BeiGene)及/或抗PD-1抗體SHR-1210(ShangHai HengRui)、人單株抗體REGN2810(Regeneron)、人單株抗體MDX-1106(Bristol-Myers Squibb)及/或人化抗PD-1 IgG4抗體PDR001(Novartis)。在一些實施例中，PD-1抗體係來自殖株：RMP1-14(大鼠IgG)- BioXcell cat# BP0146。其他適用於與根據如本文中描述之步驟A至F所產生的TIL共投之方法中的合適抗體為抗PD-1抗體，其揭示於美國專利第8,008,449號(以引用方式併入本文中)。在一些實施例中，抗體或其抗原結合部分與PD-L1特異性結合且抑制其與PD-1的交互作用，藉此增加免疫活性。任何所屬技術領域中已知之與PD-L1結合且破壞PD-1與PD-L1之間的交互作用且刺激抗腫瘤免疫反應的抗體皆適用於與根據如本文中描述之步驟A至F所產生的TIL共投之方法中。例如，靶向

PD-L1且在臨床試驗中的抗體包括BMS-936559(Bristol-Myers Squibb)及MPDL3280A(Genentech)。其他靶向PD-L1的合適抗體揭示於美國專利第7,943,743號，其以引用方式併入本文中。所屬技術領域中具有通常知識者將理解，任何與PD-1或PD-L1結合、破壞PD-1/PD-L1交互作用且刺激抗腫瘤免疫反應的抗體皆適用於與根據如本文中描述之步驟A至F所產生的TIL共投之方法中。在一些實施例中，當個體具有的癌症類型為單獨投予抗PD-1抗體所難治時，對於投予根據步驟A至F產生之TIL組合的個體共投抗PD-1抗體。在一些實施例中，當病患具有難治性黑色素瘤時，對病患投予TIL與抗PD-1之組合。在一些實施例中，當病患具有非小細胞肺癌(NSCLC)時，對病患投予TIL與抗PD-1之組合。

可選的病患淋巴細胞耗盡前處理

【0686】在一實施例中，本發明包括用TIL族群治療癌症之方法，其中病患在根據本揭露輸注TIL之前先經非骨髓清除式化療治療。在一實施例中，本發明包括用於治療已先經非骨髓清除式化療治療之病患的癌症之TIL族群。在一實施例中，TIL族群係用於輸注投予。在一實施例中，非骨髓清除式化療係環磷醯胺60 mg/kg/d共2天(TIL輸注之前第27及26天)及氟達拉濱25 mg/m²/d共5天(TIL輸注之前第27至23天)。在一實施例中，在根據本揭露之非骨髓清除式化療及TIL輸注(第0天)之後，病患每8小時接

受 720,000 IU/kg 靜脈內 IL-2(阿地介白素，以 PROLEUKIN 市售)的靜脈內輸注至生理耐受。在某些實施例中，TIL 族群係與 IL-2 組合用於治療癌症，其中 IL-2 在 TIL 族群之後投予。

【0687】實驗發現指示在過繼性轉移腫瘤特異性 T 淋巴細胞之前，藉由清除調節 T 細胞且競爭免疫系統的元件(「細胞介素匯(cytokine sinks)」)進行淋巴細胞耗盡扮演增強治療療效的關鍵角色。因此，本發明之一些實施例在導入本發明之 TIL 之前，對病患進行淋巴細胞耗盡步驟(有時亦稱為「免疫抑制性調理」)。

【0688】一般來說，淋巴細胞耗盡係使用氟達拉濱或環磷醯胺(活性形式稱為馬磷醯胺)及其組合的投予達成。此類方法描述於 Gassner, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 75-85、Muranski, *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2006**, *3*, 668-681、Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5233-5239 及 Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2346-2357 中，所有全文皆以引用方式併入本文中。

【0689】在一些實施例中，氟達拉濱係以 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟達拉濱之濃度投予。在一些實施例中，氟達拉濱係以 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氟達拉濱之濃度投予。在一些實施例中，氟達拉濱治療係投予 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 mg/kg/天、15 mg/kg/天、20 mg/kg/天、25 mg/kg/天、30

mg/kg/天、35 mg/kg/天、40 mg/kg/天或45 mg/kg/天之劑量投予。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35 mg/kg/天投予2至7天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以35 mg/kg/天投予4至5天。在一些實施例中，氟達拉濱治療係以25 mg/kg/天投予4至5天。

【0690】在一些實施例中，藉由投予環磷醯胺獲得0.5 $\mu\text{g/mL}$ 至10 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度的馬磷醯胺(環磷醯胺之活性形式)。在一些實施例中，藉由投予環磷醯胺獲得1 $\mu\text{g/mL}$ 之濃度的馬磷醯胺(環磷醯胺之活性形式)。在一些實施例中，環磷醯胺治療係投予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 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 、150 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 、175 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 、200 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 、225 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 、250 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 、275 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 或300 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 之劑量投予。在一些實施例中，環磷醯胺係經靜脈內(i.v.)投予。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以35 mg/kg/天 投予2至7天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ i.v.投予4至5天。在一些實施例中，環磷醯胺治療係以250 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ i.v.投予4天。

【0691】在一些實施例中，淋巴細胞耗盡係藉由一起投予氟達拉濱及環磷醯胺至病患執行。在一些實施例中，氟達拉濱係以25 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ i.v.投予且環磷醯胺係以250 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ i.v.投予4天。

【0692】在一實施例中，淋巴細胞耗盡係藉由投予環磷醯胺且劑量為60 $\text{mg/m}^2/\text{天}$ 共二天，隨後投予氟達拉濱

且劑量為 25 mg/m²/天共五天執行。

IL-2 方案

【0693】在一實施例中，IL-2 方案包含高劑量 IL-2 方案，其中高劑量 IL-2 方案包含靜脈內投予阿地介白素或其生物類似物或變體，始於投予治療有效部分的治療性 TIL 族群之後當天，其中阿地介白素或其生物類似物或變體係以 0.037 mg/kg 或 0.044 mg/kg IU/kg (病患身體質量) 之劑量每八小時使用 15 分鐘推注靜脈內輸液投予直到耐受為止，最多 14 劑。在休息 9 天之後，可重複此時程再投予 14 劑，最多總共 28 劑。

【0694】在一實施例中，IL-2 方案包含漸減 IL-2 方案。漸減 IL-2 方案已描述於 O'Day, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 2752-61 及 Eton, *et al.*, *Cancer* **2000**, *88*, 1703-9，彼等之揭露以引用方式併入本文中。在一實施例中，漸減 IL-2 方案包含在 6 小時內靜脈內投予 18×10^6 IU/m²，隨後在 12 小時內靜脈內投予 18×10^6 IU/m²，隨後在 24 小時內靜脈內投予 18×10^6 IU/m²，隨後在 72 小時內靜脈內投予 4.5×10^6 IU/m²。此治療週期可每 28 天重複一次，最多可達四個週期。在一實施例中，漸減 IL-2 方案包含第 1 天 18,000,000 IU/m²，第 2 天 9,000,000 IU/m² 及第 3 及 4 天 4,500,000 IU/m²。

【0695】在一實施例中，IL-2 方案包含每 1、2、4、6、7、14 或 21 天以 0.10 mg/天至 50 mg/天之劑量投予聚乙

二 醇 化 IL-2 。

過 繼 性 細 胞 轉 移

【 0696 】 過 繼 性 細 胞 轉 移 (ACT) 是 一 種 非 常 有 效 的 免 疫 治 療 形 式 且 涉 及 將 具 有 抗 腫 瘤 活 性 的 免 疫 細 胞 轉 移 至 癌 症 病 患 。 ACT 是 涉 及 活 體 外 識 別 具 有 抗 腫 瘤 活 性 之 淋 巴 細 胞 、 活 體 外 擴 增 這 些 細 胞 至 大 量 及 將 彼 等 輸 注 至 荷 癌 宿 主 的 治 療 方 式 。 用 於 過 繼 性 轉 移 之 淋 巴 細 胞 可 衍 生 自 經 切 除 之 腫 瘤 的 基 質 (腫 瘤 浸 潤 性 淋 巴 細 胞 或 TIL) 。 用 於 ACT 之 TIL 可 如 在 本 文 中 之 TIL 製 造 過 程 所 述 製 備 ， 包 括 使 用 腫 瘤 冷 凍 保 存 及 解 凍 步 驟 。 在 一 些 實 施 例 中 ， TIL 係 根 據 例 如 圖 1 描 述 之 方 法 製 備 。 如 果 彼 等 經 基 因 工 程 改 造 以 表 現 抗 腫 瘤 T 細 胞 受 體 (TCR) 或 嵌 合 抗 原 受 體 (CAR) 、 經 混 合 之 淋 巴 細 胞 腫 瘤 細 胞 培 養 (MLTC) 濃 化 或 使 用 自 體 抗 原 呈 現 細 胞 及 腫 瘤 衍 生 肽 選 殖 ， 則 彼 等 亦 可 衍 生 自 或 來 自 血 液 。 其 中 淋 巴 細 胞 源 自 待 輸 注 荷 癌 宿 主 的 ACT 稱 為 自 體 ACT 。 美 國 專 利 公 開 號 2011/0052530 關 於 一 種 用 於 執 行 過 繼 性 細 胞 療 法 以 促 進 癌 症 消 退 之 方 法 ， 主 要 用 於 治 療 罹 患 轉 移 性 黑 色 素 瘤 的 病 患 ， 該 案 全 文 以 引 用 方 式 併 入 本 文 中 以 用 於 這 些 方 法 。 在 一 些 實 施 例 中 ， TIL 可 如 本 文 所 述 投 予 。 在 一 些 實 施 例 中 ， TIL 可 以 單 一 劑 量 投 予 。 該 投 予 可 為 注 射 ， 例 如 靜 脈 注 射 。 在 一 些 實 施 例 中 ， TIL 及 / 或 細 胞 毒 性 淋 巴 細 胞 可 以 多 個 劑 量 投 予 。 給 藥 可 為 每 年 一 次 、 二 次 、 三 次 、 四 次 、 五 次 、 六 次 或 多 於 六 次 。 給 藥 可 為 一 個 月 一

次、每二週一次、每週一次或每二天一次。TIL及/或細胞毒性淋巴細胞的投予可視需要持續進行。

與PD-1及PD-L1抑制劑組合

【0697】程序性死亡1(PD-1)係由T細胞、B細胞、天然殺手(NK)T細胞、經活化之單核球及樹突細胞表現之288個胺基酸的跨膜免疫檢查點受體蛋白質。PD-1(亦稱為CD279)屬於CD28家族，且在人類係由染色體2上之*Pdcd1*基因編碼。PD-1係由一個免疫球蛋白(Ig)超家族結構域、跨膜區及含有免疫受體酪胺酸基底抑制模體(ITIM)及免疫受體酪胺酸基底開關模體(ITSM)之細胞內結構域組成。已知PD-1及其配體(PD-L1及PD-L2)在免疫耐受性扮演關鍵角色，如Keir, *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, 26:677-704所述。PD-1提供負向調節T細胞免疫反應之抑制信號。PD-L1(亦稱為B7-H1或CD274)及PD-L2(亦稱為B7-DC或CD273)係表現在腫瘤細胞及基質細胞上，該等細胞可遭遇表現PD-1之經活化之T細胞，導致T細胞的免疫抑制。PD-L1係由人類染色體9上之*Cd274*基因編碼之290個胺基酸的跨膜蛋白質。使用PD-1抑制劑、PD-L1抑制劑及/或PD-L2抑制劑阻斷PD-1及其配體PD-L1及PD-L2之間的交互作用可克服免疫抗性，如最近諸如Topalian, *et al.*, *N. Eng. J. Med.* **2012**, 366:2443-54所述之臨床研究顯示。PD-L1表現在許多腫瘤細胞系上，而PD-L2大多表現在樹突細胞及少數腫瘤細胞系上。除了T細胞(其在活化後誘導性表現PD-

1)，PD-1亦表現在B細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞、經活化之單核球及樹突細胞上。

【0698】本文所述之方法、組成物及TIL及TNFRSF促效劑之組合亦可進一步與程序性死亡-1(PD-1)、程序性死亡配體1(PD-L1)及/或程序性死亡配體2(PD-L2)結合抗體、拮抗劑或抑制劑(即阻斷劑)組合。PD-1、PD-L1及/或PD-L2抑制劑可在TIL擴增之REP前或REP階段期間搭配本文所述之TNFRSF促效劑用於細胞培養。PD-1、PD-L1及/或PD-L2抑制劑亦可在外科切除腫瘤之前或在輸注TIL期間或在輸注TIL之後搭配TNFRSF促效劑使用。例如，使用PD-1/PD-L1抑制劑搭配促效性GITR抗體及包含PD-1/PD-L1拮抗劑及GITR促效劑之組成物之合適方法係描述於國際專利申請案公開號WO 2015/026684 A1，其揭露以引用方式併入本文中。

【0699】在一實施例中，PD-1抑制劑可為所屬技術領域中已知之任何PD-1抑制劑或PD-1阻斷劑。具體而言，其係下列段落詳述之PD-1抑制劑或阻斷劑之一者。參照PD-1抑制劑之用語「抑制劑(inhibitor)」、「拮抗劑(antagonist)」及「阻斷劑(blocker)」在本文中可互換使用。為了避免疑義，在本文中提及係為抗體之PD-1抑制劑可指化合物或其抗原結合片段、變體、接合物或生物類似物。為了避免疑義，在本文中提及PD-1抑制劑亦可指小分子化合物或其醫藥上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【0700】 在一些實施例中，本文所述之組成物及方法包括PD-1抑制劑。在一些實施例中，PD-1抑制劑係小分子。在一較佳實施例中，PD-1抑制劑係抗體(即，抗PD-1抗體)、其片段(包括Fab片段)或其單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-1抑制劑係多株抗體。在較佳實施例中，PD-1抑制劑係單株抗體。在一些實施例中，PD-1抑制劑與PD-1競爭結合及/或與PD-1上之表位結合。在一實施例中，抗體與PD-1競爭結合及/或與PD-1上之表位結合。

【0701】 在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約100 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約90 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約80 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約70 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約60 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約50 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約40 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約30 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約20 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合、以約10 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合或以約1 pM或較低之 K_D 與人PD-1結合之PD-1抑制劑。

【0702】 在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約 7.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合、以約 7.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合、以約 8×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合、以約 8.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合、以約 9×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合、以約 9.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合或以約 1×10^6 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-1結合之

PD-1抑制劑。

【0703】在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約 2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.1×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.4×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.5×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.6×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合或以約 2.7×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.8×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.9×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合或以約 3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合之PD-1抑制劑。

【0704】在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約 10 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 9 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 8 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 7 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 6 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 5 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 4 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 3 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1結合、以約 2 nM或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人PD-L1或人PD-L2與人PD-1

結合或以約 1 nM 或較低之 IC₅₀ 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合之 PD-1 抑制劑。

【0705】在一實施例中，PD-1 抑制劑係尼沃魯單抗 (Bristol-Myers Squibb Co. 以 OPDIVO 市售) 或其生物類似物、抗原結合片段、接合物或變體。尼沃魯單抗係阻斷 PD-1 受體之全人 IgG4 抗體。在一實施例中，抗 PD-1 抗體係免疫球蛋白 G4 κ、抗-(人 CD274) 抗體。尼沃魯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。尼沃魯單抗之製備及性質係描述於美國專利第 8,008,449 號及國際專利公開案 WO 2006/121168，彼等揭露以引用方式併入本文中。尼沃魯單抗於各種形式的癌症之臨床安全性及療效已描述於 Wang, *et al.*, *Cancer Immunol Res.* **2014**, 2:846-56; Page, *et al.*, *Ann. Rev. Med.*, **2014**, 65, 185-202; 及 Weber, *et al.*, *J. Clin. Oncology*, **2013**, 31:4311-4318，彼等揭露以引用方式併入本文中尼沃魯單抗之胺基酸序列係如表 16 所示。尼沃魯單抗具有位於 22-96、140-196、254-314、360-418、22''-96''、140''-196''、254''-314'' 及 360''-418'' 之重鏈內雙硫鍵；位於 23'-88'、134'-194'、23'''-88''' 及 134'''-194''' 之輕鏈內雙硫鍵；位於 127-214'、127''-214'' 之重鏈-輕鏈間雙硫鍵、位於 219-219'' 及 222-222'' 之重鏈-重鏈間雙硫鍵；及位於 290、290'' 之 N-糖基化位點 (H CH₂ 84.4)。

【0706】在一實施例中，PD-1 抑制劑包含由 SEQ ID NO:127 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:128 給出之輕鏈。在一

實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:127及SEQ ID NO:128所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0707】在一實施例中，PD-1抑制劑包含尼沃魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:129所示之序列且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:130所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:129及SEQ ID NO:130所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:129及SEQ ID NO:130所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:129及SEQ ID

NO:130所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:129及SEQ ID NO:130所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:129及SEQ ID NO:130所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0708】在一實施例中，PD-1抑制劑包含具有分別如SEQ ID NO:131、SEQ ID NO:132及SEQ ID NO:133所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:135及SEQ ID NO:136所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，抗體和任何前述抗體競爭與PD-1上之相同表位的結合及/或與任何前述抗體所結合之PD-1上的相同表位結合。

【0709】在一實施例中，PD-1抑制劑係藥物主管機關參照尼沃魯單抗所核准的抗PD-1生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係尼沃魯單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之抗PD-1

抗體，其中該抗PD-1抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係尼沃魯單抗。抗PD-1抗體可獲得藥物主管機關諸如美國FDA及/或歐盟的EMA授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係尼沃魯單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係尼沃魯單抗。

表 16. 與尼沃魯單抗相關之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:127 尼沃魯單抗重鏈 | QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGLT VT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440 |
| SEQ ID NO:128 尼沃魯單抗輕鏈 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN R GEC 214 |
| SEQ ID NO:129 尼沃魯單抗 可變重鏈 | QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGLT VT VSS 113 |
| SEQ ID NO:130 尼沃魯單抗 可變輕鏈 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107 |
| SEQ ID NO:131 尼沃魯單抗重鏈 CDR1 | NSGMH 5 |
| SEQ ID NO:132 尼沃魯單抗重鏈 CDR2 | VIWYDGSKRY YADSVKG 17 |
| SEQ ID NO:133 尼沃魯單抗重鏈 CDR3 | NDDY 4 |
| SEQ ID NO:134 尼沃魯單抗輕鏈 CDR1 | RASQSVSSYL A 11 |
| SEQ ID NO:135 尼沃魯單抗輕鏈 CDR2 | DASNRAT 7 |
| SEQ ID NO:136 尼沃魯單抗輕鏈 CDR3 | QQSSNWPRT 9 |

【0710】在另一實施例中，PD-1抑制劑包含派姆單抗 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA以KEYTRUDA市售)或其抗原結合片段、接合物或變體。派姆單抗經指派CAS登記號1374853-91-4，且亦稱為來伯里茲單抗、MK-3475及SCH-900475。派姆單抗具有免疫球蛋白G4、抗-(人蛋白質PDCD1(程序性細胞死亡1))(人-家鼯鼠單株重鏈)與人-家鼯鼠單株輕鏈二硫化物之二聚體結構。派姆單抗之

結構亦可描述為免疫球蛋白 G4、抗-(人程序性細胞死亡 1)；人化小鼠單株 [228-L-脯胺酸 (H10-S>P)] γ 4 重鏈 (134-218')-二硫化物與人化小鼠單株 κ 輕鏈二聚體 (226-226'':229-229'')-雙二硫化物。派姆單抗之性質、用途及製備係描述於國際專利公開號 WO 2008/156712 A1、美國專利第 8,354,509 號及美國專利申請公開案號 US 2010/0266617 A1、US 2013/0108651 A1 及 US 2013/0109843 A2，彼等揭露以引用方式併入本文中。派姆單抗於各種形式的癌症之臨床安全性及療效已描述於 Fuerst, *Oncology Times*, **2014**, 36:35-36；Robert, *et al.*, *Lancet*, **2014**, 384:1109-17；及 Thomas, *et al.*, *Exp. Opin. Biol. Ther.*, **2014**, 14:1061-1064。派姆單抗之胺基酸序列係如表 21 所示。派姆單抗包括下列雙硫鍵：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'' 及下列糖基化位點 (N)：Asn-297 及 Asn-297''。派姆單抗係 IgG4/ κ 同型，在 Fc 區具有穩定性 S228P 突變；在 IgG4 鉸鏈區插入此突變防止一般在 IgG4 抗體觀察到之半分子的形成。派姆單抗在各重鏈 Fc 結構域內之 Asn297 經異質性糖基化，產生完整抗體大約 149 kDa 之分子量。派姆單抗之優勢糖化形式係經岩藻糖基化之無半乳糖雙觸角聚糖形式 (G0F)。

【0711】在一實施例中，PD-1 抑制劑包含由 SEQ ID NO:137 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:138 給出之輕鏈。在一

實施例中，PD-1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:137及SEQ ID NO:138所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:137及SEQ ID NO:138所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:137及SEQ ID NO:138所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:137及SEQ ID NO:138所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:137及SEQ ID NO:138所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:137及SEQ ID NO:138所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。代表性序列列於表17。

【0712】在一實施例中，PD-1抑制劑包含派姆單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:139所示之序列且PD-1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:140所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:139及SEQ ID NO:140所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:139及SEQ ID NO:140所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，

PD-1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:139 及 SEQ ID NO:140 所示序列具有至少 97% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，PD-1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:139 及 SEQ ID NO:140 所示序列具有至少 96% 一致性之 V_H 及 V_L 區。在一實施例中，PD-1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:139 及 SEQ ID NO:140 所示序列具有至少 95% 一致性之 V_H 及 V_L 區。

【0713】在一實施例中，PD-1 抑制劑包含具有分別如 SEQ ID NO:141、SEQ ID NO:142 及 SEQ ID NO:143 所示之序列的重鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如 SEQ ID NO:144、SEQ ID NO:145 及 SEQ ID NO:146 所示之序列的輕鏈 CDR1、CDR2 及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，抗體和任何前述抗體競爭與 PD-1 上之相同表位的結合及/或與任何前述抗體所結合之 PD-1 上的相同表位結合。

【0714】在一實施例中，PD-1 抑制劑係藥物主管機關參照派姆單抗所核准的抗 PD-1 生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係派姆單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實

施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之抗 PD-1 抗體，其中該抗 PD-1 抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係派姆單抗。抗 PD-1 抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及 / 或 歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係派姆單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係派姆單抗。

表 17. 與派姆單抗相關之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:137 派姆單抗重鏈 | QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK | 60 120 180 240 300 360 420 447 |
| SEQ ID NO:138 派姆單抗輕鏈 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLAAYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPRKAV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLV STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC | 60 120 180 218 |
| SEQ ID NO:139 派姆單抗 可變重鏈 | QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS | 60 120 |
| SEQ ID NO:140 派姆單抗 可變輕鏈 | EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLAAYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K | 60 111 |
| SEQ ID NO:141 派姆單抗重鏈 CDR1 | NYYMY | 5 |
| SEQ ID NO:142 派姆單抗重鏈 CDR2 | GINPSNGGTN FNEKFK | 16 |
| SEQ ID NO:143 派姆單抗重鏈 CDR3 | RDYRFDMGFD Y | 11 |
| SEQ ID NO:144 派姆單抗輕鏈 CDR1 | RASKGVSTSG YSYLH | 15 |
| SEQ ID NO:145 派姆單抗輕鏈 CDR2 | LASYLES | 7 |
| SEQ ID NO:146 派姆單抗輕鏈 CDR3 | QHSRDLPLT | 9 |

【0715】在一實施例中，PD-1抑制劑係市售抗PD-1單株抗體，諸如抗-m-PD-1克隆J43(Cat # BE0033-2)及RMP1-14(Cat # BE0146)(Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH, USA)。一些市售抗PD-1抗體係所屬技術領域中具有通常知識者已知。

【0716】在一實施例中，PD-1抑制劑係揭示於美國專利第8,354,509號或美國專利申請公開案號2010/0266617

A1、2013/0108651 A1、2013/0109843 A2(彼等揭露以引用方式併入本文中)之抗體。在一實施例中，PD-1抑制劑係描述於美國專利第8,287,856、8,580,247及8,168,757號及美國專利申請公開案第2009/0028857 A1、2010/0285013 A1、2013/0022600 A1及2011/0008369 A1號(彼等教示藉此以引用方式併入本文中)之抗PD-1抗體。在另一實施例中，PD-1抑制劑係揭示於美國專利第8,735,553 B1號(其揭露以引用方式併入本文中)之抗PD-1抗體。在一實施例中，PD-1抑制劑係匹利珠單抗(亦稱為CT-011)，其係描述於美國專利第8,686,119號(其揭露以引用方式併入本文中)。

【0717】在一實施例中，PD-1抑制劑可為小分子或肽或肽衍生物(諸如該些描述於美國專利第8,907,053；9,096,642及9,044,442號及美國專利申請公開案第US 2015/0087581號者)；1,2,4-噁二唑化合物及衍生物(諸如該些描述於美國專利申請公開案第2015/0073024號者)；環狀擬肽化合物及衍生物(諸如該些描述於美國專利申請公開案第US 2015/0073042號)；環狀化合物及衍生物(諸如該些描述於美國專利申請公開案第US 2015/0125491號者)；1,3,4-噁二唑及1,3,4-噻二唑化合物及衍生物(諸如該些描述於國際專利申請案公開號WO 2015/033301者)；基於肽之化合物及衍生物(諸如該些描述於國際專利申請公開案號WO 2015/036927及WO 2015/04490者)或基於巨環肽之化合物及衍生物(諸如該些描述於美國專利申請公開案第US

2014/0294898號者)；彼等各者揭露全文特此以引用方式併入本文中。

【0718】在一實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑可為所屬技術領域中已知之任何PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑。具體而言，其係下列段落詳述之PD-L1或PD-L2抑制劑、拮抗劑或阻斷劑之一者。參照PD-L1及PD-L2抑制劑之用語「抑制劑(inhibitor)」、「拮抗劑(antagonist)」及「阻斷劑(blocker)」在本文中可互換使用。為了避免疑義，在本文中提及係為抗體之PD-L1或PD-L2抑制劑可指化合物或其抗原結合片段、變體、接合物或生物類似物。為了避免疑義，在本文中提及PD-L1或PD-L2抑制劑可指化合物或其醫藥上可接受之鹽、酯、溶劑合物、水合物、共晶體或前藥。

【0719】在一些實施例中，本文所述之組成物、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抑制劑係小分子。在一較佳實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑係抗體(即，抗PD-1抗體)、其片段(包括Fab片段)或其單鏈可變片段(scFv)。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑係多株抗體。在較佳實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑係單株抗體。在一些實施例中，PD-L1或PD-L2抑制劑與PD-L1或PD-L2競爭結合及/或與PD-L1或PD-L2上之表位結合。在一實施例中，抗體與PD-L1或PD-L2競爭結合及/或與PD-L1或PD-L2上之表位結合。

【0720】在一些實施例中，在本文中提供之PD-L1抑

制劑對PD-L1具選擇性，即該化合物以實質上低於彼等與其他受體(包括PD-L2受體)結合或交互作用之濃度與PD-L1結合或交互作用。在某些實施例中，化合物與PD-L1受體結合之結合常數係與PD-L2受體結合之至少約2倍較高濃度、約3倍較高濃度、約5倍較高濃度、約10倍較高濃度、約20倍較高濃度、約30倍較高濃度、約50倍較高濃度、約100倍較高濃度、約200倍較高濃度、約300倍較高濃度或約500倍較高濃度。

【0721】在一些實施例中，在本文中提供之PD-L2抑制劑對PD-L2具選擇性，即該化合物以實質上低於彼等與其他受體(包括PD-L1受體)結合或交互作用之濃度與PD-L2結合或交互作用。在某些實施例中，化合物與PD-L2受體結合之結合常數係與PD-L1受體結合之至少約2倍較高濃度、約3倍較高濃度、約5倍較高濃度、約10倍較高濃度、約20倍較高濃度、約30倍較高濃度、約50倍較高濃度、約100倍較高濃度、約200倍較高濃度、約300倍較高濃度或約500倍較高濃度。

【0722】在不受任何理論束縛下，據信腫瘤細胞表現PD-L1且T細胞表現PD-1。然而，腫瘤細胞之PD-L1表現不是PD-1或PD-L1抑制劑或阻斷劑療效所必要。在一實施例中，腫瘤細胞表現PD-L1。在另一實施例中，腫瘤細胞不表現PD-L1。在一些實施例中，本文所述之方法及組成物包括PD-1及PD-L1抗體之組合(諸如該些在本文中描述者)與TIL之組合。PD-1及PD-L1抗體及TIL之組合可同時或依

序授予。

【0723】 在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約100 pM或較低之 K_D 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約90 pM或較低之 K_D 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約80 pM或較低之 K_D 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約70 pM或較低之 K_D 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約60 pM或較低之 K_D 、以約50 pM或較低之 K_D 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約40 pM或較低之 K_D 與人PD-L1及/或PD-L2結合或以約30 pM或較低之 KD 與人PD-L1及/或PD-L2結合之PD-L1及/或PD-L2抑制劑。

【0724】 在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約 7.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約 8×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約 8.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約 9×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-L1及/或PD-L2結合、以約 9.5×10^5 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-L1及/或PD-L2結合或以約 1×10^6 1/M·s或更快之 $k_{\text{結合}}$ 與人PD-L1及/或PD-L2結合之PD-L1及/或PD-L2抑制劑。

【0725】 在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約 2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-L1或PD-L2結合、以約 2.1×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.2×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.3×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.4×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1結合、以約 2.5×10^{-5} 1/s或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人PD-1

結合、以約 2.6×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人 PD-1 結合、以約 2.7×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人 PD-L1 或 PD-L2 結合或以約 3×10^{-5} 1/s 或更慢之 $k_{\text{解離}}$ 與人 PD-L1 或 PD-L2 結合之 PD-L1 及 / 或 PD-L2 抑制劑。

【0726】 在一些實施例中，所述之組成物及方法包括以約 10 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 9 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 8 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 7 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 6 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 5 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 4 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 3 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；以約 2 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合；或以約 1 nM 或較低之 IC_{50} 阻斷或抑制人 PD-L1 或人 PD-L2 與人 PD-1 結合之 PD-L1 及 / 或 PD-L2 抑制劑。

【0727】 在一實施例中，PD-L1 抑制劑係德瓦魯單抗，亦稱為 MEDI4736 (AstraZeneca plc. 的子公司 Medimmune, LLC, Gaithersburg, Maryland 市售) 或其抗原結合片段、接合物或變體。在一實施例中，PD-L1 抑制劑係揭示於美國專利第 8,779,108 號或美國專利申請公開案號 2013/0034559 (彼等揭露以引用方式併入本文中) 之抗體。

德瓦魯單抗之臨床療效以描述於 Page, *et al.*, *Ann. Rev. Med.*, **2014**, 65:185-202 ; Brahmer, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32:5s(補篇, 摘要 8021) ; 及 McDermott, *et al.*, *Cancer Treatment Rev.*, **2014**, 40:1056-64。德瓦魯單抗之製備及性質係描述於美國專利第 8,779,108 號, 其揭露以引用方式併入本文中。德瓦魯單抗之胺基酸序列係如表 18 所示。德瓦魯單抗單株抗體包括位於 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'' 之雙硫鍵 ; 及位於 Asn-301 及 Asn-301'' 之 N-糖基化位點。

【0728】在一實施例中, PD-L1 抑制劑包含由 SEQ ID NO:147 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:148 給出之輕鏈。在一實施例中, PD-L1 抑制劑包含分別具有 SEQ ID NO:147 及 SEQ ID NO:148 所示序列之重鏈及輕鏈, 或彼等之抗原結合片段、Fab 片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中, PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:147 及 SEQ ID NO:148 所示序列具有至少 99% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中, PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:147 及 SEQ ID NO:148 所示序列具有至少 98% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中, PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:147 及 SEQ ID NO:148 所示序列具有至少 97% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中, PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:147 及 SEQ ID NO:148

所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:147及SEQ ID NO:148所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0729】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含德瓦魯單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:149所示之序列且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:150所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:149及SEQ ID NO:150所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:149及SEQ ID NO:150所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:149及SEQ ID NO:150所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:149及SEQ ID NO:150所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:149及SEQ ID NO:150所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0730】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含具有分別如SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:152及SEQ ID NO:153所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:155及SEQ ID NO:156所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2

及 CDR3 結構域及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，抗體和任何前述抗體競爭與 PD-L1 上之相同表位的結合及 / 或與任何前述抗體所結合之 PD-L1 上的相同表位結合。

【0731】在一實施例中，PD-L1 抑制劑係藥物主管機關參照德瓦魯單抗所核准的抗 PD-L1 生物類似物單株抗體。在一實施例中，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) 之胺基酸序列，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係德瓦魯單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之抗 PD-L1 抗體，其中該抗 PD-L1 抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係德瓦魯單抗。抗 PD-L1 抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及 / 或歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係德瓦魯單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係德瓦魯單抗。

表 18. 與德瓦魯單抗相關之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:147 德瓦魯單抗 重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEALFDY WGQGTTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451 |
| SEQ ID NO:148 德瓦魯單抗 輕鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265 |
| SEQ ID NO:149 德瓦魯單抗 可變重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEALFDY WGQGTTLVTVS 120 S 121 |
| SEQ ID NO:150 德瓦魯單抗 可變輕鏈 | EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108 |
| SEQ ID NO:151 德瓦魯單抗 重鏈CDR1 | RYWMS 5 |
| SEQ ID NO:152 德瓦魯單抗 重鏈CDR2 | NIKQDGSEKY YVDSVKG 17 |
| SEQ ID NO:153 德瓦魯單抗 重鏈CDR3 | EGWFGELAF DY 12 |
| SEQ ID NO:154 德瓦魯單抗 輕鏈CDR1 | RASQRVSSSY LA 12 |
| SEQ ID NO:155 德瓦魯單抗 輕鏈CDR2 | DASSRAT 7 |
| SEQ ID NO:156 德瓦魯單抗 輕鏈CDR3 | QQYGSLPWT 9 |

【0732】在一實施例中，PD-L1抑制劑係艾維路單抗，亦稱為MSB0010718C(Merck KGaA/EMD Serono市售)或其抗原結合片段、接合物或變體。艾維路單抗之製備及性質係描述於美國專利申請公開案第US 2014/0341917 A1

號，其揭露特別以引用方式併入本文中。艾維路單抗之胺基酸序列係如表 19 所示。艾維路單抗具有位於 22-96、147-203、264-324、370-428、22''-96''、147''-203''、264''-324'' 及 370''-428'' 之重鏈內雙硫鍵 (C23-C104)；位於 22'-90'、138'-197'、22'''-90''' 及 138'''-197''' 之輕鏈內雙硫鍵 (C23-C104)；位於 223-215' 及 223''-215'' 之重鏈-輕鏈內雙硫鍵 (h 5-CL 126)；位於 229-229'' 及 232-232'' 之重鏈-重鏈內雙硫鍵 (h 11, h 14)；位於 300、300'' 之 N-糖基化位點 (H CH₂ N84.4)；岩藻糖基化複合物雙觸角 CHO 型聚糖；及位於 450 及 450' 之 H CHS K2 C 端離胺酸截斷。

【0733】在一實施例中，PD-L1 抑制劑包含由 SEQ ID NO:157 給出之重鏈及由 SEQ ID NO:158 給出之輕鏈。在一實施例中，PD-L1 抑制劑包含分別具有 SEQ ID NO:157 及 SEQ ID NO:158 所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab 片段、單鏈可變片段 (scFv)、變體或接合物。在一實施例中，PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:157 及 SEQ ID NO:158 所示序列具有至少 99% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:157 及 SEQ ID NO:158 所示序列具有至少 98% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:157 及 SEQ ID NO:158 所示序列具有至少 97% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1 抑制劑包含各自分別與 SEQ ID NO:157 及 SEQ ID NO:158 所示序列具有至少 96% 一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例

中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:157及SEQ ID NO:158所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0734】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含艾維路單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:159所示之序列且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:160所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:159及SEQ ID NO:160所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:160及SEQ ID NO:160所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:159及SEQ ID NO:160所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:159及SEQ ID NO:160所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:159及SEQ ID NO:160所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0735】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含具有分別如SEQ ID NO:161、SEQ ID NO:162及SEQ ID NO:163所示之序列的重鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如SEQ ID NO:164、SEQ ID NO:165及SEQ ID NO:166所示之序列的輕鏈CDR1、CDR2及CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例

中，抗體和任何前述抗體競爭與PD-L1上之相同表位的結合及/或與任何前述抗體所結合之PD-L1上的相同表位結合。

【0736】在一實施例中，PD-L1抑制劑係藥物主管機關參照艾維路單抗所核准的抗PD-L1生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係艾維路單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醮化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之抗PD-L1抗體，其中該抗PD-L1抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係艾維路單抗。抗PD-L1抗體可獲得藥物主管機關諸如美國FDA及/或歐盟的EMA授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係艾維路單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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

係艾維路單抗。

表 19. 與艾維路單抗相關之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:157 艾維路單抗 重鏈 | EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWRQA PGKLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYTKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 60 120 180 240 300 360 420 450 |
| SEQ ID NO:158 艾維路單抗 輕鏈 | QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIDVSNRPSGV SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSTRV FGTGKVTVL GQPKANPTVT LFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTES | 60 120 180 216 |
| SEQ ID NO:159 艾維路單抗 可變重鏈 | EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWRQA PGKLEWVSS IYPSGGITFY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGLVTVSS | 60 120 |
| SEQ ID NO:160 艾維路單抗 可變輕鏈 | QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLMIDVSNRPSGV SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSTRV FGTGKVTVL | 60 110 |
| SEQ ID NO:161 艾維路單抗 重鏈CDR1 | SYIMM | 5 |
| SEQ ID NO:162 艾維路單抗 重鏈CDR2 | SIYPSGGITF YADTVKG | 17 |
| SEQ ID NO:163 艾維路單抗 重鏈CDR3 | IKLGTVTTVD Y | 11 |
| SEQ ID NO:164 艾維路單抗 輕鏈CDR1 | TGTSSDVGGY NYVS | 14 |
| SEQ ID NO:165 艾維路單抗 輕鏈CDR2 | DVSNRPS | 7 |
| SEQ ID NO:166 艾維路單抗 輕鏈CDR3 | SSYTSSTRV | 10 |

【0737】在一實施例中，PD-L1抑制劑係阿特珠單抗，亦稱為MPDL3280A或RG7446(Roche Holding AG, Basel, Switzerland的子公司Genentech, Inc.以TECENTRIQ市售)或其抗原結合片段、接合物或變體。在一實施例中，PD-L1抑制劑係揭示於美國專利第8,217,149號(其揭露

特別以引用方式併入本文中)之抗體。在一實施例中，PD-L1抑制劑係揭示於美國專利申請公開案第2010/0203056 A1、2013/0045200 A1、2013/0045201 A1、2013/0045202 A1或2014/0065135 A1號(彼等揭露特別以引用方式併入本文中)之抗體。阿特珠單抗之製備及性質係描述於美國專利第8,217,149號，其揭露以引用方式併入本文中。阿特珠單抗之胺基酸序列係如表20所示。阿特珠單抗具有位於22-96、145-201、262-322、368-426、22''-96''、145''-201''、262''-322''及368''-426''之重鏈內雙硫鍵(C23-C104)；位於23'-88'、134'-194'、23'''-88'''及134'''-194'''之輕鏈內雙硫鍵(C23-C104)；位於221-214'及221''-214''之重鏈-輕鏈內雙硫鍵(h 5-CL 126)；位於227-227''及230-230''之重鏈-重鏈內雙硫鍵(h 11, h 14)；及位於298及298'之N-糖基化位點(H CH₂ N84.4>A)。

【0738】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含由SEQ ID NO:167給出之重鏈及由SEQ ID NO:168給出之輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含分別具有SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168所示序列之重鏈及輕鏈，或彼等之抗原結合片段、Fab片段、單鏈可變片段(scFv)、變體或接合物。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168所示序列具有至少99%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168所示序列具有至少98%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含

各自分別與SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168所示序列具有至少97%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168所示序列具有至少96%一致性之重鏈及輕鏈。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:167及SEQ ID NO:168所示序列具有至少95%一致性之重鏈及輕鏈。

【0739】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含阿特珠單抗之重鏈及輕鏈CDR或可變區(VR)。在一實施例中，PD-L1抑制劑重鏈可變區(V_H)包含SEQ ID NO:169所示之序列且PD-L1抑制劑輕鏈可變區(V_L)包含SEQ ID NO:170所示之序列及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:169及SEQ ID NO:170所示序列具有至少99%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:169及SEQ ID NO:170所示序列具有至少98%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:169及SEQ ID NO:170所示序列具有至少97%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:169及SEQ ID NO:170所示序列具有至少96%一致性之V_H及V_L區。在一實施例中，PD-L1抑制劑包含各自分別與SEQ ID NO:169及SEQ ID NO:170所示序列具有至少95%一致性之V_H及V_L區。

【0740】在一實施例中，PD-L1抑制劑包含具有分別如SEQ ID NO:171、SEQ ID NO:172及SEQ ID NO:173所示

之序列的重鏈 CDR1、CDR2及 CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代，及具有分別如 SEQ ID NO:174、SEQ ID NO:175及 SEQ ID NO:176所示之序列的輕鏈 CDR1、CDR2及 CDR3結構域及彼等之保守性胺基酸取代。在一實施例中，抗體和任何前述抗體競爭與 PD-L1上之相同表位的結合及/或與任何前述抗體所結合之 PD-L1上的相同表位結合。

【0741】在一實施例中，抗 PD-L1抗體係藥物主管機關參照阿特珠單抗所核准的抗 PD-L1生物類似物單株抗體。在一實施例中，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)之胺基酸序列，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係阿特珠單抗。在一些實施例中，該一或多個轉譯後修飾係選自下列一或多者：醣化、氧化、脫醯胺及截短。在一些實施例中，生物類似物係獲得授權或申請授權之抗 PD-L1抗體，其中該抗 PD-L1抗體係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，其中該參考藥品或參考生物產品係阿特珠單抗。抗 PD-L1抗體可獲得藥物主管機關諸如美國 FDA 及/或歐盟的 EMA 授權。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係阿特殊單抗。在一些實施例中，生物類似物係提供為進一步包含一或多種賦形劑之組成物，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係阿特殊單抗。

表 20. 與阿特殊單抗相關之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:167 阿特殊單抗 重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWRQA PGKGLEWVAV 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 NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK | 60 120 180 240 300 360 420 448 |
| SEQ ID NO:168 阿特殊單抗 輕鏈 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC | 60 120 180 214 |
| SEQ ID NO:169 阿特殊單抗 可變重鏈 | EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWRQA PGKGLEWVAV ISPYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA | 60 118 |
| SEQ ID NO:170 阿特殊單抗 可變輕鏈 | DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR | 60 108 |
| SEQ ID NO:171 阿特殊單抗 重鏈CDR1 | GFTFSDSWIH | 10 |
| SEQ ID NO:172 阿特殊單抗 重鏈CDR2 | AWISPYGGST YYADSVKG | 18 |
| SEQ ID NO:173 阿特殊單抗 重鏈CDR3 | RHWPGGFDY | 9 |
| SEQ ID NO:174 阿特殊單抗 輕鏈CDR1 | RASQDVSTAV A | 11 |
| SEQ ID NO:175 阿特殊單抗 輕鏈CDR2 | SASFLYS | 7 |
| SEQ ID NO:176 阿特殊單抗 輕鏈CDR3 | QQYLYHPAT | 9 |

【0742】雖然本發明之較佳實施例係在本文中顯示及

描述，該等實施例僅舉例提供且不意圖以其他方式限制本發明之範圍。本發明之所述實施例的各種替代可用於實行本發明。因此，隨附之權利要求的精神與範圍不應被限制於本文含有之較佳版本之說明。

【0743】 讀者的注意力被引導至與本說明書同時送件之所有文獻及文件且彼等與本說明書開放給大眾檢視，並且所有該等文獻及文件的內容以引用方式併入本文中。在說明書中揭示之所有特徵(包括任何隨附之請求項、摘要及圖式)可經具有相同、等效或類似目的之替代特徵置換，除非以其他方式明確陳述。因此，除非以其他方式明確陳述，所揭示之各特徵僅係通用的等效或類似特徵系列之一個實例。

實例

【0744】 在本文中涵蓋的實施例現在參照下列實例描述。這些實例僅為說明之目的而提供，在本文中涵蓋的本揭露不應被視為受到這些實例之限制，反而應視為包含任何及所有因此處所提供之教示而變得明顯之變異。

實例 1. 製備用於 REP 前及 REP 過程的培養基。

【0745】 此實例描述用於製備組織培養基之程序，該等組織培養基使用於涉及培養衍生自各種腫瘤類型包括但不限於轉移性黑色素瘤、頭頸鱗狀細胞癌(HNSCC)、卵巢癌、三陰性乳癌及肺腺癌的腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之

規程。此培養基可用於製備本申請案及實例中所述之任何 TIL。

CM1之製備

【0746】將下列試劑移出冷藏並使彼等在37°C水浴中溫熱：(RPMI1640、人AB血清、200 mM L-麩醯胺酸)。根據下表21，藉由添加各成分至所欲過濾之體積適當的0.2 μm過濾器單位的頂部來製備CM1培養基。儲存在4°C下。

表 21. CM1之製備

| 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， 熱失活10% | 50 mL | 100 mL | |
| 200mM L- 麩醯胺酸 | 2 mM | 5 mL | 10 mL |
| 55mM BME | 55 μM | 0.5 mL | 1 mL |
| 50mg/ml 硫酸建它黴素 | 50 μg/ml | 0.5 mL | 1 mL |

【0747】在使用當天，在37°C水浴中預溫熱所需量的CM1並添加6000 IU/mL IL-2。

【0748】根據表22視需要額外補充。

表 22. CM1之額外補充(視需要)。

| 補充物 | 原液濃度 | 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 |
| 兩性黴素B | 250 μg/mL | 1:100 | 2.5μg/mL |

CM2之製備

【0749】將製備好的CM1自冰箱移出或如上述製備新鮮CM1。自冰箱移出AIM-V®，將製備好的CM1與等體積的AIM-V®在無菌培養基瓶中混合來製備所需量的CM2。在使用當天添加3000 IU/mL IL-2至CM2培養基。在使用當天製作足量的含3000 IU/mL IL-2之CM2。將CM2培養基瓶標示名稱、製備者首字母、過濾/製備日期、二週到期日並儲存在4°C下直到需要用於組織培養為止。

CM3之製備

【0750】在需要使用的當天製備CM3。CM3與AIM-V®培養基相同，在使用當天補充3000 IU/mL IL-2。藉由直接添加IL-2原液至AIM-V的瓶或袋中，製備足夠實驗需要的CM3量。藉由溫和震盪混合均勻。在添加至AIM-V後，立即在瓶上標示「3000 IU/mL IL-2」。如果有過量的CM3，將其儲存在瓶中在4°C下，並標示培養基名稱、製備者首字母、培養基製備日期及其到期日(製備後7天)。補充有IL-2之培養基在4°C下儲存7天後丟棄。

CM4之製備

【0751】CM4與CM3相同，但額外補充2 mM GlutaMAX™(最終濃度)。在每1L的CM3中添加10ml的200 mM GlutaMAX™。藉由直接添加IL-2原液及GlutaMAX™原液至AIM-V的瓶或袋中，製備足夠實驗需要的CM4量。

藉由溫和震盪混合均勻。在添加至 AIM-V 後，立即在瓶上標示「3000 IL/mL IL-2 及 GlutaMAX」。如果有過量的 CM4，將其儲存在瓶中在 4°C 下，並標示培養基名稱、「GlutaMAX」及其到期日(製備後 7 天)。補充有 IL-2 之培養基在 4°C 下儲存 7 天後丟棄。

實例 2. 使用 IL-2、IL-15 及 IL-21 細胞介素雞尾酒。

【0752】此實例描述使用 IL-2、IL-15 及 IL-21 細胞介素(彼等作為額外的 T 細胞生長因子)與本文中任何實例或實施例之 TIL 過程之組合，包括涵蓋腫瘤組織或腫瘤片段之冷凍保存的實例及實施例。

【0753】使用在本文中描述之過程，在實驗的一組中，TIL 係在 IL-2 存在下生長自結直腸腫瘤、黑色素瘤、子宮頸腫瘤、三陰性乳房腫瘤、肺臟腫瘤及腎臟腫瘤，且在另一組中在培養起始時以 IL-2、IL-15 及 IL-21 之組合代替 IL-2。在 REP 前完成時，評估培養的擴增、表型、功能(CD107a⁺及 IFN- γ)及 TCR V β 貯庫。IL-15 及 IL-21 係在本文他處及可見於 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/> 之 Gruijl, *et al.*, IL-21 promotes the expansion of CD27⁺CD28⁺tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells, Santegoets, S. J., *J. Transl Med.*, 11:37(2013) 中描述。

【0754】結果顯示相對於僅 IL-2 條件下，在 IL-2、IL-

15及IL-21處理條件下觀察到多個組織中的CD4⁺及CD8⁺兩種細胞中之TIL擴增增強(>20%)。相對於僅IL-2培養，獲自IL-2、IL-15及IL-21處理培養之TIL偏向以富含TCR Vβ貯庫之CD8⁺族群為主。相較於僅IL-2處理之TIL，IL-2、IL-15及IL-21處理之TIL的IFN-γ及CD107A上升。

實例3.製備IL-2原液。

【0755】此實例描述將經純化、冷凍乾燥的重組人介白素-2溶解成適用於進一步組織培養規程之原液樣本的過程，包括所有該些於本申請案及實例所述者，包括該些涉及使用rhIL-2者。

程序

【0756】製備0.2%乙酸溶液(HAc)。將29 mL無菌水轉移至50 mL錐形管。添加1 mL 1N(1當量濃度)乙酸至50 mL錐形管。倒轉管2至3次以混合均勻。將HAc溶液藉由使用Steriflip過濾器過濾滅菌。

【0757】製備含1% HSA的PBS。添加4 mL的25% HSA原液至於150 mL無菌過濾器單位中之96 mL PBS。過濾溶液。儲存在4°C下。對於所製備的各小瓶rhIL-2，填寫表格。

【0758】製備rhIL-2原液(6×10^6 IU/mL最終濃度)。每批rhIL-2皆不同且需要廠商檢驗證明書(COA)中提供的資訊，諸如：1)rhIL-2的每小瓶質量(mg)、2)rhIL-2的比活

性 (IU/mg) 及 3) 建議 0.2% HAc 重構體積 (mL)。

【0759】使用以下公式計算 rhIL-2 批量所需的 1% HSA 體積：

$$\left(\frac{\text{小瓶質量 (mg)} \times \text{生物活性 } \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}}\right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc 體積 (mL)} = 1\% \text{ HSA 體積 (mL)}$$

【0760】例如，根據 CellGenix 的 rhIL-2 批量 10200121 COA，1 mg 小瓶的比活性為 25×10^6 IU/mg。建議將 rhIL-2 重構於 2 mL 0.2% HAc 中。

$$\left(\frac{1 \text{mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2 \text{mL} = 2.167 \text{mL HSA}$$

【0761】用酒精棉擦拭 IL-2 小瓶的橡膠瓶塞。使用附接至 3 mL 注射器的 16G 針頭，注射建議體積的 0.2% HAc 至小瓶中。在抽出針頭時，小心不要使瓶塞脫出。倒轉小瓶 3 次且渦漩直到所有粉末溶解。小心移除瓶塞且放在一旁的酒精棉上。添加經計算體積的 1% HSA 至小瓶。

【0762】rhIL-2 溶液的儲存。短期儲存時 (<72 hrs)，將小瓶儲存在 4°C 下。長期儲存時 (>72 hrs)，將小瓶等分成更小體積且儲存在 -20°C 冷凍小瓶中，直到準備使用為止。避免冷凍/解凍循環。製備日期後 6 個月到期。Rh-IL-2 標籤包括供應商及目錄編號、批號、到期日、作業者首字母、等分試樣的濃度及體積。

實例 4.TIL 冷凍保存程序。

【0763】此實例描述使用 CryoMed 控速冷凍器型號 7454(Thermo Scientific)，將實例 5 中所述之簡化密閉程序製備的 TIL 冷凍保存的過程方法。

【0764】使用的設備如下：鋁盒固定架(與 CS750 冷凍袋相容)、750 mL 袋子的冷凍儲存盒、低壓(22 psi)液態氮瓶、冰箱、熱電偶感測器(用於袋子的帶型)及 CryoStore CS750 冷凍袋(OriGen Scientific)。

【0765】冷凍過程提供 0.5°C 速率從成核到 -20°C 及每分鐘 1°C 到 -80°C 終末溫度的冷卻速率。程式參數如下：步驟 1 - 在 4°C 下等待；步驟 2：1.0°C /min(樣本溫度)到 -4°C；步驟 3：20.0°C /min(室溫度)到 -45°C；步驟 4：10.0°C /min(室溫度)到 -10.0°C；步驟 5：0.5°C /min(室溫度)到 -20°C；及步驟 6：1.0°C /min(樣本溫度)到 -80°C。

實例 5.使用密閉系統產生經冷凍保存之 TIL 細胞療法。

【0766】此實例描述根據現行人體細胞組織優良操作規範及現行藥品優良製造規範在氣體可通透容器諸如 G-Rex 培養瓶(Wilson Wolf Manufacturing Corp., New Brighton, MN, USA)中之 TIL 細胞療法過程 cGMP 製造程序。此材料將依照 US FDA 藥品優良製造規範法規(21 CFR 第 210、211、1270 及 1271 部分)製造，第 I 期至商用材料適用 ICH Q7 標準。此方法可與本文所述之腫瘤冷凍保存及解

凍過程組合。

【0767】過程摘要提供於下表23。

表23. 過程摘要。

| 預估天數 (接種後) | 活性 | 目標標準 | 預期容器 | 預估總 體積 (mL) |
|---------------|-------|---|------------------------|-------------------|
| 0 | 腫瘤分割 | 每個G-Rex100MCS中≤ 50個所欲腫瘤片段 | G-Rex100MCS 1個培養瓶 | ≤1000 |
| 11 | REP接種 | 每個G-Rex500MCS中5至 200 x 10 ⁶ 個存活細胞 | G-Rex500MCS 1個培養瓶 | ≤5000 |
| 16 | REP分瓶 | 每個G-Rex500MCS中 1 x 10 ⁹ 個存活細胞 | G-Rex500MCS ≤ 5個培養瓶 | ≤25000 |
| 22 | 收集 | 總可用細胞 | 3至4個CS-750袋子 | ≤530 |

【0768】在此實例中，假設 1.0 mL/L=1.0 g/kg，除非另外指明。一旦打開後，下列到期日適用於 2°C 至 8°C 下：人血清 AB 型 (HI) Gemini，1 個月；2-巰乙醇，1 個月。硫酸建它黴素 50 mg/mL 原液可在室溫下保持 1 個月。含有 10L 的 AIM-V 培養基之袋子僅可在使用前至多 24 小時在室溫下溫熱一次。在第 22 天收集期間，可使用二個 Gatherex™ 泵收集來自 G-Rex500MCS 培養瓶的 TIL。

第 0 天 - CM1 培養基製備

【0769】製備 RPMI 1640 培養基。在 BSC 中，使用適當大小的吸管，自 1000 mL RPMI 1640 培養基中移出 100.0 mL 並放入標示「廢棄物」的適當大小容器。

【0770】在 BSC 中，添加試劑至 RPMI 1640 培養基瓶。添加表 21 顯示之下列試劑至 RPMI 1640 培養基瓶。記

錄添加的體積。每瓶添加的量：熱去活化人AB血清(100.0 mL)； GlutaMax(10.0 mL)； 硫酸建它黴素 50 mg/mL(1.0 mL)； 2-巰乙醇(1.0 mL)。

【0771】將RPMI 1640培養基瓶加蓋並將瓶渦漩以確保試劑混合徹底。將RPMI 1640培養基過濾通過1L 0.22微米過濾器單位。標示過濾培養基。無菌加蓋過濾培養基及標示。

【0772】解凍一個1.1 mL IL-2等分試樣(6×10^6 IU/mL)(BR71424)直到所有冰融化。將IL-2原液轉移至培養基。在BSC中，將1.0 mL的IL-2原液轉移至上述製備的CM1第0天培養基瓶。添加CM1第0天培養基1瓶及IL-2(6×10^6 IU/mL)1.0 mL。將瓶加蓋並渦漩以混合含有IL-2之培養基。重新標示為「完全CM1第0天培養基」。

【0773】使用適當大小的吸管移出20.0 mL的培養基並分配至50mL錐形管。在BSC中，將25.0 mL的「完全CM1第0天培養基」轉移至50 mL錐形管。將管標示為「組織片」。將G-Rex100MCS(W3013130)無菌地傳遞至BSC中。在BSC中，關閉所有G-Rex100MCS上的管夾，只剩通氣孔過濾器的管夾打開。將G-Rex100MCS培養瓶的紅色管線經由魯爾連接連接至repeater泵流體轉移組(W3009497)的較大直徑端。將Baxa泵緊鄰BSC裝設。將repeater泵流體轉移組的泵管路部分從BSC移出並安裝至repeater泵中。在BSC內，移除Pumpmatic Liquid-Dispensing System(PLDS)(W3012720)的注射器並丟棄。

【0774】將PLDS吸管經由魯爾連接連接至repeater泵流體轉移組的較小直徑端，並將吸管尖放入「完全CM1第0天培養基」中進行抽吸。打開培養基與G-Rex100MCS之間的所有管夾。泵送完全CM1培養基至G-Rex100MCS培養瓶中。設定泵速至「高」及「9」並將所有完全CM1第0天培養基泵送至G-Rex100MCS培養瓶中。一旦所有培養基皆轉移後，清除管線並停止泵。

【0775】將泵與培養瓶的連接斷開。確保培養瓶上的所有管夾皆關閉，但通氣孔過濾器除外。將repeater泵流體轉移組自紅色培養基管線移除，並將紅色蓋子(W3012845)蓋在紅色培養基管線上。將G-Rex100MCS培養瓶自BSC移出，熱封紅色管線靠近末端魯爾的紅色蓋子。培育箱參數：37.0±2.0℃；CO₂百分比：5.0±1.5%CO₂。

【0776】將50mL錐形管放入培育箱中≥30分鐘進行溫熱。

第0天-腫瘤洗滌培養基製備

【0777】添加建它黴素至HBSS。在BSC中，添加5.0 mL建它黴素(W3009832或W3012735)至1 × 500 mL HBSS培養基(W3013128)瓶中。記錄體積。每瓶添加：HBSS(500.0 mL)；硫酸建它黴素50 mg/ml(5.0 mL)。徹底混合試劑。將含建它黴素之HBSS過濾通過1L 0.22微米(0.22 μm)過濾器單位(W1218810)。無菌地將過濾培養基加蓋且標示下列資訊。

第0天-腫瘤處理

【0778】(自經冷凍保存之腫瘤)獲得腫瘤樣品並立即轉移至在2°C至8°C下的套件(suite)進行處理並記錄腫瘤資訊。

【0779】在2°C至8°C下洗滌腫瘤樣品三次，每次洗滌輕柔攪動至少3分鐘。每次洗滌後移除洗滌溶液並置換成新鮮溶液。

【0780】使用移液吸管，將4滴來自錐形管之腫瘤洗滌培養基放入6孔板向上翻轉的蓋子(2個蓋子)上的6個圓圈之各者中。二個圓圈多放一滴，總共50滴。

【0781】腫瘤洗滌3：使用鑷子，將腫瘤自「洗滌2」培養皿移出並轉移至「洗滌3」培養皿。使用鑷子，藉由輕柔攪拌洗滌腫瘤樣品並允許其靜置 ≥ 3 分鐘。記錄時間。

【0782】在150 mm培養皿蓋子下方放置一支尺。使用鑷子，將腫瘤樣品無菌地轉移至150 mm分割培養皿蓋子。將所有腫瘤樣品片端對端排列並記錄大約整體長度及片段數量。評估腫瘤的壞死/脂肪組織。評估是否觀察到 $>30\%$ 的整體腫瘤區域為壞死及/或脂肪組織；如果是的話，確保腫瘤如果如此繼續進行的話具有適當大小。評估是否觀察到 $<30\%$ 的整體腫瘤區域為壞死或脂肪組織；如果是的話，則繼續進行。

【0783】清除分割。如果腫瘤大且觀察到 $>30\%$ 的組織外部為壞死/脂肪，藉由移除壞死/脂肪組織來執行「清

除分割」，同時使用解剖刀及/或鑷子的組合保留腫瘤內部結構。為了維持腫瘤內部結構，僅使用垂直切割壓力。不以解剖刀進行鋸切動作來切割。

【0784】使用解剖刀及/或鑷子之組合，將腫瘤樣品切割成均勻、適當大小的片段(至多6個中間片段)。為了維持腫瘤內部結構，僅使用垂直切割壓力。同樣地，不以解剖刀進行鋸切動作來切割。保持非分割中間片段完全浸沒於「腫瘤洗滌培養基」中。將各中間片段轉移至「繫留」培養皿。

【0785】一次操作一個中間片段，將腫瘤中間片段在分割培養皿中分割成大小大約 $3 \times 3 \times 3$ mm的片，將每片上的出血、壞死及/或脂肪組織的量最小化。為了維持腫瘤內部結構，僅使用垂直切割壓力。同樣地，不以解剖刀進行鋸切動作來切割。

【0786】選擇至多八(8)個無出血、壞死及/或脂肪組織的腫瘤片。使用尺作為參考。持續分割直到已獲得8個較佳片，或已分割整個中間片段。將各選定片轉移至「腫瘤洗滌培養基」液滴中之一者。

【0787】在從中間片段選擇至多八(8)片之後，將中間片段的殘留物放入「較佳中間片段」6孔板中的新單一孔。

【0788】如果仍有所欲組織，從「較佳中間片段」6孔板選擇額外較佳腫瘤片以最多50片填滿液滴。記錄所產生的分割片的總數。

【0789】將「組織片」50 mL錐形管自培育箱移出。確保錐形管溫熱 ≥ 30 min。將「組織片」50 mL錐形管傳遞至BSC中，確保不破壞開放處理表面的無菌性。

【0790】使用移液吸管、解剖刀、鑷子或組合，將選定的50個最佳腫瘤片段從較佳培養皿蓋子轉移至「組織片」50 mL錐形管。如果腫瘤片在轉移過程中掉落且仍有所欲組織，則添加來自較佳腫瘤中間片段孔的額外片。記錄片數。

【0791】將含有培養基的G-Rex100MCS自培育箱移出。將G-Rex100MCS培養瓶無菌地傳遞至BSC中。當轉移培養瓶時，不要握住容器的蓋子或底部。拿握側邊來轉移容器。在BSC中，將G-Rex100MCS培養瓶蓋子拿掉，確保維持內部管路的無菌性。渦漩含有腫瘤片的錐形管以懸浮，並將內容物快速倒入G-Rex100MCS培養瓶中。確保腫瘤片均勻分布在培養瓶的膜上。如有需要將培養瓶輕柔來回傾斜，以使腫瘤片均勻分布。記錄容器底部膜上的腫瘤片段數量以及所觀察到漂浮在容器中的數量。注意：如果接種片段數量不等於收集的數量，聯絡地區管理，並記載在第10.0節。

【0792】以下列參數培育G-Rex100MCS：培育G-Rex培養瓶：溫度LED顯示： 37.0 ± 2.0 °C；CO₂百分比： 5.0 ± 1.5 % CO₂。執行計算以判定在第11天將G-Rex100MCS移出培育箱的適當時間。計算：培育時間；下限=培育時間+252小時；上限=培育時間+276小時。

第 11 天 - 培養基製備

【0793】 監測培育箱。培育箱參數：溫度 LED 顯示： $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ ； CO_2 百分比： $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。將 3 個 1000 mL RPMI 1640 培養基 (W3013112) 瓶及 3 個 1000 mL AIM-V (W3009501) 瓶在培育箱中溫熱 ≥ 30 分鐘。記錄時間。培養基：RPMI 1640 及 AIM-V。將額外 1 個 1000 mL AIM-V 培養基瓶 (W3009501) 放在室溫下以供進一步使用。

【0794】 當時間到達後，移出 RPMI 1640 培養基。記錄先前步驟的結束培育時間。確保培養基溫熱 ≥ 30 min。在 BSC 中，從三個預溫熱的 1000 mL RPMI 1640 培養基瓶中的每一瓶移出 100.0 mL 並放入標示「廢棄物」的適當大小容器。在 BSC 中，添加下列試劑到三個 RPMI 1640 培養基瓶中的每一瓶，並記錄添加到每一瓶的體積。GemCell 熱去活化 AB 型人類血清 (100.0 mL)、GlutaMax (10.0 mL)、硫酸建它黴素 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (1.0 mL)、2-巰乙醇 (1.0 mL)。

【0795】 將瓶加蓋並渦漩以確保試劑混合徹底。將每一瓶培養基過濾通過分開的 1L 0.22 微米過濾器單位。將過濾培養基無菌地加蓋並將每一瓶標示為 CM1 第 11 天培養基。解凍 3×1.1 mL 等分試樣的 IL-2 (6×10^6 IU/mL) (BR71424) 直到所有冰融化。記錄 IL 2 批號及到期日。

【0796】 將三瓶 AIM-V 培養基自培育箱移出。記錄結束培育時間。確保培養基已溫熱 ≥ 30 分鐘。使用微量吸管，添加 3.0 mL 解凍的 IL-2 至一瓶 1L 預溫熱 AIM-V 培養基

中。在分配IL-2後用培養基潤洗微量吸管尖端。每個等分試樣使用新的無菌微量吸管尖端。記錄總添加體積。將瓶標示為「含有IL-2的AIM-V」。將10L Labtainer袋子及repeater泵轉移組無菌地轉移至BSC中。關閉10L Labtainer袋子上的所有管線。將repeater泵轉移組的較大直徑管路端經由魯爾鎖連接附接至10L Labtainer袋子的中間母埠。

【0797】將Baxa泵緊鄰BSC裝設。將轉移組管路裝入Baxa泵。將Baxa泵設定至「高」及「9」。移除Pumpmatic Liquid-Dispensing System(PLDS)的注射器並丟棄。不破壞PLDS吸管的無菌性。

【0798】將PLDS吸管經由魯爾連接連接至repeater泵流體轉移組的較小直徑端，並將吸管尖放入含有IL-2的AIM-V培養基瓶中進行抽吸。打開培養基瓶與10L Labtainer之間的所有管夾。

【0799】使用PLDS，將製備的含有IL-2的預溫熱AIM-V培養基以及二瓶額外的AIM-V轉移至10L Labtainer袋子中。添加三瓶過濾的CM1第11天培養基。在添加最終瓶後，清除通往袋子的管線。在添加每瓶培養基之間停止泵。將PLDS自轉移組移除並將紅色蓋子蓋在BSC中之管線的魯爾上。輕柔按摩袋子以混合。將培養基袋子標示下列資訊。到期日為自製備日期起的24小時。

【0800】將60 mL注射器附接至「完全CM2第11天培養基」袋子的可用母埠。移出20.0 mL的培養基並放入50 mL錐形管中。將紅色蓋子蓋在「完全CM2第11天培養

基」袋子的母埠上。標示並在2°C至8°C下儲存培養基保留樣本直到提交測試為止。熱封靠近紅色蓋子的轉移組管線上的紅色蓋子。將轉移組保持在袋子上。

【0801】在BSC中，添加4.5 mL的已標示「用於細胞計數稀釋」及批號之AIM-V培養基至四個15mL錐形管。將管標示批號及管編號(1至4)。將4支冷凍小瓶標示「餵養細胞」及小瓶編號(1至4)。將任何剩餘的2-巰乙醇、GlutaMax及人類血清自BSC轉移至2°C至8°C。

【0802】在BSC外，將1L轉移包接合至附接至經製備的「完全CM2第11天培養基」袋子的轉移組。將轉移包標示為「餵養細胞CM2培養基」及批號。在1L轉移包管路離袋子幾英寸處的管路上作一個記號。將空的轉移包放在磅秤上，使得該記號處以上的管路在磅秤上。將磅秤歸零，並將空的轉移包留在磅秤上。

【0803】將Baxa泵設定至「中」及「4」。將500.0±5.0 mL的「完全CM2第11天」培養基泵送至細胞CM2培養基轉移包中。測量重量並記錄添加至轉移包的完全CM2培養基體積。

【0804】一旦填滿，熱封管線。將含轉移組的CM2第11天培養基袋與餵養細胞培養基轉移包分開，將接合保留在1L轉移包。將所製備的「完全CM2第11天培養基」放在培育箱中直到使用。

第11天-TIL收集

【0805】 培育箱參數：溫度LED顯示： $37.0\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ； CO_2 百分比： $5.0\pm 1.5\%$ CO_2 。將G-Rex100MCS自培育箱移出前，執行檢查以確保符合培育參數。下限與上述相同。

【0806】 記錄自培育箱移出的時間。小心地將G-Rex100MCS自培育箱移出並確保所有管夾皆已關閉(大過濾器管線除外)。記錄處理開始時間。

【0807】 將300 mL轉移包標示為「TIL懸浮液」。將重力血液過濾器的TIL懸浮液轉移(單一管線)無菌接合。將300mL轉移包放在磅秤上並記錄乾重。將1L轉移包標示為「上清液」。

【0808】 將來自G-Rex100MCS的紅色培養基移除管線無菌接合至「上清液」轉移包。將來自G-Rex100MCS的透明細胞移除管線無菌接合至連接至「TIL懸浮液」轉移包之血液過濾器頂端的二個穿刺針管線的其中之一。將G-Rex100MCS放在GatheRex的左側且將「上清液」及「TIL懸浮液」轉移袋放在右側。

【0809】 將來自G Rex100MCS的紅色培養基移除管線安裝至GatheRex上的頂部管夾(標示紅色管線)及管路導引器。將來自G-Rex100MCS的透明收集管線安裝至GatheRex上的底部管夾(標示藍色管線)及管路導引器。將來自GatheRex的氣體管線附接至G-Rex100MCS培養瓶的無菌過濾器。在從G-Rex100MCS培養瓶移除上清液之前，確保細胞移除管線上的所有管夾皆已關閉。將約900 mL的培養上清液從G-Rex100MCS轉移至1L轉移包。目視檢查G-

Rex100MCS培養瓶以確保培養瓶水平且培養基減少至抽吸液浸管的末端。

【0810】在移除上清液後，將所有至紅色管線的管夾關閉。

【0811】劇烈拍打培養瓶並渦漩培養基以釋放細胞。檢視培養瓶以確保所有細胞皆已脫附。傾斜培養瓶遠離收集管路並允許腫瘤片沿著邊緣沉降。緩慢地將培養瓶傾向收集管路，使片維持在培養瓶的對側。如果細胞收集吸管不是位在側壁與底膜的交接處，當傾斜45°角時扣擊培養瓶通常足以正確地定位吸管。

【0812】放開所有通往TIL懸浮液轉移包的管夾。使用GatheRex，將細胞懸浮液轉移通過血液過濾器至300 mL轉移包中。維持傾斜邊緣直到所有細胞及培養基皆已收集。檢視膜上有無附著細胞。潤洗G-Rex100MCS的底部。用潤洗培養基覆蓋約1/4的氣體交換膜。確保所有管夾皆已關閉。在TIL懸浮液轉移包盡可能靠近接合處熱封，以使整體管路長度維持大約相同。將「上清液」轉移包熱封。維持足夠管線以接合。記錄TIL懸浮液轉移包的重量並計算細胞懸浮液的體積。

【0813】將4英寸(4")血漿轉移組接合至「上清液」轉移包，保留在4英寸血漿轉移組上的魯爾連接，並轉移至BSC中。將4英寸血漿轉移組接合至300 mL「TIL懸浮液」轉移包，保留在4英寸血漿轉移組上的魯爾連接，並轉移至BSC中。

【0814】自1L「上清液」轉移包抽取大約20.0 mL的上清液並分配至標示「Bac-T」的無菌50mL錐形管中。使用適當大小的注射器自標示BacT的50 mL錐形管移出1.0 mL樣本並接種厭氧瓶。

【0815】將4支冷凍小瓶標示小瓶編號(1至4)。使用分開的3mL注射器，自使用魯爾連接的TIL懸浮液轉移包抽取4 × 1.0mL細胞計數樣本並放入各別冷凍小瓶。將紅色蓋子(W3012845)蓋在管線上。將TIL轉移包放在培育箱中直到需要為止。執行細胞計數及計算。執行未稀釋的初始細胞計數。如果不需要稀釋，「樣本[μL]」=200，「稀釋[μL]」=0。

【0816】記錄細胞計數及TIL數量。如果總存活TIL細胞為 $<5 \times 10^6$ 個細胞，則繼續進行至「第11天G-Rex填充及接種」。如果總存活TIL細胞為 $>5 \times 10^6$ 個，則繼續進行至「流動式細胞測量術的計算」。

【0817】如果總存活TIL細胞計數為 $\geq 4.0 \times 10^7$ 個，則計算體積以獲得流動式細胞測量術樣本的 1.0×10^7 個細胞。流動式細胞測量術所需的總存活細胞： 1.0×10^7 個細胞。流動式細胞測量術所需之細胞體積：存活細胞濃度除以 1.0×10^7 個細胞。

【0818】如適用：重新計算總存活細胞及體積流。計算在移除以下細胞測量術樣本之後剩餘的總存活細胞及剩餘體積。

【0819】如適用：計算用於冷凍保存的體積。計算要

獲得用於冷凍保存的 1×10^7 個細胞所需之細胞體積。

表 24. TIL 冷凍保存計算。

| 冷凍保存 所需之 總存活TIL | 存活細胞 濃度 | 冷凍保存 所需之 細胞體積 C=A÷B |
|------------------------|------------|-------------------------------------|
| A. 1×10^7 個細胞 | B. 個細胞 /mL | C. mL |

【0820】如適用：移出用於冷凍保存之樣本。自 TIL 懸浮液轉移包移出所計算之體積。放入適當大小的錐形管並標示為「冷凍保存樣本 1×10^7 細胞」、日期及批號。將紅色蓋子 (W3012845) 蓋在 TIL 懸浮液轉移包上。

【0821】根據下列參數將「冷凍保存樣本 1×10^7 個細胞」離心：速度：350 × g，時間：10:00 分鐘，溫度：室溫，煞車：全速 (9)；加速：全速 (9)。

【0822】添加 CS-10。在 BSC 中，無菌地抽吸上清液。輕柔拍打管底部以將細胞重懸於剩餘流體中。添加 CS-10。緩慢添加 0.5 mL 的 CS10。記錄添加的體積。冷凍保存填充約 0.5 mL 的樣本小瓶。

第 11 天 - 餵養細胞

【0823】自 LN₂ 冷凍器獲得 3 袋至少二個不同批號的餵養細胞。將細胞保持在乾冰上直到準備解凍為止。記錄餵養細胞的細胞資訊。確認獲得至少二個不同批量的餵養細胞。將餵養細胞袋放入基於批號之個別夾鏈袋中，並在

37.0±2.0°C 水浴或 cytotherm 中解凍約 3 至 5 分鐘或直到冰開始消失。

【0824】 餵養細胞細胞制具製備。將 4S-4M60 接合至 CC2 Cell Connect(W3012820)，用 4S-4M60 歧管的 4 穿刺針端置換 Cell Connect 設備的單一穿刺針。視需要接合。

【0825】 附接培養基轉移包：將「餵養細胞 CM2 培養基」轉移包接合至 CC2 魯爾。該袋將用無針注射埠附接至制具側邊。將含有完全 CM2 第 11 天培養基的總成轉移至 BSC 中。

【0826】 匯合解凍的餵養細胞。在 BSC 中，抽取 10 mL 的空氣至 100 mL 注射器中。使用此置換 CC2 上的 60 mL 注射器。在移除罩蓋之前，用酒精棉擦拭餵養細胞袋上的每個埠。使用 CC2 的三支穿刺針穿刺三個餵養細胞袋。在將穿刺針轉向一個方向時維持恆壓。不要穿刺埠側邊。打開活栓，使得來自餵養細胞袋的管線打開且通往無針注射埠的管線關閉。抽取餵養細胞袋的內容物至注射器中。所有三個袋子同時抽光。一旦餵養細胞袋已抽光，在維持注射器壓力下，將通往餵養細胞袋的管線夾住。不要拔開在制具注射器下方的注射器。記錄注射器中餵養細胞的總體積。

【0827】 添加餵養細胞至轉移包。轉動活栓，使得通往餵養細胞袋的管線關閉且通往培養基轉移包的管線打開。確保通往培養基轉移包的管線沒有夾住。自注射器分配餵養細胞至「餵養細胞 CM2 培養基」轉移包。夾住通往

含有餵養細胞的轉移包的管線並留下附接至制具的注射器。按摩袋子以混合轉移包中匯合的餵養細胞。將袋子標示為「餵養細胞懸浮液」。

【0828】 計算餵養細胞懸浮液的總體積。移出細胞計數樣本。每個樣本使用分開的3 mL注射器，使用無針注射埠從餵養細胞懸浮液轉移包抽取4 × 1.0 mL細胞計數樣本。將各樣本等分至標示的冷凍小瓶中。

【0829】 利用NC-200及過程注意事項5.14，執行細胞計數及計算。藉由添加0.5 mL的細胞懸浮液至標示批號及「用於細胞計數稀釋」之4.5 mL的AIM-V培養基中，稀釋細胞計數樣本。此將給出1:10稀釋。

【0830】 記錄細胞計數及樣本體積。如果總存活細胞 5×10^9個，則繼續進行。如果總存活細胞 $\geq 5 \times 10^9$ 個，則如上述較高細胞計數繼續進行。視需要獲得額外之餵養細胞且添加至如上所討論之轉移包。計算要獲得 5×10^9 個存活餵養細胞所需之餵養細胞懸浮液的體積。計算要移除之過量餵養細胞的體積。向下捨入至最靠近的整數。

【0831】 移除過量餵養細胞。在新的100 mL注射器中，抽取10mL的空氣並將注射器附接至制具。打開通往「餵養細胞懸浮液」轉移包的管線。使用注射器抽取所計算的餵養細胞體積加上來自轉移包之額外的10.0 mL至100 mL注射器。一旦移除餵養細胞體積，關閉通往餵養細胞懸浮液轉移包的管線。不要移除最終注射器。一旦注射器已填滿，用新的注射器置換。多支注射器可用於移除總體

積。使用每支新的注射器時，抽取10mL的空氣。記錄移除餵養細胞的總體積(包括額外10 mL)。

【0832】添加OKT3。在BSC中，使用1.0 mL注射器及16號規(16G或16 Ga)針頭，抽取0.15 mL的OKT3。將注射器的針頭無菌地移除並將注射器附接至無針注射埠。注射OKT3。打開通往「餵養細胞懸浮液」轉移包的活栓並添加先前移除的10 mL餵養細胞以將OKT3沖過管線。將注射器由上翻轉向下並推注空氣以清除通往餵養細胞懸浮液轉移包的管線。將剩餘的餵養細胞懸浮液留在注射器中。關閉所有管夾並將制具從BSC移出。將餵養細胞懸浮液轉移包熱封，留下足夠管路以接合。

第11天 -G-Rex填充及接種

【0833】設置G-Rex500MCS。將G-Rex500MCS自包裝移出並檢視培養瓶有無任何裂縫或管路扭結。確保所有魯爾緊密連接及封閉。關閉G-Rex500MCS管線上的所有管夾，但通氣孔過濾器管線除外。使用奇異筆在4.5L刻度處畫一條線。自培育箱移出「完全CM2第11天培養基」。

【0834】準備泵送培養基。將G-Rex500MCS的紅色管線與附接至完全CM2第11天培養基的repeater泵轉移組接合。將「完全CM2第11天培養基」袋子吊掛在IV點滴架上。將泵管路裝入Baxa泵。泵送培養基至G-Rex500MCS中。將Baxa泵設定至「高」及「9」。泵送4.5L的培養基至G-Rex500MCS中，填充至培養瓶4.5L刻度處標示的線。

在靠近接合處熱封 G-Rex500MCS 的紅色管線。將培養瓶標示「第 11 天」標籤。將餵養細胞懸浮液轉移包接合至培養瓶。將 G-Rex500MCS 紅色管線無菌接合至「餵養細胞懸浮液」轉移包。

【0835】添加餵養細胞至 G-Rex500MCS。打開餵養細胞懸浮液與 G-Rex500MCS 之間的所有管夾並藉由重力饋送添加餵養細胞懸浮液至培養瓶。在靠近接合處熱封紅色管線。將 TIL 懸浮液轉移包接合至培養瓶。將 G-Rex500MCS 紅色管線無菌接合至「TIL 懸浮液」轉移包。

【0836】添加 TIL 至 G-Rex500MCS。打開 TIL 懸浮液與 G-Rex500MCS 之間的所有管夾並藉由重力饋送添加 TIL 懸浮液至培養瓶。在靠近接合處熱封紅色管線，以移除 TIL 懸浮液袋子。

【0837】培育 G-Rex500MCS。檢查 G-Rex500MCS 的所有管夾皆已關閉(大過濾器管線除外)，並放在培育箱中。培育箱參數：溫度 LED 顯示： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ， CO_2 百分比： $5.0 \pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

【0838】計算培育窗。執行計算以判定在第 16 天將 G-Rex500MCS 移出培育箱的適當時間。下限：培育時間+108 小時。上限：培育時間+132 小時。

第 11 天 - 過量 TIL 冷凍保存

【0839】冷凍過量 TIL 小瓶。記錄並驗證放入控速冷凍器 (CRF) 中的小瓶總數。在完成冷凍後，將小瓶從 CRF

轉移至適當儲存容器。

第16天-培養基製備

【0840】預溫熱 AIM-V 培養基。將三個 CTS AIM V 10L 培養基袋在使用前至少 12 小時自 2°C 至 8°C 移出並放在室溫下避免光照。標示每一袋。記錄溫熱開始時間及日期。確保所有袋已溫熱一段介於 12 與 24 小時之間的期間。

【0841】將流體泵轉移組的較大直徑端使用魯爾接頭附接至 10L Labtainer 袋子的一個母埠。設置 10L Labtainer 用於上清液。標示為「上清液」。設置 10L Labtainer 用於上清液。在從 BSC 移出之前，確保所有管夾關閉。

【0842】每袋 CTS AIM V 培養基解凍 5×1.1 mL 等分試樣的 IL-2 (6×10^6 IU/mL) (BR71424) 直到所有冰融化。將 100.0 mL 的 Glutamax 等分至適當大小接受器中。記錄添加至各接受器的體積並將各接受器標示為「GlutaMax」。

【0843】添加 IL-2 至 GlutaMax。使用微量吸管，添加 5.0 mL 的 IL-2 至各 GlutaMax 接受器。按照過程潤洗吸管尖，並且所添加的每 mL 使用新的吸管尖。記錄添加至各 Glutamax 接受器的體積並將各接受器標示為「GlutaMax+IL-2」及接受器編號。

【0844】製備用於調配之 CTS AIM V 培養基袋。確保 CTS AIM V 10L 培養基袋 (W3012717) 在使用前 12 至 24 小時在室溫下溫熱且避免光照。記錄結束培育時間。在 BSC 中，關閉 4" 血漿轉移組上的管夾，接著使用穿刺針埠連接

至該袋。在將穿刺針轉向一個方向時維持恆壓。確保不要穿刺埠側邊。將 repeater 泵流體轉移組的較大直徑端經由魯爾連接至 4”血漿轉移組。

【 0845 】 將 Baxa 泵緊鄰 BSC 裝設。將 repeater 泵流體轉移組的泵管路部分從 BSC 移出並安裝至 repeater 泵中。

【 0846 】 準備調配培養基。在 BSC 中，移除 Pumpmatic Liquid-Dispensing System (PLDS) 的注射器並丟棄。確保不破壞 PLDS 吸管的無菌性。將 PLDS 吸管經由魯爾連接連接至 repeater 泵流體轉移組的較小直徑端，並將吸管尖放入以上製備之「 GlutaMax+IL-2 」中進行抽吸。打開介於接受器與 10L 袋子之間的所有管夾。

【 0847 】 泵送 GlutaMax+IL-2 至袋中。設定泵速至「中」及「3」並將所有「 GlutaMax+IL-2 」泵送至 10L CTS AIM V 培養基袋中。一旦沒有剩餘溶液，清除管線並停止泵。在以下記錄添加至每個 Aim V 袋之含有 IL-2 之 GlutaMax 的體積。

【 0848 】 移除 PLDS。確保所有管夾關閉，並將 PLDS 吸管從 repeater 泵流體轉移組移除。移除 repeater 泵流體轉移組並將 4”血漿轉移組蓋上紅色蓋子。

【 0849 】 標示所製備的每袋「完全 CM4 第 16 天培養基」。

【 0850 】 按照樣本計畫移除培養基保留。使用 30 mL 注射器，藉由將注射器附接至 4”血漿轉移組移出 20.0 mL 的「完全 CM4 第 16 天培養基」，並分配樣本至 50 mL 錐形

管中。在移除注射器後，確保4”血漿轉移組用管夾夾住或用紅色蓋子蓋住。

【0851】 附接新的 repeater 泵流體轉移組。將新的流體泵轉移組的較大直徑端附接至連接至「完全CM4第16天培養基」袋子的4”血漿轉移組上。用樣本計畫庫存標籤標示並在2至8°C下儲存培養基保留樣本直到提交測試為止。

【0852】 監測培育箱。若適用，監測所製備的額外袋。培育箱參數：溫度LED顯示： $37.0\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ，CO₂百分比： $5.0\pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

【0853】 溫熱完全CM4第16天培養基。在培育箱中溫熱第一袋完全CM4第16天培養基 ≥ 30 分鐘，直到準備使用為止。若適用，溫熱額外袋。

【0854】 製備稀釋。在BSC中，添加4.5 mL的已標示「用於細胞計數稀釋」之AIM-V培養基至各4支15 mL錐形管。標示錐形管。標示4個冷凍小瓶。

第16天-REP分瓶

【0855】 監測培育箱。培育箱參數：溫度LED顯示： $37.0\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ ，CO₂百分比： $5.0\pm 1.5\% \text{CO}_2$ 。

【0856】 自培育箱移出G-Rex500MCS。執行以下檢查，以在自培育箱移出G-Rex500MCS之前確保符合培育參數：上限、下限、移出時間。自培育箱移出G-Rex500MCS。

【0857】 將1L轉移包(W3006645)熱封，留下約12英寸的管線。將1L轉移包標示為TIL懸浮液。將1L轉移包(包括

完整管線)放在磅秤上並記錄乾重。

【 0858 】 GatheRex設置。將 G-Rex500MCS的紅色培養基移除管線無菌接合至以上製備之10L labtainer袋「上清液」上的 repeater 泵轉移組。將 G-Rex500MCS的透明細胞移除管線無菌接合至以上製備的 TIL 懸浮液轉移包。將 G-Rex500MCS 培養瓶放在 GatheRex 的左側。將上清液 labtainer 袋及 TIL 懸浮液轉移包放在右側。將來自 G-Rex500MCS的紅色培養基移除管線安裝至 GatheRex 上的頂部管夾(標示紅色管線)及管路導引器。將來自 G-Rex500MCS的透明收集管線安裝至 GatheRex 上的底部管夾(標示藍色管線)及管路導引器。將來自 GatheRex 的氣體管線附接至 G-Rex500 MCS 的無菌過濾器。在從 G-Rex500MCS 移除上清液之前，確保細胞移除管線上的所有管夾皆已關閉。

【 0859 】 G-Rex500MCS 的體積減少。按照 SOP-01777，將約 4.5L 的培養上清液從 G-Rex500MCS 轉移至 10L Labtainer。目視檢查 G-Rex500MCS 以確保培養瓶水平且培養基減少至抽吸液浸管的末端。

【 0860 】 製備培養瓶以進行 TIL 收集。在移除上清液後，將所有至紅色管線的管夾關閉。

【 0861 】 起始 TIL 收集。記錄 TIL 收集的開始時間。劇烈拍打培養瓶並渦漩培養基以釋放細胞。檢視培養瓶以確保所有細胞皆已脫附。傾斜培養瓶以確保管子位在培養瓶邊緣。如果細胞收集吸管不是位在側壁與底膜的交接處，

當傾斜45度角時扣擊培養瓶通常足以正確地定位吸管。

【0862】TIL收集。放開所有通往TIL懸浮液轉移包的管夾。使用GatheRex，將細胞懸浮液轉移至TIL懸浮液轉移包中。確定維持傾斜邊緣直到所有細胞及培養基皆已收集。檢視膜上有無附著細胞。

【0863】潤洗培養瓶膜。潤洗G-Rex500MCS的底部。用潤洗培養基覆蓋約1/4的氣體交換膜。關閉G-Rex500MCS上的管夾。確保G-Rex500MCS上的所有管夾皆關閉。

【0864】在含有TIL的轉移包盡可能靠近接合處熱封，以使整體管路長度維持大約相同。將含有上清液之10L Labtainer熱封並傳遞至BSC中進行樣本收集。

【0865】記錄含細胞懸浮液之轉移包的重量並計算體積懸浮液。製備轉移包以進行樣本移除。將4"血漿轉移組接合至上述TIL懸浮液轉移包，留下盡量靠近袋子附接的母魯爾端。

【0866】移除細胞上清液的測試樣本。在BSC中，使用母魯爾埠及適當大小的注射器，自10L labtainer移出10.0 mL的上清液。放入15 mL錐形管中並標示「BacT」且保留該管以用於BacT樣本。使用分開的注射器，移出10.0 mL的上清液並放入15 mL錐形管中。保留該管用於黴漿菌測試樣本。標示管為「黴漿菌稀釋劑」。關閉上清液袋。將紅色蓋子蓋在魯爾埠上以關閉袋，並傳遞出BSC。

【0867】移出細胞計數樣本。在BSC中，每個樣本使

用分開的 3 mL 注射器，自「TIL 懸浮液」轉移包的魯爾連接移出 4×1.0 mL 細胞計數樣本。將樣本放入以上製備的冷凍小瓶中。

【0868】移出黴漿菌樣本。使用 3 mL 注射器，自 TIL 懸浮液轉移包移出 1.0 mL 並放入以上製備之標示「黴漿菌稀釋劑」的 15 mL 錐形管中。標示並在 2 至 8°C 下儲存黴漿菌樣本直到提交測試為止。

【0869】製備用於接種之轉移包。在 BSC 中，將 repeater 泵流體轉移組的大直徑管路端附接至含有 TIL 之轉移包上的魯爾應接器。使用止血鉗夾住靠近轉移包的管線。將紅色蓋子蓋在轉移組的端上。

【0870】將 TIL 放入培育箱中。將細胞懸浮液從 BSC 移出並放入培育箱直到需要為止。記錄時間。

【0871】利用 NC-200 執行細胞計數及計算。最初藉由添加 0.5 mL 的細胞懸浮液至以上製備的 4.5 mL 的 AIM-V 培養基中稀釋細胞計數樣本。此給出 1:10 稀釋。

【0872】計算培養瓶以進行繼代培養。計算要接種的培養瓶總數。將 G-Rex500MCS 培養瓶的數量進位以求出最近的整數。

實例 6. 小規模產生來自經冷凍保存之腫瘤組織之 TIL。

【0873】製備用於冷凍之腫瘤組織：無菌收集腫瘤，使用無菌鑷子及解剖刀及/或剪刀修剪以移除不相關非腫瘤或壞死組織。最小 1.5 cm 直徑大小之腫瘤經進一步碎斷

成 6 mm大小片段。要冷凍腫瘤時，將至多 10片 6 mm直徑片段放入含有 10 mL CryoStor10(Biolife, USA)儲存培養基之單一 15 mL 冷凍小瓶(Thermo, USA)中。如果 6 mm直徑片段超過 10個片段，則使用額外冷凍小瓶。將冷凍小瓶蓋子旋緊；接著藉由輕柔反覆倒轉冷凍小瓶至少 3次且至多約 5次將腫瘤片段與儲存培養基混合。接著，使冷凍小瓶在 2°C 至 8°C 下的冰箱中培育 15至 60分鐘。在培育之後，將冷凍小瓶放入冷凍運輸套筒中。

【0874】 冷凍腫瘤組織：將含有冷凍小瓶之冷凍運輸套筒放入液態氮乾式冷凍運輸罐，藉此使用灌注 LN₂及溫度平衡的乾式 LN₂冷凍運輸罐內的汽相液態氮溫度急速冷凍小瓶之內容物。短期儲存或運輸時，使小瓶維持在冷凍運輸罐中。長期儲存時，將小瓶轉移且儲存在液態氮冷凍器的液態氮溫度下。

【0875】 解凍儲存的腫瘤組織：藉由將冷凍小瓶浸沒於 37°C 水浴中 5±1 min，使冷凍的腫瘤樣本解凍。使用鑷子，移出 6 mm直徑片段，以含有建它黴素(Gibco, USA)之無菌 Hank氏平衡鹽溶液(HBSS)(Gibco, USA)洗滌三次。將建它黴素以 50 µg/mL添加至 HBSS。將各 6 mm直徑片段進一步分割成大約 8個個別的 1至 3 mm直徑片段。一般腫瘤片段係約 1至 3 mm直徑及約 1至 3 mm厚度。

【0876】 使用 1/100規模程序之 TIL擴增：此程序以 1/100規模複製完整規模的過程 2A TIL製造方法。研究範疇是要給出使用 G-Rex 10M及 G-Rex 5M培養瓶進行迷你 2A

過程的指示。REP前培養使用G-Rex 10M培養瓶起始，為1:10的完整規模REP前過程。REP使用10%的REP前產物於G-Rex 5M中起始，其相當於1:10的完整規模REP過程。剩餘的實驗維持1:100的規模。

【0877】REP前係以腫瘤處理起始，並將四個片段放入個別G-Rex 10M培養瓶且以CM1+IL-2培養直到第11天。REP係在第11天使用REP前TIL(10%的REP前產物)、PBMC餵養細胞、OKT3及IL-2於G-Rex 5M中起始。第16天將保留適量的TIL且將使用倍增因數以推斷完整規模過程。圖7概述此實驗規模TIL產生所採用的程序。

【0878】表25列出此實驗規模TIL產生所使用的設備。

表 25. 設備。

| 項目 | 規格 | 公司 | 型號 | 校正需求 |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 培育箱 | 設定為37°C、5%CO ₂ | Thermo Scientific | Forma Steri-Cycle i160 | 每週監測溫度。 |
| 離心機 | 具有懸翼式轉籃轉子 | Thermo Scientific 或同等公司 | Sorvall Legend XTR-7500-4521 | NA |
| 離心機 | 桌面式微量離心機 | Eppendorf 或同等公司 | NA | NA |
| 流動式細胞測量儀 | 配備有3種雷射 (紅色、藍色、紫色) | BD Biosciences | BD FACS Canto II | 年度預防維護。 CST基線及每日表現 |
| 震盪混合機 | NA | Labnet International 或同等公司 | NA | NA |
| 吸管輔助器 | NA | Drummond 或同等公司 | NA | NA |
| 2至20- μ L 吸管 | NA | Rainin 或同等公司 | L-20XLS 或等效物 | 每六個月 |
| 20至200- μ L 吸管 | NA | Rainin 或同等公司 | L-200XLS 或等效物 | 每六個月 |
| 100至1000- μ L 吸管 | NA | Rainin 或同等公司 | L-1000XLS 或等效物 | 每六個月 |
| 生物安全櫃 (BSC) | NA | Thermo Scientific 或同等公司 | NA | 每六個月 |
| 水浴器 | 設定且維持在 37°C +/- 2度 | 任何可用者 | NA | NA |
| 細胞計數器 | 雙螢光 | Nexelom 或同等公司 | K2 | 如廠商建議 |
| 冰箱 | 設定且維持在 4°C +/- 2度 | 任何可用者 | NA | NA |
| 冷凍器 | 設定且維持在 -20°C +/- 5或4°C | 任何可用者 | NA | NA |

【 0879 】 表 26 列出此實驗規模 TIL 產生所使用的軟體。

表 26. 軟體。

| 名稱 | 公司 | 版本 |
|---------------|----------------|-----------|
| FACSDiva | BD Biosciences | 7 或等效/升級版 |
| FlowJo | Flow Jo | 10 |
| Cellometer K2 | Nexcelom | 2.1.4.2 |

【 0880 】 表 27 列出此實驗規模 TIL 產生所使用的材料。

表 27. 材料。

| 產品 | 規格 | 廠商 | 目錄編號 | 儲存 |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------|-----|
| 50-mL 錐形管 | NA | VWR 或同等公司 | 89004-364 | RT |
| G-Rex 5M | NA | Wilson Wolf | NA | RT |
| G-Rex 10M | NA | Wilson Wolf | NA | RT |
| 10-ml 吸管 | NA | Denville 或同等公司 | P7134 | RT |
| 5-mL 吸管 | NA | Fisher Scientific | 13-678-11D | RT |
| 25-mL 吸管 | NA | Fisher Scientific | 13-678-11 | RT |
| 50-mL 吸管 | NA | Fisher Scientific | 13-675-27 | RT |
| 20- μ L 吸管尖 | NA | VWR 或同等公司 | 1011-260-000 | RT |
| 200- μ L 吸管尖 | NA | VWR 或同等公司 | 1018-260-000 | RT |
| 1000- μ L 吸管尖 | NA | VWR 或同等公司 | 1019-260-000 | RT |
| 10-mL 吸管 | NA | VWR 或同等公司 | 89130-898 | RT |
| 細胞計數器用玻片 | NA | Nexcelom Biosciences | SD100 | RT |
| FACS 管 | NA | BD Biosciences | 343675 | RT |
| 微量離心管 | 1.5 ml | Eppendorf 或同等公司 | 022363328 | RT |
| 鋁箔 | NA | VWR 或同等公司 | N/A | RT |
| BD FACS 流動鞘液 | NA | BD Biosciences | 342003 | RT |
| 500 mL 過濾器系統 | NA | Millipore | SCGPU05RE | RT |
| 1倍D-PBS | 不含 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ | Sigma 或同等公司 | D-8537 | RT |
| BD細胞測量儀設定珠 及追蹤珠 | NA | BD | 655051 | 4°C |
| BD FACS 清潔液 | NA | BD | 340345 | RT |
| BD 關機液 | NA | BD | 334224 | RT |

【 0881 】 表 28 列出所使用的額外材料及試劑。

表 28. 額外材料及試劑。

| 產品 | 規格 | 廠商 | 目錄編號 | 儲存 |
|-----------------|---|-----------------------|------------|-----|
| BD 染色緩衝液 | Dulbecco氏磷酸鹽緩衝鹽水 (DPBS), 含有 2% (w/v) 熱去活化 FBS 及 0.09% (w/v) 疊氮化鈉, pH 7.4 (0.2 μm 孔過濾) | BD Pharmingen | 554656 | 4°C |
| 10% 漂白水 (於蒸餾水中) | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| 蒸餾水 | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| FACS 試管架 | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| 手套 (乳膠/丁腈) | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| 無棉絮擦巾 | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| 70% 乙醇 | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| 紙巾 | 任何可用者 | NA | NA | RT |
| CaviCide | NA | Fisher 或同等公司 | 22-998-805 | RT |
| CryoStor 10 | NA | Stemcell Technologies | 07930 | 4°C |

【 0882 】 表 29 列出流動式細胞測量術 (FACS) 細胞分析以表徵各種標誌表現所使用的試劑。

表 29. FACS 試劑。

| 流動試劑 | | | |
|----------------|-------------|-------------------|------------|
| 標誌 | 螢光染料 | 廠商 | 目錄編號 |
| Live/dead Aqua | Aqua | Life Technologies | L34957 |
| CD4 | FITC | eBioscience | 11-0037-42 |
| CD8 | 太平洋藍 | Biolegend | 301033 |
| TCR α/β | PE | Biolegend | 306708 |
| CD57 | PerCP/Cy5.5 | Biolegend | 359622 |
| CD27 | APC H7 | BD Biosciences | 560222 |
| CD28 | PECy7 | BD Biosciences | 560684 |
| CD56 | APC | Beckman | IM2474U |

【 0883 】 表 30 列出細胞培養基所使用的試劑。

表 30. 培養基試劑

| 產品 | 規格 | 廠商 | 目錄編號 | 儲存 |
|----------------------------|--|-------------------------|--------------|-------|
| RPMI | 含有：L-麩醯胺酸及酚紅。 不含：HEPES | Life Technology | 11875-119 | 4°C |
| CTS Optimizer | -L-麩醯胺酸 酚紅 | Life Technologies | A1048501 | 4°C |
| 血清置換 | L-麩醯胺酸 | Life Technologies | A2596101 | -20°C |
| 人AB血清 | GemCell™ 人血清AB係於美國境內的FDA授權機構自AB血清型之健康男性供體收集。0.1 μm 無菌過濾 | Gemini Bio-Products | 100-512 | -20°C |
| L-麩醯胺酸 | NA | Lonza | BW17-605E | -80°C |
| 建它黴素 | NA | Gibco/ Life Technology | 15710-064 | RT |
| 2-巰乙醇 | NA | Gibco/ Life Technology | 21985-023 | 4°C |
| GMP重組人介白素-2 (rhIL-2)，6e6原液 | NA | CellGenix | 1020-1000 | -20°C |
| AIM-V 培養基 CTS | NA | Gibco/Life Technologies | 087-0112DK | 4°C |
| GlutaMax 補充劑 | NA | Gibco Life Technology | 35050-061 | RT |
| AO/PI 染料 | NA | Nexcelom | CS2-0106-5ml | 4°C |

迷你規模 TIL 擴增程序 (1/100 規模 2A 過程)

第 0 天

【0884】培養基製備 (如果需要的話，製備 IL-2)。製備用於 3 個 G-Rex 10M 培養瓶之每一瓶的 350 mL CM1。添加 6000 IU/mL IL-2 至 CM1。在 37°C 水浴中溫熱 (當處理腫瘤時)。

【0885】腫瘤處理：添加 100mL 培養基及 IL-2 至各 G-Rex 10M 培養瓶並隨機添加 4 個片段至各培養瓶。確定隨機添加片段以增加結果的異質性。放入 37°C / 5% CO₂ 的培育箱中 11 天。

第 11 天

【0886】培養基製備(如果需要的話，製備 IL-2)。製備用於 3 個 G-Rex 5M 培養瓶之每一瓶的 300 mL CM2。添加 3000 IU/mL IL-2 至 CM2，接著在 37°C 水浴中溫熱。

【0887】自第一培養製備 TIL：在不擾動細胞下，自培育箱小心移出各 G-Rex 10M 培養瓶。抽吸培養基，並使用 10 mL 吸管輕柔吸放混合以使細胞自膜釋放。緩慢地抽起培養並記錄各培養瓶的體積，轉移至 50 mL 錐形小瓶。

【0888】獲得 200 μ L 等分試樣進行細胞計數，接著略蓋上 3 個小瓶並放入 37°C 15% CO₂ 培育箱直到準備接種培養瓶為止。計數 TIL 並記錄在細胞計數工作表上。

【0889】製備餵養細胞：獲得適當數量的餵養細胞 (50×10^6 個細胞/培養瓶)；在 37°C 水浴中解凍餵養細胞 2 分鐘，接著稀釋餵養細胞 1:10 於 CM2+IL-2 中。移出 200 μ L 等分試樣進行細胞計數，略蓋上小瓶並放入 37°C 15% CO₂ 培育箱直到準備接種培養瓶為止。稀釋 20 μ L PBMC 餵養細胞 1:10 且計數 PBMC 餵養細胞。記錄在細胞計數工作表上。基於計數，將餵養細胞稀釋至 10×10^6 個細胞/mL 於 CM2+IL-2 中，接著將用於各培養瓶的 5 mL 溶液放入 50 mL 錐形管。以各培養瓶而言，添加 1.5 mL 經 1:1000 稀釋之原液 OKT-3 至 5 mL 餵養細胞且培育 15 分鐘。

【0890】藉由添加 TIL、PBMC 餵養細胞、OKT-3 及培養基至各培養瓶來接種培養瓶。以 TIL 而言，添加約 10% 的 REP 前產物，通常每個培養瓶至多為最多約 2×10^6 個細

胞。以 PBMC 餵養細胞而言，添加 5 mL 如上述之製備物(總共含有 50×10^6 個細胞)。添加 1.5 mL 經 1:1000 稀釋之 OKT-3 原液，接著藉由加入 CM2 培養基達到 50 mL 之最終體積。

第 16 天

【0891】用於分瓶之培養基製備：如果需要的話，製備 IL-2；接著製備用於 3 個培養瓶之每一瓶的 150 mL CM4。接著，添加 3000 IU/mL IL-2 至培養基。放入 37°C 水浴中直到需要時。

【0892】分瓶：自培育箱小心移出 G-Rex 5M 培養瓶，不要擾動細胞，接著抽吸大約 40 mL 培養基，小心不要抽吸細胞。使用 10 mL 吸管，輕柔吸放混合以使細胞自膜釋放；接著，緩慢地抽起培養並記錄各培養瓶的體積，轉移至 50 mL 錐形小瓶。取出 200 μ L 等分試樣進行細胞計數，接著略蓋上 3 個小瓶並將彼等放入 37°C / 5% CO₂ 培育箱直到準備接種培養瓶為止。計數 TIL 並記錄在細胞計數工作表上。自 G-Rex 5M 培養瓶底部抽吸剩餘液體以確保無多餘 TIL 留在培養瓶中。

【0893】計算各培養瓶的子培養瓶數量 (TVC/10⁶) 且進位 (最大 5)。將 TVC 除以子培養瓶數量且調整培養瓶至計算的量。一些實驗可允許僅一個持續的培養瓶。亦將在收集結束時對此進行外推及計算。使用 CM4+IL2 填充培養瓶至 50 mL 且接著將培養瓶放入 37°C / 5% CO₂ 中。

第22天

【0894】收集：自培育箱小心移出 G-Rex 5M 培養瓶，不要擾動細胞，接著如有需要移除上清液進行代謝物分析。抽吸培養基，並使用 10 mL 吸管輕柔吸放混合以使細胞自膜釋放。緩慢地抽起培養並記錄各培養瓶的體積，接著轉移至 50 mL 錐形小瓶。移出 200 μ L 等分試樣進行細胞計數；略蓋上 3 個小瓶並放入 37°C 15% CO₂ 培育箱直到準備接種培養瓶為止。

【0895】計數 TIL 並記錄在細胞計數工作表上；外推且記錄理論完整規模產率 (TVC*100)。如果僅一個培養瓶在分瓶中持續，亦乘以以上計算之培養瓶數量。接著，分配細胞進行表 31 所列之測定。

表 31. 功能測定。

| 功能測定 | 細胞數量/培養上清液 |
|---------------------------------|-------------|
| 流動式表型分析 (DF1/DF2) - WRK LAB-041 | $\geq 10e6$ |
| IFN- γ 再刺激 -WRK LAB-016 | $\geq 5e6$ |
| 待冷凍的細胞 | 所有剩餘細胞 |

【0896】使用經 1:10 稀釋之 1% HSA/PL-A 洗滌剩餘細胞二次。將剩餘細胞以 1:1 調配於 CS10 (30 \times 10⁶ 個細胞/mL/小瓶) 且冷凍在保溫容器 (諸如 Mr. Frosty 容器) 或 CRF 中以進行其他研究。

【0897】表 32 概述 TIL 生產過程的關鍵製程參數。

表 32. 製程參數。

| | |
|----------|---------------------------------------|
| IL-2 濃度 | CM1-6000IU/mL CM2/CM4-3000IU/mL |
| OKT-3 濃度 | 第11天 - 30ng/mL |
| 餵養細胞接種密度 | 第11天 - 50e6/培養瓶 |
| TIL接種密度 | 第11天 - ≤2e6/培養瓶 (10%的REP前產物) |
| OKT-3預裝載 | 培育OKT-3及餵養細胞15分鐘 |
| TIL接種密度 | 第16天 - 平均分配至計算的子培養瓶 |
| 計算子培養瓶 | 第16天TVC / 1 e9(最大為5) |
| 培養基製備 | 根據LAB-005適當製備 |
| 產品調配物 | 使用1% HSA/PL洗滌2X， 調配為1:1 TIL/CS10比例 |

實例 7. 使用經冷凍之腫瘤組織 TIL 的早期 REP。

【0898】此資料係使用實例 5 詳述之 TIL 製造規程的修改版本產製。強調與實例 5 不同的實驗方法態樣。

【0899】腫瘤組織製備：小心保持腫瘤的水合，視需要添加 Hank 氏平衡鹽溶液 (HBSS) 至組織 (經由逐滴添加來保持水合)。使用無菌鑷子、解剖刀及剪刀修剪腫瘤以移除不相關非腫瘤組織。最小 1.5 cm 直徑大小之腫瘤片段經進一步碎斷成 6 mm 直徑片。各片段之理想厚度大約為 6 mm。

【0900】腫瘤組織冷凍：將至多十個腫瘤片段 (標稱大小 6 mm × 6 mm × 6 mm) 放入各冷凍小瓶中。使用 15 mL 冷凍小瓶 (Thermo, USA)。將 10 mL 的 CryoStor10 (Biolife, USA) 添加至各試管。將冷凍小瓶蓋子旋緊且藉由輕柔倒

轉試管5次將冷凍小瓶內容物混合。接著將冷凍小瓶在2°C至8°C的冰箱中培育15分鐘、30分鐘或60分鐘。在儲存培養基中冷藏培育之後，將冷凍小瓶包裝在套筒中，接著在經適當灌注及平衡的乾式液態氮運輸罐(Cryoport)中使用汽相液態氮(LN₂)急速冷凍。以儲存而言，將完全冷凍的冷凍小瓶轉移至液態氮細胞儲存冷凍器，以在液態氮溫度下維持經冷凍之腫瘤組織。

【0901】 腫瘤解凍：在TIL製造過程的第0天，將含有腫瘤組織片段之冷凍小瓶自套筒移除，放入可密封塑膠袋，接著藉由將經密封之袋子浸沒於37°C水浴中5±1分鐘解凍。

【0902】 藉由使用鑷子，小心地將腫瘤片段移出至無菌HBSS(Gibco, USA)+建它黴素(Gibco, USA)中，於含有建它黴素(50 µg/mL)之HBSS中連續洗滌3次，每次洗滌≥3分鐘。大約5至6 mm(所有尺寸)之個別片段係自原始腫瘤樣本切割且放在新的無菌塑膠表面上之個別HBSS液滴中。

【0903】 將至多60個這些片段放入含有1 L細胞培養基1(CM1)且補充有6000 IU/mL重組人IL-2之G-Rex 100MCS培養瓶中，且將培養瓶放入增濕培育箱(標靶37°C、5% CO₂於空氣中)以起始快速擴增前相(REP前)單元操作。

【0904】 TIL製造之摘要：REP前及REP。使用小規模Gen 2過程(1/100規模)測試「新鮮」對照及數個冷凍腫瘤

條件。REP前培養以規模1:10的完整規模REP前過程使用G-Rex 10M培養瓶起始。REP使用10%的REP前產物於G-Rex 5M中起始，其相當於1:100的完整規模REP過程。

【0905】以「新鮮」對照過程而言，新鮮腫瘤係於無菌HBSS+建它黴素中洗滌，切片成標稱6 mm × 6 mm × 6 mm片段。將約4個片段放入具有CM1培養基的G-Rex 10M培養瓶中，該CM1培養基含有6,000 IU/mL的rhIL-2。G-Rex培養係於37°C培育箱中培育11天。在培養的第11天，收集REP前細胞，且藉由共培養10%的REP前TIL與 50×10^6 個PBMC餵養細胞於含有3,000 IU/mL rhIL-2及30 ng/mL OKT-3之CM2培養基中於G-Rex 5M培養瓶中起始REP。在共培養的第16天，將培養分瓶至G-Rex 5M培養瓶，使該G-Rex 5M培養瓶含有不超過 10×10^6 個細胞。分瓶「子」培養瓶的數量計算執行如下： $TVC/10^6 = \text{子培養瓶數量(經進位)}$ 。

【0906】分瓶培養係於含有3,000 IU/mL rhIL-2之CM4培養基中額外培育6天。在第22天，收集細胞且使用CryoStor10(Biolife, USA)冷凍。

【0907】以經冷凍之腫瘤擴增過程而言，將標稱6 mm × 6 mm × 6 mm片段處理成如上解釋之較小2 mm至3 mm片段。用於經冷凍之腫瘤擴增的REP前設置、REP起始、分瓶過程及所使用之試劑完全按照「新鮮」對照過程執行，但有下列例外：

【0908】REP前培養期間為7天(對比「新鮮」對照為

11天)

【0909】REP培養期間為14天且分瓶在第7天(對比「新鮮」對照為11天且分瓶在第5天)。因此，經冷凍之腫瘤的總期間為21天，對比「新鮮」對照為22天。

【0910】REP TIL的表徵：TIL係自各腫瘤處理條件產生(新鮮、冷凍且於儲存培養基中冷藏培養0、30分鐘或60分鐘)。為了表徵TIL純度、一致性、記憶子集、活化及耗竭標誌，使用下列抗體進行流動式細胞測量術：CD3-BUV395、CD62LBV421、CD57-PB、CD11c-BV711、CD28-BB515、CD19-BUV563、CCR7-PE、CD123-BV605、CD27PE-CF594、CD14-BV-650、TCR γ/δ -APC、CD45-PerCP-Cy5.5、CD45RA-A700、CD56-BUV737、CD8-BV786、CD4-PE-Cy7AND、CD16-APC-Vio770)及TIL-2群組(CD3-BUV395、PD-1-BV421、2B4/CD244-PB、CD8-BB515、CD25-BUV563、BTLA-PE、KLRG1-PE-Dazzle 594、TIM-3-BV650、CD194/CCR4-APC、CD4-VioGreen、TIGIT-PerCP-eFluor 710、CD183-BV711、CD69-APC-R700、CD95-BUV737、CD127-PE-Cy7、CD103-BV786、LAG-3-APC-eFluor 780。TIL功能進一步基於IFN- γ 、顆粒溶解酶-B及CD107A的分泌判定。簡言之，約 10^5 個細胞使用抗CD3塗佈板刺激24 h。收集培養上清液且使用ELISA測試IFN- γ 及顆粒溶解酶-B。至於CD107A水準，TIL係在有或無PMA/IO之刺激下刺激2 h後染色CD107A-APC700，且進一步藉由流動式細胞測量術分

析。

【0911】遵照製造商說明，使用 Dako/Agilent Pathology Solutions Telomere PNA 套組/FITC 用於流動式細胞測量術套組執行 Flow-FISH 以判定端粒長度。使用 1301 T 細胞白血病細胞系 (σ -Aldrich) 作為內部參考標準。

結果

【0912】圖 8 顯示基於腫瘤組織冷凍程序之 REP 前總存活細胞 (TVC)。相較於立即急速冷凍及在冷凍之前較長培育兩者，在冷藏條件下 (2°C 至 8°C) 於儲存培養基中培育約 30 分鐘產生最存活的細胞。圖 9 顯示第 21 天的 REP TVC 結果。冷凍規程影響 REP 前培養中的早期存活性。進一步功能藉由測量 IFN- γ 分泌評估且概述於圖 10。自首先於儲存培養基中培育 30 分鐘之經冷凍之腫瘤組織所擴增之 TIL 表現最高水準的 IFN- γ 。所有在細胞表型群組中評估的標誌 (見表 29) 顯示自經冷凍之腫瘤組織所產生之 TIL 與自新鮮腫瘤組織所產生之 TIL 具有類似表型。

【0913】圖 11 及 12 概覽主要步驟且強調在此例示性實驗中比較的細胞族群之間的差異。

【0914】圖 13 至 23 繪示在 3 至 5 位病患中新鮮及經冷凍之腫瘤樣本之 TIL 表型表徵的結果。病患 M1125 測試急速冷凍及在汽相液態氮中冷凍之前在 2°C 至 8°C 下培育 30 分鐘及 60 分鐘，且所有其他病患測試在汽相液態氮中冷凍之前在 2°C 至 8°C 下培育 60 分鐘。整體而言，經冷凍之腫瘤樣本

的表現如同新鮮腫瘤樣本或優於新鮮腫瘤樣本。

實例 8. 腫瘤冷凍保存程序。

【0915】腫瘤可根據下列過程在本發明之例示性實施例中冷凍保存。腫瘤組織必須無菌處理且在整個處理中維持無污染。

【0916】在將組織自病患移除之後，應藉由視需要經由移液吸管逐滴添加來添加 Hank 氏平衡鹽溶液 (HBSS) 至組織以保持水合。將腫瘤無菌放入有蓋的無菌樣品容器且轉移至手術室的無菌表面或如果送至病理部進行解剖示教 (prosection) 的層流櫃。應由各中心指定的切除醫師或有經驗的病理師，使用無菌鑷子及無菌解剖刀或剪刀修剪腫瘤以移除不相關非腫瘤或壞死組織。可能的話，應排除出血性、液體及壞死組織。醫師或病理師應評估該解剖示教樣品以確保組織係存活、非出血性、無壞死且符合最小大小規範。可能的話，組織應具有色素異質性。

【0917】如果腫瘤具有至少 1.5 cm 的直徑，可將其切一半以提供經冷凍之樣品及新鮮樣品進行比較。將一半經修剪之腫瘤放入已維持在 4 至 8°C 下且添加建它黴素及兩性黴素之 Hypothermosol 無菌瓶。應將蓋子旋緊。此提供新鮮樣品。

【0918】另一半腫瘤應碎斷成 10 × 6 mm 片段且放入含有 10 mL 無菌 CryoStor® 10 之製備無菌 15 mL 冷凍小瓶。如果獲得超過十個 6 mm 片段，則使用額外 15 mL 含有 10

mL無菌CryoStor 10之冷凍小瓶。應將蓋子旋緊且應將冷凍樣品容器放在4°C下1小時且接著用液態氮急速冷凍。此提供經冷凍之樣品。

【0919】應按照冷凍運輸罐說明，將經冷凍之腫瘤樣品包裝至冷凍運輸罐中。

實例9.來自卵巢癌腫瘤之十六天經冷凍之腫瘤擴增過程。

【0920】使用小規模TIL擴增過程(1/100規模)測試「新鮮」對照腫瘤樣本及經冷凍之腫瘤樣本。根據上述實例7及8所討論之冷凍保存程序，將經冷凍之腫瘤樣本冷凍。REP前以1:10的完整規模REP前過程使用G-Rex 10M培養瓶起始。REP使用10%的REP前產物於G-Rex 5M培養瓶中起始，其相當於約1:100的完整規模REP過程。在此實例中使用卵巢腫瘤樣本。

【0921】新鮮腫瘤製備。將六個3 mm直徑新鮮腫瘤片段於補充有建它黴素之無菌Hanks氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。將片段放入具有CM1培養基的G-Rex 10M培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)中，該CM1培養基含有約6,000 IU/mL的rhIL-2。這些培養係於37°C培育箱中培育11天。在第11天，收集REP前細胞，且藉由共培養10%的REP前TIL與 50×10^6 個PBMC餵養細胞於含有3,000 IU/mL rhIL-2及30 ng/mL OKT-3之CM2培養基中於G-Rex 5M培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)中起始REP。在第16天，將培養分瓶至G-Rex 5M培養瓶，使該G-

Rex 5M培養瓶含有不超過 10×10^6 個細胞。分瓶培養係於含有 3,000 IU/mL rhIL-2 之 CM4 培養基中額外培育 6 天。在第 22 天，收集細胞且使用 CryoStor10(Biolife, USA) 冷凍。

【0922】經冷凍之腫瘤製備 - 早期 REP 方法 1(「ER-1」)。將六個 2 至 3 mm 直徑經冷凍之腫瘤片段解凍且於補充有建它黴素之無菌 Hanks 氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。將片段放入具有 CM1 培養基的 G-Rex 10M 培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)中，該 CM1 培養基含有約 6,000 IU/mL 的 rhIL-2。這些培養係於 37°C 培育箱中培育 5 天。在第 5 天，收集 REP 前細胞，且藉由共培養 10% 的 REP 前 TIL 與 25×10^6 個或 50×10^6 個 PBMC 餵養細胞於含有 3,000 IU/mL rhIL-2 及 30 ng/mL OKT-3 之 CM2 培養基中於 G-Rex 5M 培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)中起始 REP。在第 10 天，將培養分瓶至 G-Rex 5M 培養瓶，使該 G-Rex 5M 培養瓶含有不超過 10×10^6 個細胞。分瓶培養係於含有 3,000 IU/mL rhIL-2 之 CM4 培養基中額外培育 6 天。在第 16 天，收集細胞且使用 CryoStor10(Biolife, USA) 冷凍。

【0923】經冷凍之腫瘤製備 - 早期 REP 方法 2(「ER-2」)。將六個 2 至 3 mm 直徑經冷凍之腫瘤片段解凍且於補充有建它黴素之無菌 Hanks 氏平衡鹽溶液(HBSS)中洗滌。將片段放入具有 CM1 培養基的 G-Rex 10M 培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)中，該 CM1 培養基含有約 6,000 IU/mL 的 rhIL-2。這些培養係於 37°C 培育箱中培育 3

天。在第3天，收集REP前細胞，且藉由共培養10%的REP前TIL與 25×10^6 個或 50×10^6 個PBMC餵養細胞於含有3,000 IU/mL rhIL-2及30 ng/mL OKT-3之CM2培養基中於G-Rex 5M培養瓶(Wilson Wolf Mfg., New Brighton, MN)中起始REP。在第9天，將培養分瓶至G-Rex 5M培養瓶，使該G-Rex 5M培養瓶含有不超過 10×10^6 個細胞。分瓶培養係於含有3,000 IU/mL rhIL-2之CM4培養基中額外培育7天。在第16天，收集細胞且使用CryoStor10(Biolife, USA)冷凍。

【0924】圖24繪示比較這三種擴增方法之流程圖。結果繪示於下表33。使用ER-1及ER-2方法之TIL擴增相較於使用新鮮腫瘤樣本方法GEN2產生遠遠較大的REP擴增倍數。

表 33：來自實例9之擴增結果外推至完整規模。

| | Gen2 | ER-1 冷凍 | ER-1 與一半 餵養 細胞冷凍 | ER-2 冷凍 | ER-2 與一半 餵養 細胞冷凍 |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 片段/培養瓶 第0天數量 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| 第11天-REP前TVC (存活性%) | 2.93×10^6 (88.7) | 1.23×10^6 (64) | 1.23×10^6 (64) | 6.1×10^5 (55) | 6.1×10^5 (55) |
| 第11天REP 接種(TIL) | 2.93×10^6 | 1.23×10^6 | 1.23×10^6 | 6.1×10^5 | 6.1×10^5 |
| 第11天REP接種 (餵養細胞) | 5×10^9 | 5×10^9 | 2.5×10^9 | 5×10^9 | 2.5×10^9 |
| 分瓶日 規模擴大TVC (存活性%) | 第16天 1.49×10^9 (83.2) | 第10天 1.66×10^9 (91.2) | 第10天 1.2×10^9 (91.4) | 第9天 2.17×10^9 (92) | 第9天 1.23×10^9 (86.8) |
| 收集日 TVC (存活性%) | 第22天 10.9×10^9 (92.9) | 第16天 29.1×10^9 (88.3) | 第16天 25.9×10^9 (89) | 第16天 49.8×10^9 (92.3) | 第16天 34.2×10^9 (89.6) |
| REP 擴增倍數 | 3728 | 23714 | 21060 | 81684 | 55998 |

【 0925 】

實例 10：使用其他腫瘤類型之十六天經冷凍之腫瘤擴增過程。

【 0926 】 使用自至少二位下列癌症類型之病患所收集之腫瘤樣本執行實例 9 揭示之過程：黑色素瘤、肺癌、子宮頸癌及頭頸鱗狀細胞癌 (HNSCC)。以實質上如上述 ER-1 及 ER-2 方法相同之方式針對各癌症類型執行擴增過程。資料係如上述收集。

【 0927 】

實例 11：使用確定培養基之十六天經冷凍之腫瘤擴增過程。

【 0928 】 使用自至少二位下列癌症類型之病患所收集之腫瘤樣本執行實例 9 揭示之過程：黑色素瘤、肺癌、子宮頸癌及頭頸鱗狀細胞癌 (HNSCC) 及卵巢癌，但以根據本發明之確定培養基 (例如含有 3% CTS™ 免疫細胞血清置換物 (ThermoFisher Scientific) 及 55mM 2-巰乙醇之 CTS™ OpTmizer™ T 細胞擴增 SFM) 取代 CM1 及 CM2 培養基。

【 0929 】

實例 12：使用 OMNI C3™ 培養袋及 EXP-PAK® 生物容器之十六天經冷凍之腫瘤擴增過程。

【 0930 】 使用自至少二位下列癌症類型之病患所收集之腫瘤樣本執行實例 9 揭示之過程：黑色素瘤、肺癌、子宮頸癌及頭頸鱗狀細胞癌 (HNSCC) 及卵巢癌，但以 OMNI C3™ 培養袋 (Lampire Biological Laboratories) 或 EXP-PAK®

細胞擴增生物容器 (Charter Medical) 取代 GRex 氣體可通透容器。OMNI C3™ 培養袋係在 REP 前/第一擴增階段取代，且 EXP-PAK® 生物容器係在 REP/第二擴增階段取代。

【 0931 】

實例 13：使用確定培養基、OMNI C3™ 培養袋及 EXP-PAK® 生物容器之十六天經冷凍之腫瘤擴增過程。

【 0932 】 使用自至少二位下列癌症類型之病患所收集之腫瘤樣本執行實例 9 揭示之過程：黑色素瘤、肺癌、子宮頸癌及頭頸鱗狀細胞癌 (HNSCC) 及卵巢癌，但以根據本發明之確定培養基 (例如 CTS™ OpTmizer™ T 細胞擴增 SFM, ThermoFisher) 取代 CM1 及 CM2 培養基且以 OMNI C3™ 培養袋 (Lampire Biological Laboratories) 或 EXP-PAK® 細胞擴增生物容器 (Charter Medical) 取代 GRex 氣體可通透容器。OMNI C3™ 培養袋係在 REP 前/第一擴增階段取代，且 EXP-PAK® 生物容器係在 REP/第二擴增階段取代。

【序列表】

<110> 美商艾歐凡斯生物治療公司
 <120> 來自經冷凍保存之腫瘤樣本之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之擴增
 <140> 2019/09/20
 <141> TW 108134042
 <150> US 62/733,937
 <151> 2018/9/20
 <150> US 62/879,881
 <151> 2019/7/29
 <160> 176
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 莫羅單抗(Muromonab)重鏈
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 莫羅單抗輕鏈

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr

180

185

190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 3
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重組人 IL-2 (rhIL-2)

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
 115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 4
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 阿地介白素(Aldesleukin)

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人類 IL-4 (rhIL-4)

<400> 5

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
50 55 60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly

85

90

95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
 100 105 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 6
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重組人 IL-7 (rhIL-7)

<400> 6

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
 1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
 20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
 35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
 50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
 65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
 85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
 100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
 115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
 130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150

<210> 7
 <211> 115

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人 IL-15 (rhIL-15)

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu
1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val
20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu
35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val
50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn
65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn
85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile
100 105 110

Asn Thr Ser
115

<210> 8
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組人 IL-21 (rhIL-21)

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏圖木單抗重鏈可變區

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 108
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗輕鏈可變區

<400> 14

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
85 90 95

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗重鏈 CDR1

<400> 15

Ser Thr Tyr Trp Ile Ser
1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 烏圖木單抗重鏈 CDR2

<400> 16

Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏圖木單抗重鏈 CDR3

<400> 17

Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏圖木單抗輕鏈 CDR1

<400> 18

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏圖木單抗輕鏈 CDR2

<400> 19

Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏圖木單抗輕鏈 CDR3

<400> 20

Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val
 1 5 10

<210> 21
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗(urelumab)重鏈

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 22
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗輕鏈

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Cys Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 23
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗可變重鏈

<400> 23

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro
115 120

<210> 24
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗可變輕鏈

<400> 24

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 烏瑞魯單抗重鏈 CDR1

<400> 25

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗重鏈 CDR2

<400> 26

Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗重鏈 CDR3

<400> 27

Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗輕鏈 CDR1

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗輕鏈 CDR2

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 烏瑞魯單抗輕鏈 CDR3

<400> 30

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Pro Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 31

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fc 結構域

<400> 31

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1 5 10 15Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
50 55 60Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
65 70 75 80Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
85 90 95Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
115 120 125Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
130 135 140Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
145 150 155 160Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
165 170 175Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
195 200 205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 210 215 220

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 32
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 32

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 33
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 33

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 34
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 34

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 35
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 35

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys Asp Lys
 1 5 10 15

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 36

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 36

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 37

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 37

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ser Cys
 1 5 10 15

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 38

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 39
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 39

Gly Gly Pro Gly Ser Ser Gly Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 1 5 10 15

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 40
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 40

Gly Gly Pro Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu
 20

<210> 41
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 連接子

<400> 41

Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Lys Thr His
 1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 20 25

<210> 42
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Fc 結構域

<400> 42

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Ala Gly Asn Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20 25 30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
245

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 43

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 44

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 45

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

<210> 46
<211> 254
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BBL

<400> 46

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu
115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe
130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser
145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala
165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala
180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala
195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His
210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val
225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
245 250

<210> 47
<211> 168
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4-1BBL 可溶性結構域

<400> 47

Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val Ala Gln Asn Val Leu Leu
1 5 10 15

Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp Pro Gly Leu Ala Gly Val
20 25 30

Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp Thr Lys Glu Leu Val
35 40 45

Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln Leu Glu Leu Arg

50

55

60

Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser Leu Ala Leu His
65 70 75 80

Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ala Leu Thr
85 90 95

Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn Ser Ala Phe Gly
100 105 110

Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln Arg Leu Gly Val
115 120 125

His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp Gln Leu Thr Gln
130 135 140

Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro Glu Ile Pro Ala
145 150 155 160

Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu
165

<210> 48
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 版本 1 之可變重鏈

<400> 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 49
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 版本 1 之可變輕鏈

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 版本 2 之可變重鏈

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 51
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 4B4-1-1 版本 2 之可變輕鏈

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Gln Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 52
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H39E3-2 可變重鏈

<400> 52

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Asp Ile Lys Asn Asp Gly Ser Tyr Thr Asn Tyr Ala
65 70 75 80

Pro Ser Leu Thr Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Leu Thr
115 120

<210> 53
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> H39E3-2 可變輕鏈

<400> 53

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Ser Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Gln
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala

100

105

<210> 54
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人 OX40 (智人)

<400> 54

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30

Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro
 35 40 45

Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys
 50 55 60

Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro
 65 70 75 80

Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys
 85 90 95

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly
 100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys
 115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp
 130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro
 165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr
 180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu
 195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val
 210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser
260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile
275

<210> 55
<211> 272
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠 OX40 (家鼯鼠)

<400> 55

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Val Thr Ala Arg Arg Leu Asn Cys Val Lys His Thr Tyr
20 25 30

Pro Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met
35 40 45

Val Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Leu Cys His Pro Cys Glu
50 55 60

Thr Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys
65 70 75 80

Thr Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr
85 90 95

Pro Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg
100 105 110

Gln Asp Ser Gly Tyr Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro
115 120 125

Gly His Phe Ser Pro Gly Asn Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn
130 135 140

Cys Thr Leu Ser Gly Lys Gln Thr Arg His Pro Ala Ser Asp Ser Leu
145 150 155 160

Asp Ala Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu
165 170 175

Thr Gln Arg Pro Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Gln Ser Thr Thr Val
180 185 190

Trp Pro Arg Thr Ser Glu Leu Pro Ser Pro Pro Thr Leu Val Thr Pro
195 200 205

Glu Gly Pro Ala Phe Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Leu Leu
210 215 220

Ala Pro Leu Thr Val Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Lys Ala Trp
225 230 235 240

Arg Leu Pro Asn Thr Pro Lys Pro Cys Trp Gly Asn Ser Phe Arg Thr
245 250 255

Pro Ile Gln Glu Glu His Thr Asp Ala His Phe Thr Leu Ala Lys Ile
260 265 270

<210> 56
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗(tavolixizumab)重鏈

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 57
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗輕鏈

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 58
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 塔伏利西單抗重鏈可變區

<400> 58

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 59
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈可變區

<400> 59

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗重鏈 CDR1

<400> 60

Gly Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗重鏈 CDR2

<400> 61

Tyr Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Tyr His
 1 5 10

<210> 62

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗重鏈 CDR3

<400> 62

Arg Tyr Lys Tyr Asp Tyr Asp Gly Gly His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈 CDR1

<400> 63

Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈 CDR2

<400> 64

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Lys Leu His Ser
1 5 10

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 塔伏利西單抗輕鏈 CDR3

<400> 65

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Trp
1 5

<210> 66

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4 重鏈

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 67
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 輕鏈

<400> 67

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 68
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 重鏈可變區

<400> 68

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 輕鏈可變區

<400> 69

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 11D4 重鏈 CDR1

<400> 70

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 71
<211> 17
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4 重鏈 CDR2

<400> 71

Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4 重鏈 CDR3

<400> 72

Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr
1 5

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4 輕鏈 CDR1

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4 輕鏈 CDR2

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 11D4 輕鏈 CDR3

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 76
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 18D8 重鏈

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg

<220>

<223> 18D8 輕鏈

<400> 77

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 78

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 18D8 重鏈可變區

<400> 78

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 18D8 輕鏈可變區

<400> 79

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 80
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8 重鏈 CDR1

<400> 80

Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8 重鏈 CDR2

<400> 81

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8 重鏈 CDR3

<400> 82

Asp Gln Ser Thr Ala Asp Tyr Tyr Phe Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 83
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8 輕鏈 CDR1

<400> 83

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 84
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8 輕鏈 CDR2

<400> 84

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 85
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 18D8 輕鏈 CDR3

<400> 85

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
 1 5

<210> 86
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu119-122 重鏈可變區

<400> 86

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
 20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 輕鏈可變區

<400> 87

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 重鏈 CDR1

<400> 88

Ser His Asp Met Ser
1 5

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu119-122 重鏈 CDR2

<400> 89

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu

1 5 10 15

Arg

<210> 90
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu119-122 重鏈 CDR3

<400> 90

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu119-122 輕鏈 CDR1

<400> 91

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu119-122 輕鏈 CDR2

<400> 92

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu119-122 輕鏈 CDR3

<400> 93

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 94
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> Hu106-222 重鏈可變區

<400> 94

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Hu106-222 輕鏈可變區

<400> 95

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 96
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 重鏈 CDR1

<400> 96

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 97
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 重鏈 CDR2

<400> 97

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 重鏈 CDR3

<400> 98

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 99
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Hu106-222 輕鏈 CDR1

<400> 99

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu106-222 輕鏈 CDR2

<400> 100

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
 1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Hu106-222 輕鏈 CDR3

<400> 101

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 102
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> OX40L

<400> 102

Met Glu Arg Val Gln Pro Leu Glu Glu Asn Val Gly Asn Ala Ala Arg
 1 5 10 15

Pro Arg Phe Glu Arg Asn Lys Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln
 20 25 30

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser
 35 40 45

Ala Leu Gln Val Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val
 50 55 60

Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn
 85 90 95

Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu
 100 105 110

Val Asn Ile Ser Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln
115 120 125

Leu Lys Lys Val Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr
130 135 140

Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu
145 150 155 160

Asp Asp Phe His Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn
165 170 175

Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
180

<210> 103
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OX40L 可溶性結構域

<400> 103

Ser His Arg Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Lys Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu
20 25 30

Ile Met Lys Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe
35 40 45

Tyr Leu Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser
50 55 60

Leu His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val
65 70 75 80

Arg Ser Val Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys
85 90 95

Val Tyr Leu Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His
100 105 110

Val Asn Gly Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe
115 120 125

Cys Val Leu
130

<210> 104
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> OX40L 可溶性結構域 (替代性)

<400> 104

Tyr Pro Arg Ile Gln Ser Ile Lys Val Gln Phe Thr Glu Tyr Lys Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Gly Phe Ile Leu Thr Ser Gln Lys Glu Asp Glu Ile Met Lys
 20 25 30

Val Gln Asn Asn Ser Val Ile Ile Asn Cys Asp Gly Phe Tyr Leu Ile
 35 40 45

Ser Leu Lys Gly Tyr Phe Ser Gln Glu Val Asn Ile Ser Leu His Tyr
 50 55 60

Gln Lys Asp Glu Glu Pro Leu Phe Gln Leu Lys Lys Val Arg Ser Val
 65 70 75 80

Asn Ser Leu Met Val Ala Ser Leu Thr Tyr Lys Asp Lys Val Tyr Leu
 85 90 95

Asn Val Thr Thr Asp Asn Thr Ser Leu Asp Asp Phe His Val Asn Gly
 100 105 110

Gly Glu Leu Ile Leu Ile His Gln Asn Pro Gly Glu Phe Cys Val Leu
 115 120 125

<210> 105
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 008 可變重鏈

<400> 105

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ser Gln Val His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 106
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 008 可變輕鏈

<400> 106

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 107
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 011 可變重鏈

<400> 107

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Arg Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
85 90 95

Asp Arg Tyr Phe Arg Gln Gln Asn Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 108
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 011 可變輕鏈

<400> 108

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Ala Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Asn His Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 109
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 021 可變重鏈

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Arg Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Arg Tyr Ile Thr Leu Pro Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120

<210> 110
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 021 可變輕鏈

<400> 110

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Lys Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
100 105

<210> 111
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 023 可變重鏈

<400> 111

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Asp Asn Val Met Gly Leu Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 112
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 023 可變輕鏈

<400> 112

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 113
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 113

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 114
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 輕鏈可變區

<400> 114

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 115
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 115

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly His Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 118
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人化抗體之重鏈可變區

<400> 118

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 119
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人化抗體之輕鏈可變區

<400> 119

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 120
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人化抗體之輕鏈可變區

<400> 120

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 121
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人化抗體之重鏈可變區

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Lys Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 122
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人化抗體之重鏈可變區

<400> 122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

Glu Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 123
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人化抗體之輕鏈可變區

<400> 123

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 124
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人化抗體之輕鏈可變區

<400> 124

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 125
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈可變區

<400> 125

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Trp Gly Glu Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 126
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 輕鏈可變區

<400> 126

Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
1 5 10 15

Gly Ala Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
100 105 110

Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

<210> 127
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 尼沃魯單抗(nivolumab)重鏈

<400> 127

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 129
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 尼沃魯單抗可變重鏈

<400> 129

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 130
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 尼沃魯單抗可變輕鏈

<400> 130

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 131
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 尼沃魯單抗重鏈 CDR1

<400> 131

Asn Ser Gly Met His
1 5

<210> 132

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 尼沃魯單抗重鏈 CDR2

<400> 132

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 133

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 尼沃魯單抗重鏈 CDR3

<400> 133

Asn Asp Asp Tyr
1

<210> 134

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 尼沃魯單抗輕鏈 CDR1

<400> 134

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 135

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 尼沃魯單抗輕鏈 CDR2

<400> 135

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 136

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 尼沃魯單抗輕鏈 CDR3

<400> 136

Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 137
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 派姆單抗(pembrolizumab)重鏈

<400> 137

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 138
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 派姆單抗輕鏈

<400> 138

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 139
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 派姆單抗可變重鏈

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 140
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 派姆單抗可變輕鏈

<400> 140

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 141
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 派姆單抗重鏈 CDR1

<400> 141

Asn Tyr Tyr Met Tyr
1 5

<210> 142
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 派姆單抗重鏈 CDR2

<400> 142

Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 派姆單抗重鏈 CDR3

<400> 143

Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 派姆單抗輕鏈 CDR1

<400> 144

Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 145
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 派姆單抗輕鏈 CDR2

<400> 145

Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 146
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 派姆單抗輕鏈 CDR3

<400> 146

Gln His Ser Arg Asp Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 147
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 德瓦魯單抗(durvalumab)重鏈

<400> 147

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 148
<211> 265
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 德瓦魯單抗輕鏈

<400> 148

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
85 90 95

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
115 120 125

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
130 135 140

Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
145 150 155 160

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
165 170 175

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
180 185 190

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
195 200 205

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
210 215 220

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
225 230 235 240

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
245 250 255

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
260 265

<210> 149
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 德瓦魯單抗可變重鏈

<400> 149

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 150
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 德瓦魯單抗可變輕鏈

<400> 150

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 151
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 德瓦魯單抗重鏈 CDR1

<400> 151

Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5

<210> 152
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 德瓦魯單抗重鏈 CDR2

<400> 152

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 153

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 德瓦魯單抗重鏈 CDR3

<400> 153

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 154

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 德瓦魯單抗輕鏈 CDR1

<400> 154

Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 155

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 德瓦魯單抗輕鏈 CDR2

<400> 155

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 德瓦魯單抗輕鏈 CDR3

<400> 156

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 157
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 艾維路單抗(avelumab)重鏈

<400> 157

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

<400> 158

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 159

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 艾維路單抗可變重鏈

<400> 159

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 160
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 艾維路單抗可變輕鏈

<400> 160

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 161
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 艾維路單抗重鏈 CDR1

<400> 161

Ser Tyr Ile Met Met
 1 5

<210> 162
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 艾維路單抗重鏈 CDR2

<400> 162

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 163
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 艾維路單抗重鏈 CDR3

<400> 163

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr
 1 5 10

<210> 164
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 艾維路單抗輕鏈 CDR1

<400> 164

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 165
 <211> 7
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 艾維路單抗輕鏈 CDR2

<400> 165

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 艾維路單抗輕鏈 CDR3

<400> 166

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val
1 5 10

<210> 167

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿特珠單抗(atezolizumab)重鏈

<400> 167

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 168
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗輕鏈

<400> 168

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 169
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特殊單抗可變重鏈

<400> 169

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 170
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特殊單抗可變輕鏈

<400> 170

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗重链 CDR1

<400> 171

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 172
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗重链 CDR2

<400> 172

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 173
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗重链 CDR3

<400> 173

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗輕鏈 CDR1

<400> 174

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 175
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗輕鏈 CDR2

<400> 175

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 176
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 阿特珠单抗輕鏈 CDR3

<400> 176

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種冷凍保存用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之腫瘤組織之方法，該方法包含：

- (i)碎斷該腫瘤組織；
- (ii)於冷凍保存培養基(cryopreservation medium)中培育該等片段；及
- (iii)冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【請求項2】如請求項1之方法，其中該腫瘤組織係經碎斷成具有約1.5 mm至6 mm之直徑的大約球形片段。

【請求項3】如請求項2之方法，其中該等大約球形片段具有約6 mm之直徑。

【請求項4】如請求項2之方法，其中該等大約球形片段具有約3 mm之直徑。

【請求項5】如請求項1之方法，其中該腫瘤組織係經碎斷成具有至少1.5 mm之最短邊緣長度及約6 mm之最長邊緣長度的大致上矩形片段。

【請求項6】如請求項1之方法，其中該腫瘤組織係經碎斷成具有介於約1.5 mm與約6 mm之間之邊緣長度的大致上立方片段。

【請求項7】如請求項6之方法，其中該等大致上立方片段具有約6 mm之邊緣長度。

【請求項8】如請求項6之方法，其中該等大致上立方片段具有約3 mm之邊緣長度。

【請求項9】如請求項1之方法，其中該腫瘤組織係來自經分割之腫瘤(dissected tumor)。

【請求項10】如請求項1之方法，其中該經分割之腫瘤係小於8小時齡。

【請求項11】如請求項1之方法，其中該冷凍保存培養基包含2% v/v至15% v/v二甲亞砜(DMSO)。

【請求項12】如請求項11之方法，其中該冷凍保存培養基包含約10% v/v DMSO。

【請求項13】如請求項1之方法，其中該冷凍保存培養基包含至少一種抗微生物劑。

【請求項14】如請求項13之方法，其中該至少一種抗微生物劑係濃度至少50 µg/mL之建它黴素。

【請求項15】如請求項1之方法，其中該等腫瘤片段係於該冷凍保存培養基中經培育約30分鐘至約80分鐘。

【請求項16】如請求項1之方法，其中該等腫瘤片段在約2°至8°C之溫度下經培育在該冷凍保存培養基中。

【請求項17】如請求項1之方法，其中該腫瘤組織在培育之前係於生理緩衝之等張鹽水溶液中來洗滌。

【請求項18】如請求項17之方法，其中該洗滌包含每次至少三分鐘之三次連續洗滌，其中在每次連續洗滌之後置換該生理緩衝之等張鹽水溶液。

【請求項19】如請求項1之方法，其中該冷凍發生在-125°C至約-196°C之溫度範圍下。

【請求項20】如請求項19之方法，其中該冷凍發生在

約 -140°C 至約 -175°C 之溫度下。

【請求項 21】如請求項 20 之方法，其中該冷凍發生在約 -145°C 之溫度下。

【請求項 22】如請求項 1 之方法，其進一步包含步驟 (iv) 在低於至少 -130°C 下儲存該等經冷凍之片段。

【請求項 23】如請求項 22 之方法，其中該等經冷凍之片段係儲存於汽相液態氮中。

【請求項 24】如請求項 22 之方法，其中該等經冷凍之片段係浸沒於液態氮中儲存。

【請求項 25】一種藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之經冷凍保存之腫瘤片段，該程序包含下列步驟：

- (i) 碎斷經分割之腫瘤或腫瘤活體組織切片樣本；
- (ii) 於冷凍保存培養基中培育該等片段；及
- (iii) 冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【請求項 26】如請求項 25 之藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之經冷凍保存之腫瘤片段，其中步驟 (ii) 進一步包含在約 2°C 至約 8°C 下於包含 10% v/v DMSO 之冷凍保存培養基中培育該等片段約 30 分鐘至約 60 分鐘。

【請求項 27】一種藉由程序所製備之用於製造腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之經冷凍保存之腫瘤片段，該程序包含下列步驟：

- (i) 碎斷經分割之腫瘤，其中該等片段大致上為立方形狀且各邊緣約 6 mm；
- (ii) 於冷凍保存培養基中培育該等片段，該冷凍保存培養基包含 10% DMSO v/v，其中該培育在約 2°C 至約 8°C 之溫度下執行約 30 分鐘至約 60 分鐘；及
- (iii) 冷凍該等片段，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍。

【請求項 28】一種用於製造供過繼性 T 細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，該方法包含於包含 IL-2 之培養基中培養經冷凍保存之腫瘤片段。

【請求項 29】一種用於製備供過繼性 T 細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，該方法包含：

- (a) 在氣體可通透容器中以包含介白素 2 (IL-2) 及可選地 OKT-3 抗體之第一細胞培養基處理經冷凍保存之腫瘤片段以提供 TIL；
- (b) 在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3 抗體及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL；及
- (c) 可選地冷凍保存該等經擴增數量的 TIL。

【請求項 30】一種用於製備供過繼性 T 細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，該方法包含：

- (a) 將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：
 - (i) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

- (ii) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii) 將該容器在約 2 至約 8°C 之溫度下培育一段約 30 分鐘至約 60 分鐘的期間，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv) 冷凍該容器，其中該冷凍係使用汽相液態氮之急速冷凍；及
 - (v) 在 -130°C 下或低於 -130°C 下儲存該容器；
- (b) 解凍該容器；
- (c) 在氣體可通透容器中以包含介白素 2(IL-2) 及可選地 OKT-3 之第一細胞培養基處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (d) 在氣體可通透容器中使用包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3 及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【請求項 31】如請求項 30 之方法，其中步驟 (i) 之該腫瘤組織係經修剪成直徑介於 1.5 mm 與 6 mm 之間。

【請求項 32】如請求項 31 之方法，其中步驟 (i) 之該腫瘤組織係經修剪成約 6 mm 乘 6 mm 乘 6 mm。

【請求項 33】如請求項 30 至 32 中任一項之方法，其中該儲存培養基進一步包含抗細菌劑及抗真菌劑。

【請求項 34】如請求項 30 至 33 中任一項之方法，其中該儲存培養基包含 2 % v/v 至 12 % v/v 二甲亞砜(DMSO)。

【請求項 35】如請求項 34 之方法，其中該儲存培養基

包含 10% DMSO。

【請求項 36】如請求項 30 至 35 中任一項之方法，其中該儲存培養基包含濃度至少 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之建它黴素。

【請求項 37】如請求項 30 至 36 中任一項之方法，其中在執行步驟 (i) 之前，首先將該腫瘤組織於 Hank 氏平衡鹽溶液 (HBSS) 中洗滌。

【請求項 38】如請求項 37 之方法，其中該洗滌包含每次至少三分鐘之三次連續洗滌，其中在每次連續洗滌之後置換該 HBSS。

【請求項 39】如請求項 30 至 38 中任一項之方法，其中步驟 (b) 包含將該容器浸入在約 37°C 之溫度下之水浴中約 5 分鐘。

【請求項 40】如請求項 1 或請求項 30 之方法，其中該腫瘤組織係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤腫瘤組織、頭頸腫瘤組織、乳房腫瘤組織、腎腫瘤組織、胰腫瘤組織、神經膠質母細胞瘤腫瘤組織、肺部腫瘤組織、結直腸腫瘤組織、肉瘤腫瘤組織、三陰性乳房腫瘤組織、子宮頸腫瘤組織、卵巢腫瘤組織或 HPV 陽性腫瘤組織。

【請求項 41】如請求項 30 之方法，該方法進一步包含在該第一擴增步驟 (c) 及該第二擴增步驟 (e) 之間的分瓶 (split)。

【請求項 42】如請求項 41 之方法，其中該分瓶發生在步驟 (c) 起始之後約 16 天。

【請求項 43】如請求項 30 至 42 中任一項之方法，其中

該第一培養步驟係約11天。

【請求項44】如請求項30至42中任一項之方法，其中步驟(c)至(e)執行一段約22天的期間。

【請求項45】如請求項30至42中任一項之方法，其中步驟(c)至(e)執行一段少於20天的期間。

【請求項46】如請求項30之方法，其中步驟(iv)包含在約-125°C至約-150°C下冷凍該容器。

【請求項47】如請求項30之方法，其中步驟(iv)包含使用汽相液態氮冷凍該容器。

【請求項48】如請求項30之方法，其中步驟(v)包含在低於至少約-130°C下儲存該容器。

【請求項49】如請求項30之方法，其中步驟(v)包含將該容器浸沒於液態氮中儲存。

【請求項50】一種用於製備供過繼性T細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，該方法包含：

(a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：

(i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；

(ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；

(iii)將該容器在約2至約8°C下培育約30分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；

(iv)使用汽相液態氮冷凍該容器；及

(v)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；

- (b)解凍該容器；
- (c)在氣體可通透容器中以包含介白素 2(IL-2)及可選地 OKT-3 之第一細胞培養基處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (d)移走至少複數個該等 TIL；
- (e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3 及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【請求項 51】一種用於治療癌症個體之方法，該方法包含投予經擴增的腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)，其包含：

- (a)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存，儲存該腫瘤組織之方法包含：
 - (i)修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
 - (ii)將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
 - (iii)將該容器在 2 至 8°C 下培育約 30 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
 - (iv)使用汽相液態氮冷凍該容器；及
 - (v)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；

- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)將該等腫瘤片段加入密閉系統；
- (d)藉由在包含 IL-2 之細胞培養基中培養第一 TIL 族群來執行第一擴增以產生第二 TIL 族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中

執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(c)轉變至步驟(d)無需打開該系統而發生；

(e)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟(d)轉變至步驟(e)無需打開該系統而發生；

(f)收集獲自步驟(e)之該治療性TIL族群，其中自步驟(e)轉變至步驟(f)無需打開該系統而發生；

(g)將得自步驟(f)之該經收集之TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(f)轉移至步驟(g)無需打開該系統而發生；

(h)使用冷凍保存程序將來自步驟(g)之包含該經收集之TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及

(i)投予治療有效劑量的來自步驟(h)之該輸注袋的該第三TIL族群至該個體。

【請求項52】如請求項51之方法，其進一步包含步驟：(j)向該個體共同投予治療有效劑量的阿地介白素

(aldesleukin)或其生物類似物、及(k)向該個體共同投予治療有效劑量的PD-1/PD-L1抑制劑。

【請求項53】如請求項52之方法，其中該PD-1/PD-L1抑制劑係選自由派姆單抗(pembrolizumab)、尼沃魯單抗(nivolumab)、艾維路單抗(avelumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、阿特珠單抗(atezolizumab)及彼等之生物類似物所組成之群組。

【請求項54】如請求項53之方法，其中該癌症係選自由下列所組成之群組：黑色素瘤、子宮頸癌、頭頸鱗狀細胞癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胰癌及肉瘤。

【請求項55】一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (e)自病患獲得腫瘤組織；
- (f)將該腫瘤組織在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育至少30分鐘；
- (g)冷凍該腫瘤組織；
- (h)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存；
- (b)解凍該腫瘤組織；
- (c)在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素2(IL-2)處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (d)移走至少複數個該等TIL；及
- (e)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基擴增該等TIL以提供經擴增數量的TIL。

【請求項56】一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之 TIL 之方法，其包含：

- (a) 自病患獲得腫瘤組織；
- (b) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (b) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器中；
- (c) 將該容器在約 2°C 至約 8°C 之溫度範圍下培育約 20 分鐘至約 70 分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
- (d) 冷凍該容器；
- (e) 儲存該容器以使該容器維持冷凍；
- (d) 解凍該容器；
- (f) 在氣體可通透容器中以第一細胞培養基及介白素 2(IL-2) 處理該腫瘤組織以提供 TIL；
- (g) 移走至少複數個該等 TIL；及
- (h) 在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3 及 IL-2 之第二細胞培養基擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【請求項57】一種治療有需要治療之人個體的癌症之方法，該方法包含投予由包含下列之方法所產生之經擴增的腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)：

- (a) 自該個體獲得腫瘤組織；
- (b) 修剪該腫瘤組織以移除多餘的非腫瘤組織；
- (c) 將該腫瘤組織放在含有儲存培養基之可關閉容器

中；

- (d)將該容器在約2°C至約8°C之溫度範圍下培育約20分鐘至約70分鐘，該容器含有該腫瘤組織及該儲存培養基；
- (e)使用汽相液態氮冷凍該容器；
- (f)在汽相液態氮溫度下儲存該容器；
- (g)解凍該腫瘤組織；
- (h)將該腫瘤組織添加至密閉系統；
- (i)藉由在包含IL-2之細胞培養基中培養來自該腫瘤組織之第一TIL族群來執行第一擴增以產生第二TIL族群，其中該第一擴增是在提供第一氣體可通透表面積的密閉容器中執行，其中該第一擴增執行約3至14天以獲得該第二TIL族群，其中該第二TIL族群於數量上高於該第一TIL族群至少50倍，且其中自步驟(h)轉變至步驟(i)無需打開該系統而發生；
- (j)藉由對該第二TIL族群的該細胞培養基補充額外的IL-2、OKT-3及抗原呈現細胞(APC)以執行第二擴增而產生第三TIL族群，其中該第二擴增執行約7至14天以獲得該第三TIL族群，其中該第三TIL族群係治療性TIL族群，該治療性TIL族群包含相對於該第二TIL族群增加的效應T細胞及/或中央記憶T細胞子族群，其中該第二擴增是在提供第二氣體可通透表面積的密閉容器中執行，且其中自步驟

- (i)轉變至步驟(j)無需打開該系統而發生；
- (k)收集獲自步驟(j)之該治療性TIL族群，其中自步驟(j)轉變至步驟(k)無需打開該系統而發生；
- (l)將步驟(k)收集之該治療性TIL族群轉移至輸注袋，其中自步驟(k)轉移至步驟(l)無需打開該系統而發生；
- (m)使用冷凍保存程序將來自步驟(l)之包含該治療性TIL族群之該輸注袋冷凍保存；及
- (n)投予治療有效劑量的來自步驟(m)之該輸注袋的該治療性TIL族群至該個體。

【請求項58】一種用於擴增來自經冷凍之腫瘤組織之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)之方法，其包含：

- (a)自病患獲得腫瘤組織，其中該腫瘤組織包含TIL；
- (b)將該腫瘤組織在約2°C至約8°C之溫度範圍下於儲存培養基中培育約30分鐘；
- (c)冷凍該腫瘤組織；
- (d)將該腫瘤組織以冷凍狀態儲存；
- (e)解凍該腫瘤組織；
- (f)在氣體可通透容器中以包含介白素2(IL-2)及可選地OKT-3抗體之第一細胞培養基處理該腫瘤組織以提供TIL；
- (g)移走至少複數個該等TIL；及
- (h)在氣體可通透容器中以包含細胞培養基、經照射的餵養細胞、OKT-3抗體及IL-2之第二細胞培養基

擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL。

【請求項 59】如請求項 58 之方法，其中步驟 (f) 之該等 TIL 係在一段約 3 至約 5 天的期間培養，且其中步驟 (h) 之該等 TIL 係在一段約 11 至約 13 天的期間培養。

【請求項 60】如請求項 58 之方法，其中步驟 (f) 之該等 TIL 係在一段約 3 天的期間培養，且其中步驟 (h) 之該等 TIL 係在一段約 13 天的期間培養。

【請求項 61】如請求項 58 之方法，其中步驟 (f) 之該等 TIL 係在一段約 5 天的期間培養，且其中步驟 (h) 之該等 TIL 係在一段約 11 天的期間培養。

【請求項 62】如請求項 58 之方法，其進一步包含 (i) 收集該等 TIL。

【請求項 63】如請求項 61 之方法，其中該等經收集之 TIL 代表於數量上增加至少 10000 倍。

【請求項 64】一種用於製備供過繼性 T 細胞療法之用之腫瘤浸潤性淋巴細胞 (TIL) 之方法，該方法包含：

- (a) 在包含介白素 2 (IL-2) 及可選地 OKT-3 抗體之第一細胞培養基中培養經冷凍保存之腫瘤片段以提供 TIL；
- (b) 在包含經照射的餵養細胞、OKT-3 抗體及 IL-2 之第二細胞培養基中擴增該等 TIL 以提供經擴增數量的 TIL；及
- (c) 可選地冷凍保存該等經擴增數量的 TIL。

【請求項 65】如請求項 64 之方法，其中該第一培養基

係確定培養基(defined medium)。

【請求項66】如請求項64之方法，其中該第二培養基係確定培養基。

【請求項67】如請求項64之方法，其中該第一培養基及該第二培養基係相同或不同的確定培養基。

【請求項68】如請求項64至67中任一項之方法，其中步驟(a)執行約11天。

【請求項69】如請求項64至67中任一項之方法，其中步驟(b)執行約11天。

【請求項70】如請求項64至68中任一項之方法，其中步驟(a)及(b)總共執行約22天。

【請求項71】如請求項64至67中任一項之方法，其中步驟(a)執行約5天。

【請求項72】如請求項71之方法，其中步驟(b)執行約11天。

【請求項73】如請求項64至67中任一項之方法，其中步驟(a)執行約3天。

【請求項74】如請求項73之方法，其中步驟(b)執行約13天。

【請求項75】如請求項64至67或71至74中任一項之方法，其中步驟(a)及(b)總共執行約16天。

【發明圖式】

過程2A：從第一擴增開始至步驟E約22天

1. 步驟A

獲得病患腫瘤樣本

2. 步驟B

碎斷腫瘤組織片段之
冷凍保存第一擴增
3天至14天

3. 步驟C

第一擴增轉變至第二擴增
無儲存及密閉系統

4. 步驟D

第二擴增
IL-2、OKT-3及抗原呈現餵養細胞
密閉系統

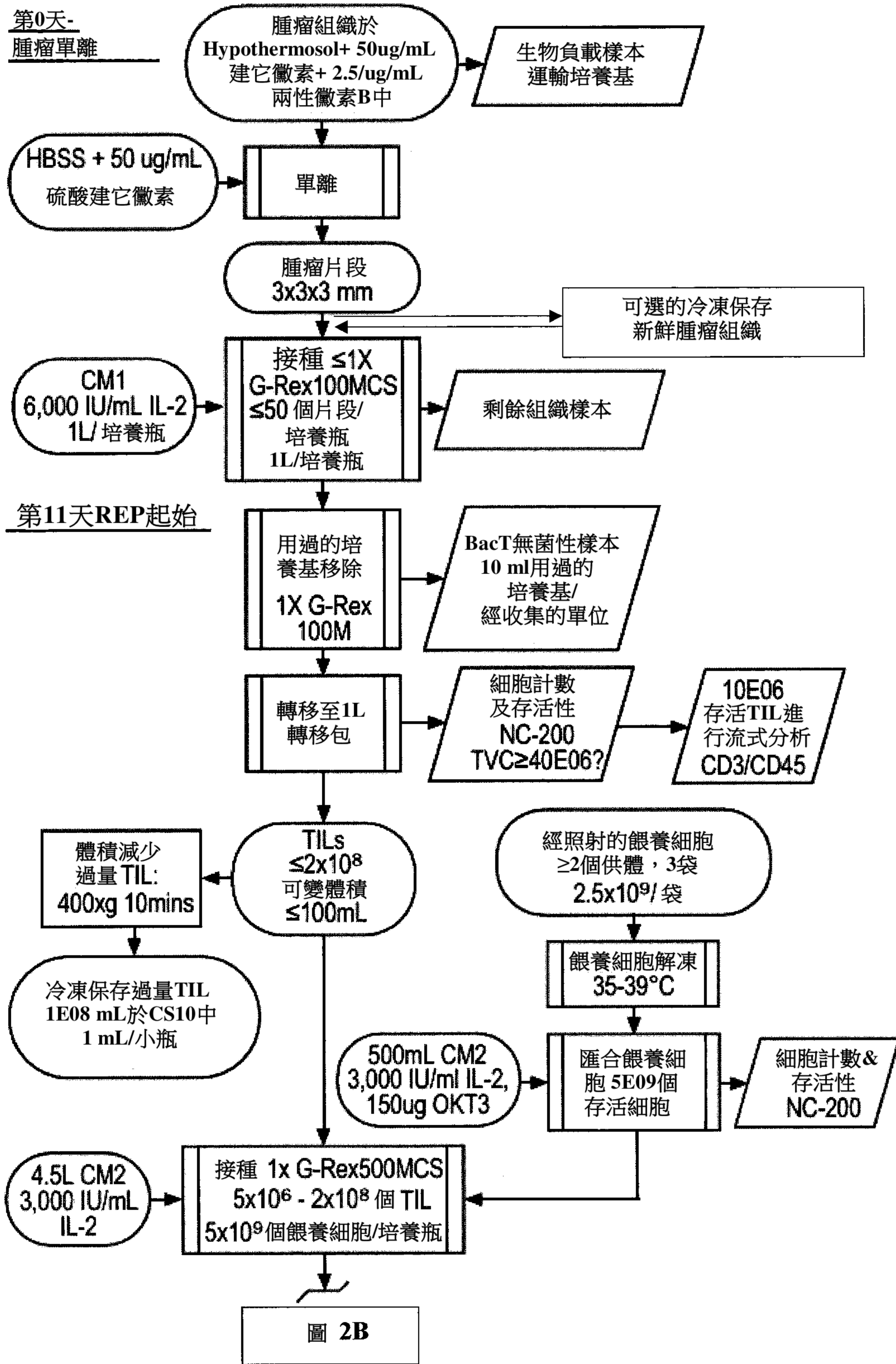
5. 步驟E

收集來自步驟D的TILS
密閉系統

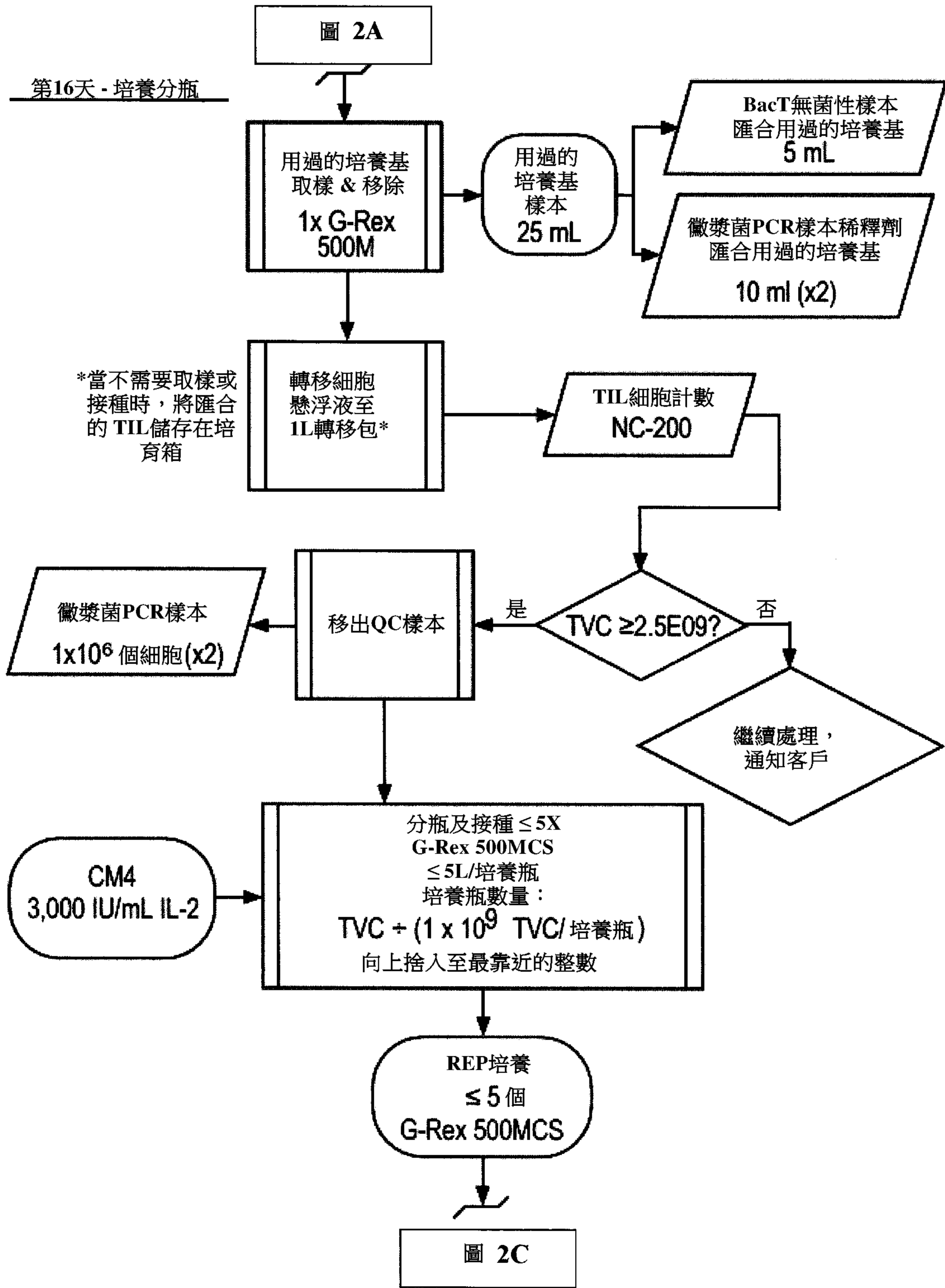
6. 步驟F

最終配方及/或轉移至輸注袋
(可選地冷凍保存)

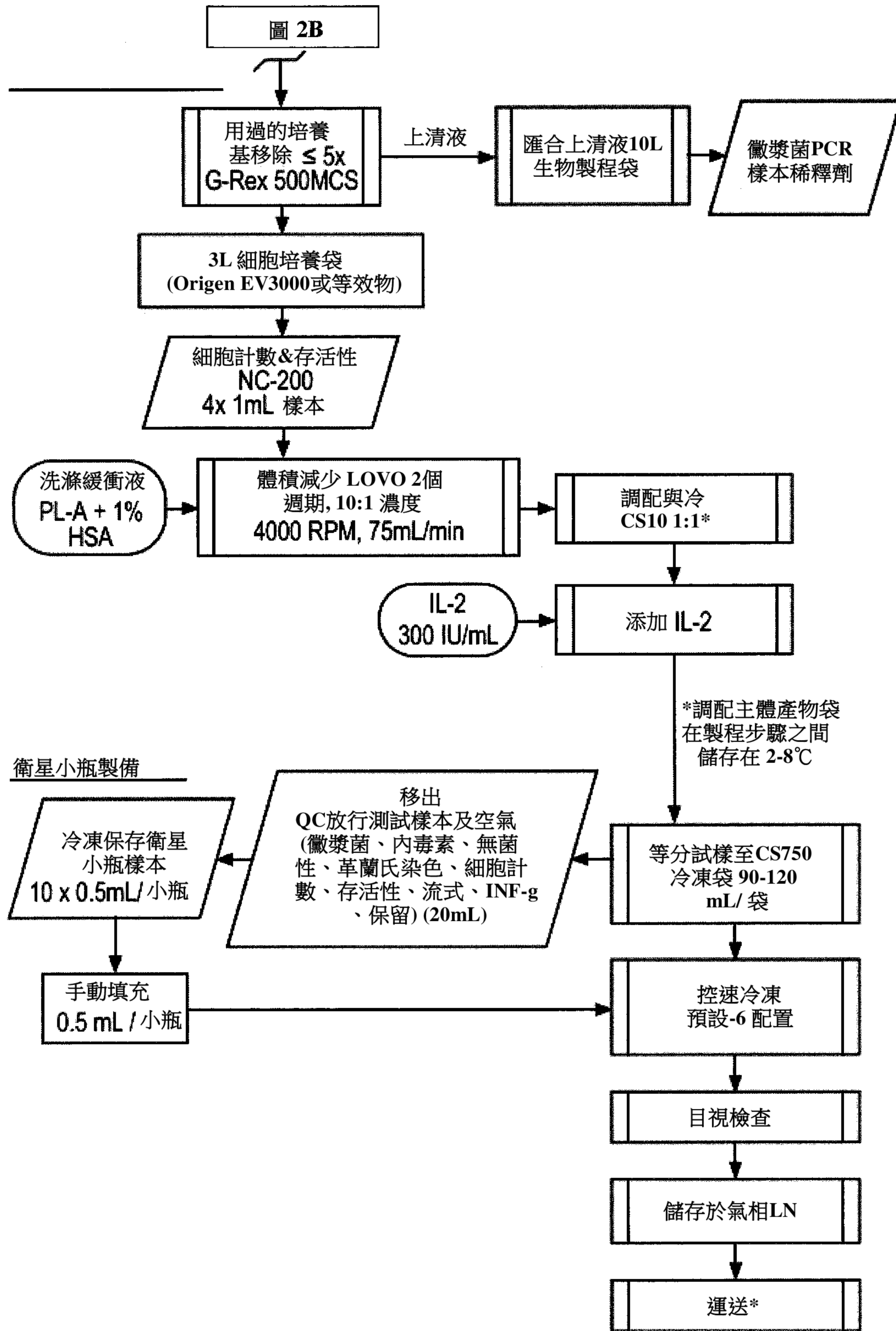
【圖 1】



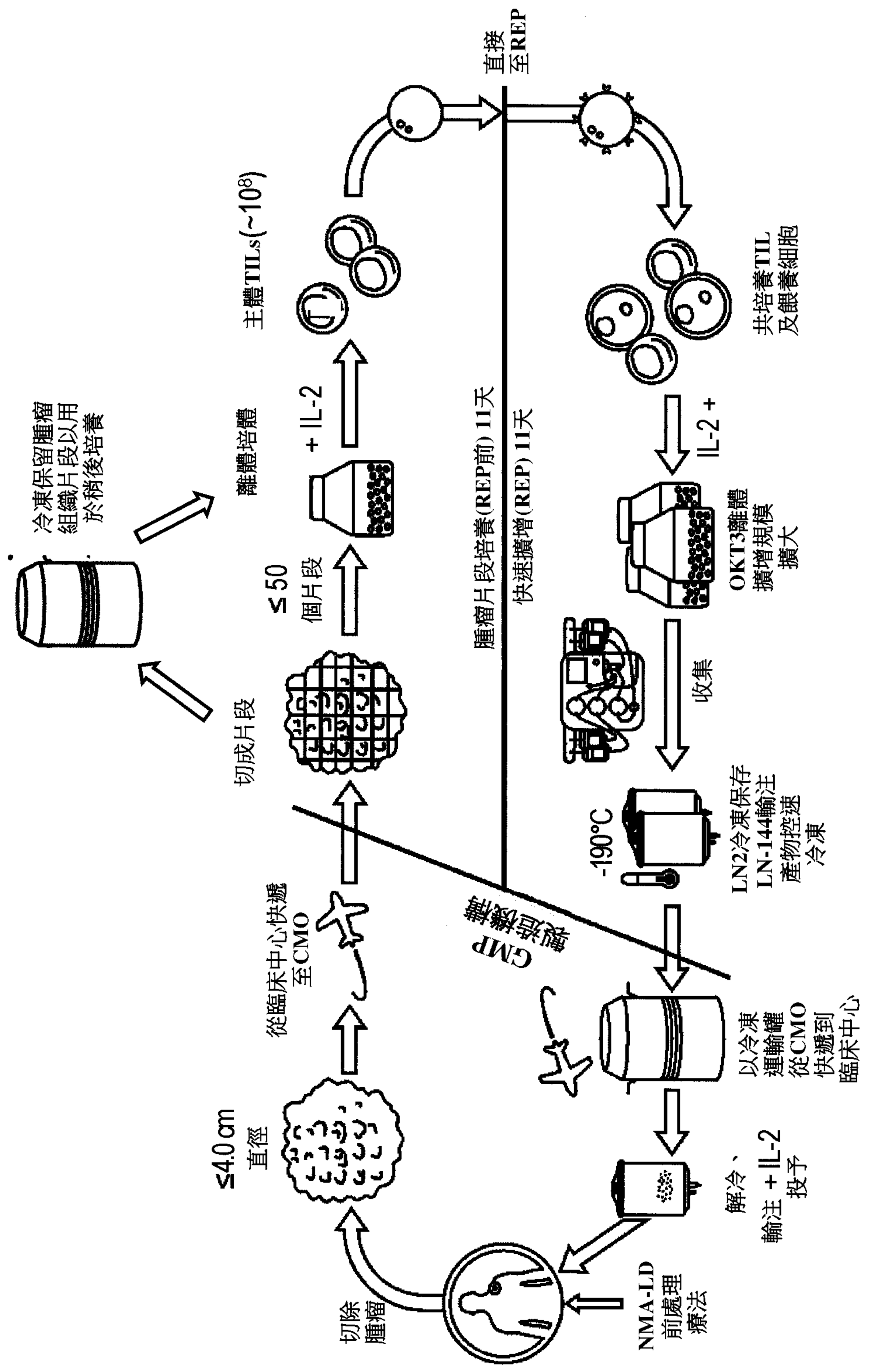
【圖 2A】



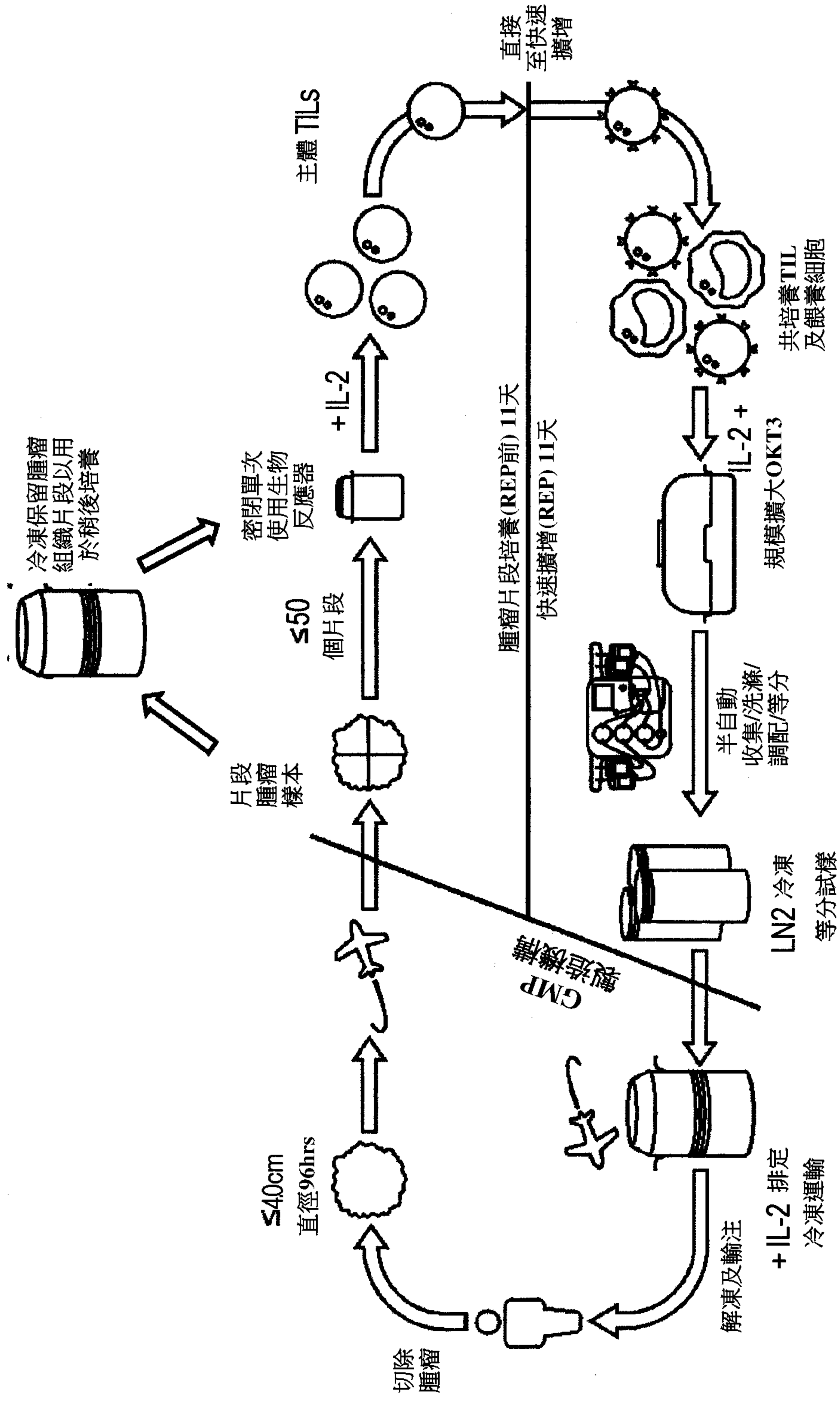
【圖 2B】



【圖 2C】



【圖 3】



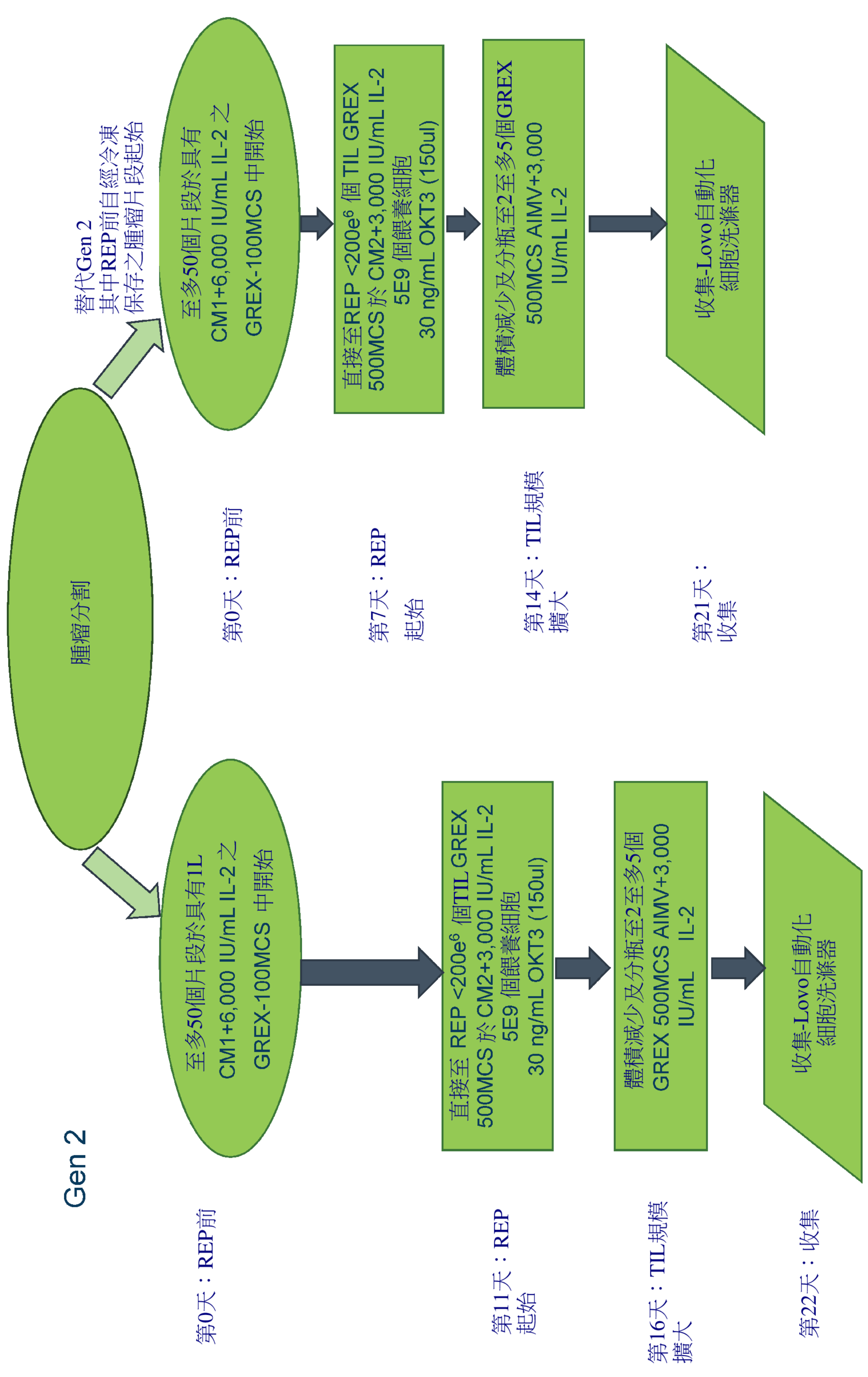
【圖 4】

| 過程1C 步驟A至E 43至55天 | 過程2A 自REP前起始至步驟E約22天 |
|--|--|
| 1. 步驟 A 獲得病患腫瘤樣本 | 1. 步驟 A 獲得病患腫瘤樣本 |
| 2. 步驟 B 碎斷及第一擴增11天至21天 | 2. 步驟 B 碎斷、可選的冷凍保存腫瘤片段及 接著第一擴增11天至21天 (始於第一擴增培養開始) |
| 3. 步驟 C 第一擴增至第二擴增的轉變 可選的儲存直到選擇 | 3. 步驟 C 第一擴增至第二擴增的轉變 無儲存及密閉系統 |
| 4. 步驟 D 第二擴增 IL-2、OKT-3、抗原呈現餵養細胞 可選地重複一或多次 | 4. 步驟 D 第二擴增 IL-2、OKT-3、抗原呈現餵養細胞 密閉系統 |
| 5. 步驟 E 收集來自步驟D的TILs | 5. 步驟 E 收集來自步驟D的TILs 密閉系統 |
| 6. 步驟 F 最終調配及/或轉移至輸注袋 | 6. 步驟 F 最終調配及/或轉移至輸注袋 可選的冷凍保存 |

【圖 5】

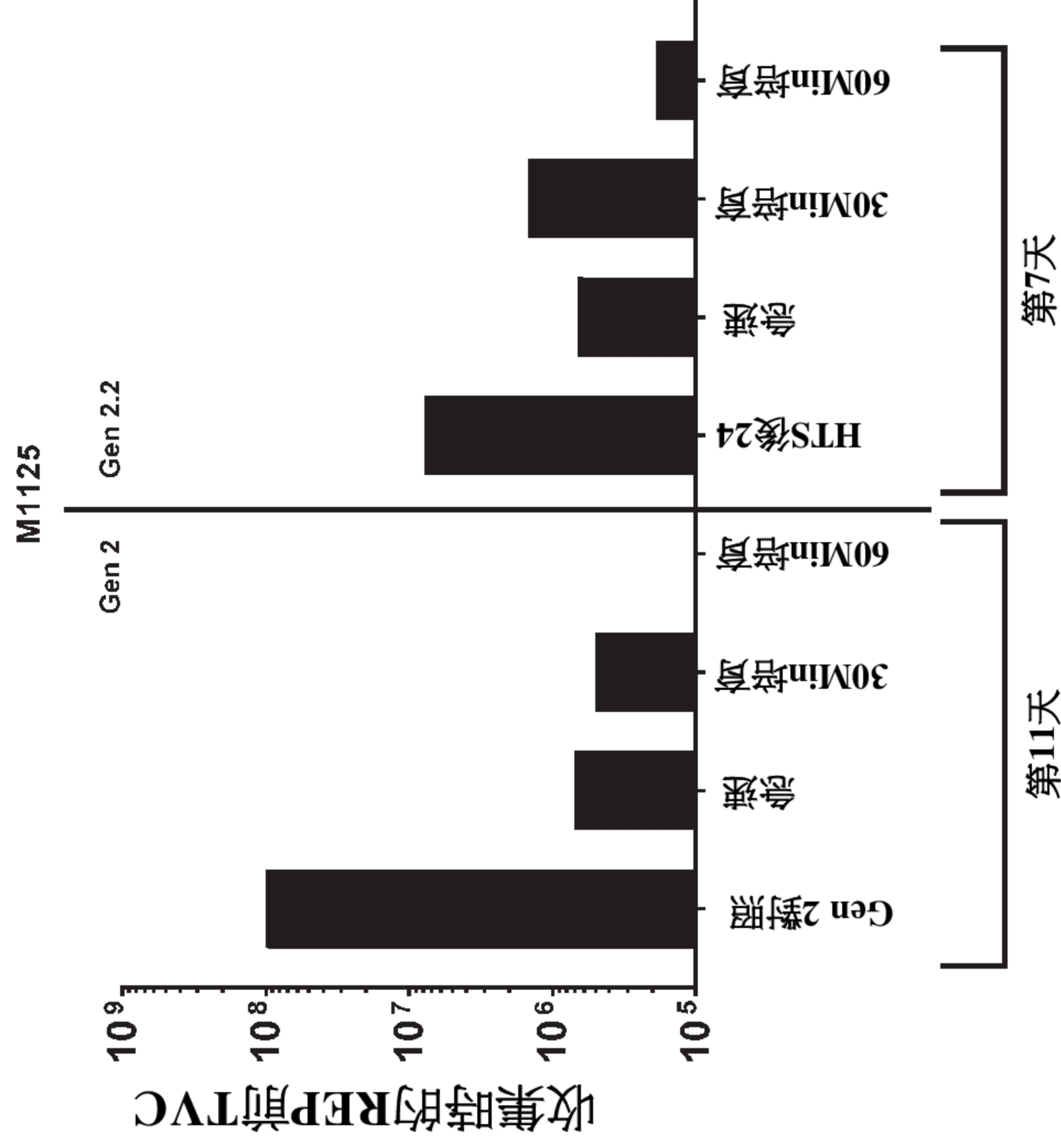
| 過程步驟 | 過程1C實施例 | 過程2A實施例 | 優點 |
|-------------|---|---|---|
| REP前 | <ul style="list-style-type: none"> 每10個GREX-10培養瓶4個片段 11-21天期間 | <ul style="list-style-type: none"> 每1個GREX-100M培養瓶40個片段 11天期間 | <ul style="list-style-type: none"> 增加每個培養瓶的腫瘤片段 縮短培養時間 減少步驟數 適於密閉系統 |
| REP前至REP的轉變 | <ul style="list-style-type: none"> REP前TIL經冷凍，直到為了選擇而分析表型，接著解凍以進行至REP(約第30天) REP需要$>40 \times 10^6$個TIL | <ul style="list-style-type: none"> REP前TIL在第11天直接移至REP REP需要25-200×10^6個TIL | <ul style="list-style-type: none"> 縮短REP前-至-REP過程 減少步驟數 去除表型分析選擇 適於密閉系統 |
| REP | <ul style="list-style-type: none"> REP第0天，6個GREX-100M培養瓶 REP第0天，每個培養瓶5×10^6個TIL及5×10^8個PBMC餵養細胞 REP第7天，分瓶至18-36個培養瓶 14天期間 | <ul style="list-style-type: none"> 第11天，1個GREX-500M培養瓶 第11天$25-200 \times 10^6$個TIL及5×10^9個PBMC餵養細胞 第16天，分瓶至≤ 6個GREX-500M培養瓶 11天期間 | <ul style="list-style-type: none"> 減少步驟數 縮短REP期間 密閉系統培養瓶之間轉移TIL 密閉系統培養基交換 |
| 收集 | <ul style="list-style-type: none"> 經由離心收集TIL | <ul style="list-style-type: none"> 經由LOVO自動化細胞洗滌系統收集TIL | <ul style="list-style-type: none"> 減少步驟數 自動細胞洗滌 密閉系統 減少洗滌期間的產物損失 |
| 最終配方 | <ul style="list-style-type: none"> 新鮮產物於Hypothermosol中 單一輸注袋 限制運送穩定性 | <ul style="list-style-type: none"> 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 較長運送穩定性 | <ul style="list-style-type: none"> 運送彈性 彈性病患時程安排 更及時的放行測試 |
| 整體估計過程時間 | <ul style="list-style-type: none"> 43-55天 | <ul style="list-style-type: none"> 22天 | <ul style="list-style-type: none"> 較快交給病患 |

【圖 6】

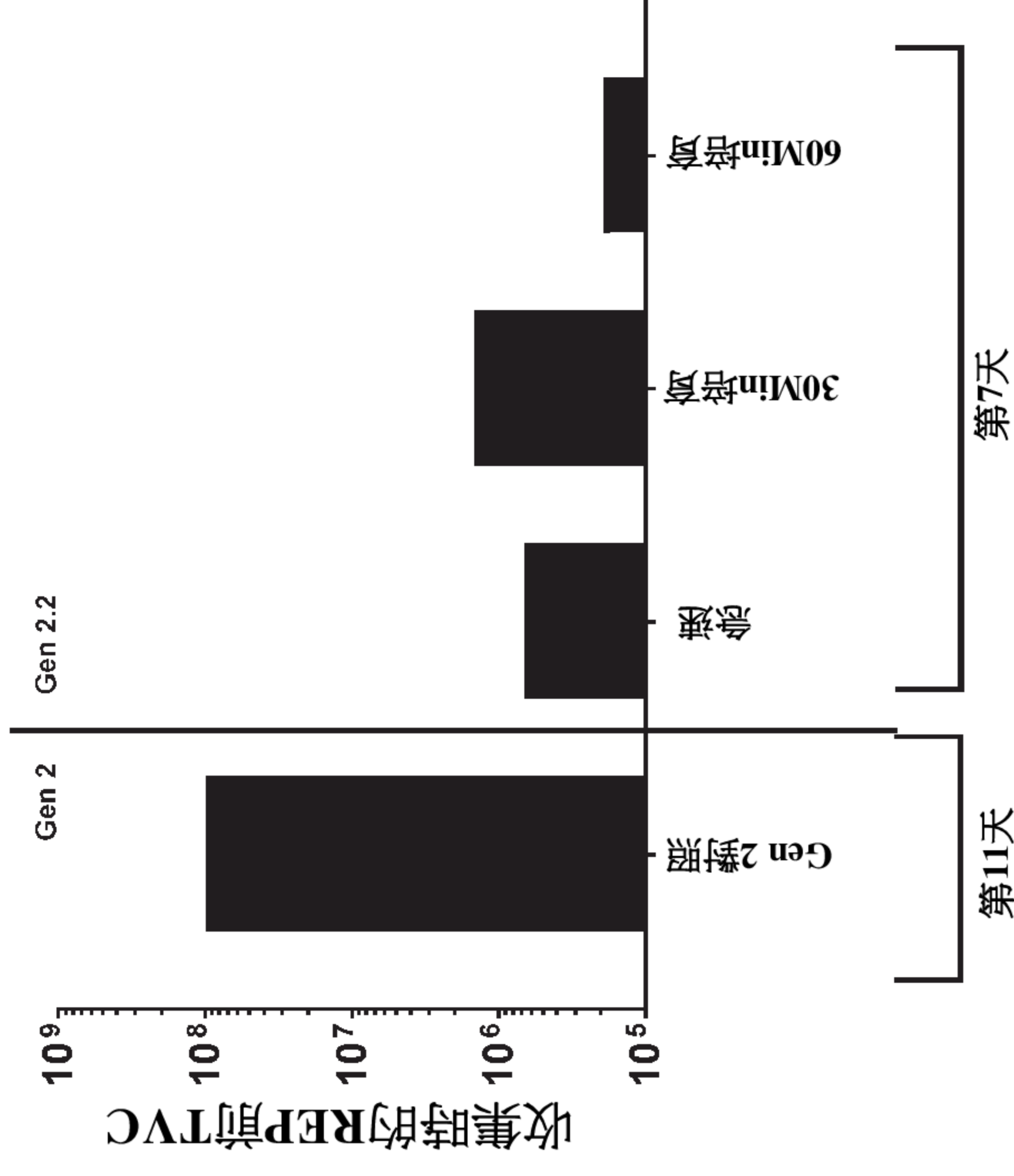


【圖 7】

- 第11天來自Gen2之REP前TVC係100e6
- 第7天來自Gen2.2之REP前TVC係0.8e6
- 來自Gen 2.2之REP前產率係Gen 2對照組的約1%



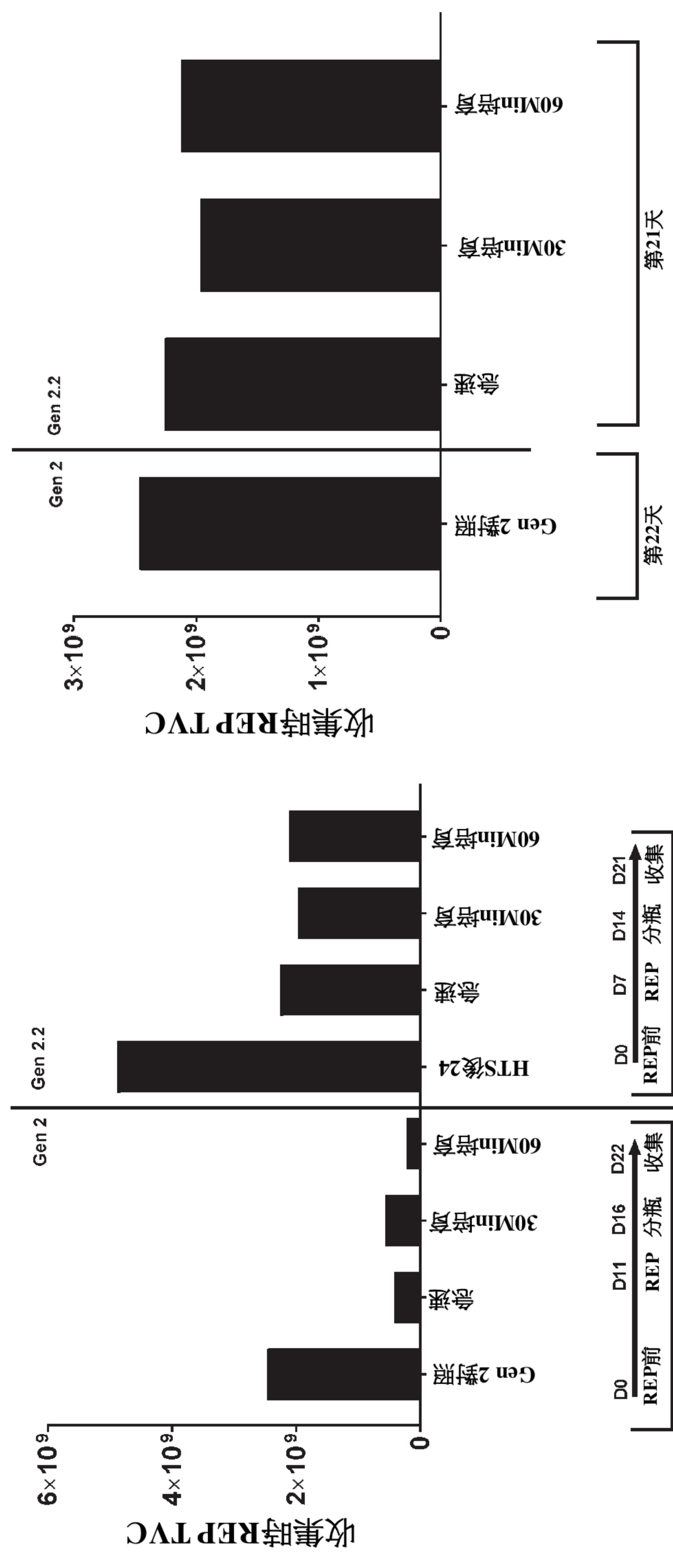
| REP前 | Gen 2 (第11天) | Gen 2.2 (第7天) |
|---------|--------------|---------------|
| HTS後24h | 1.00E+08 | 7.83E+06 |
| 0 min | 7.00E+05 | 6.69E+05 |
| 30 min | 5.00E+05 | 1.47E+06 |
| 60 min | 0.00E+00 | 1.91E+05 |



| REP前 | Gen 2 (第11天) | Gen 2.2 (第7天) |
|---------|--------------|---------------|
| HTS後24h | 1.00E+08 | -- |
| 0 min | - | 6.69E+05 |
| 30 min | - | 1.47E+06 |
| 60 min | - | 1.91E+05 |

【圖 8】

- 第22天來自Gen2之總REP TVC係2.5e9
- 第21天來自Gen 2.2之總REP TVC係2.2, 2, 2, e9
- 來自Gen 2.2之總REP產率係Gen 2的約86%

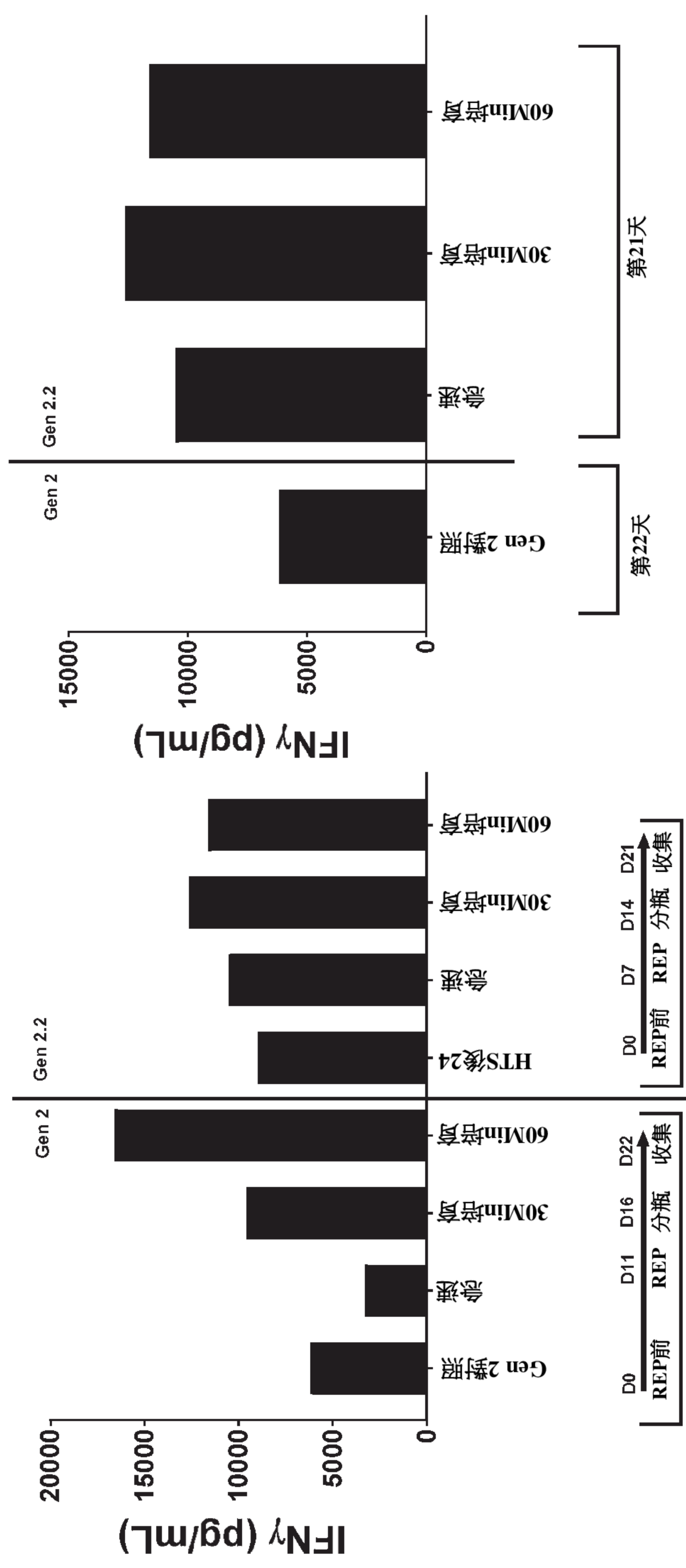


| REP | Gen 2 (第22天) | Gen 2.2 (第21天) |
|---------|--------------|----------------|
| HTS後24h | 2.47E+09 | 4.89E+09 |
| 0 min | 4.20E+08 | 2.26E+09 |
| 30 min | 5.69E+08 | 1.97E+09 |
| 60 min | 2.28E+08 | 2.12E+09 |

| REP | Gen 2 (第22天) | Gen 2.2 (第21天) |
|---------|--------------|----------------|
| HTS後24h | 2.47E+09 | - |
| 0 min | - | 2.26E+09 |
| 30 min | - | 1.97E+09 |
| 60 min | - | 2.12E+09 |

【圖9】

- 第22天來自Gen2.2之REP TIL產生 6180 pg/mL IFN γ
- 第22天來自Gen2.2之REP TIL產生 10520、12612、11618 pg/mL IFN γ



【圖 10】

腫瘤處理
實例8

Gen 2過程(經冷凍之腫瘤)

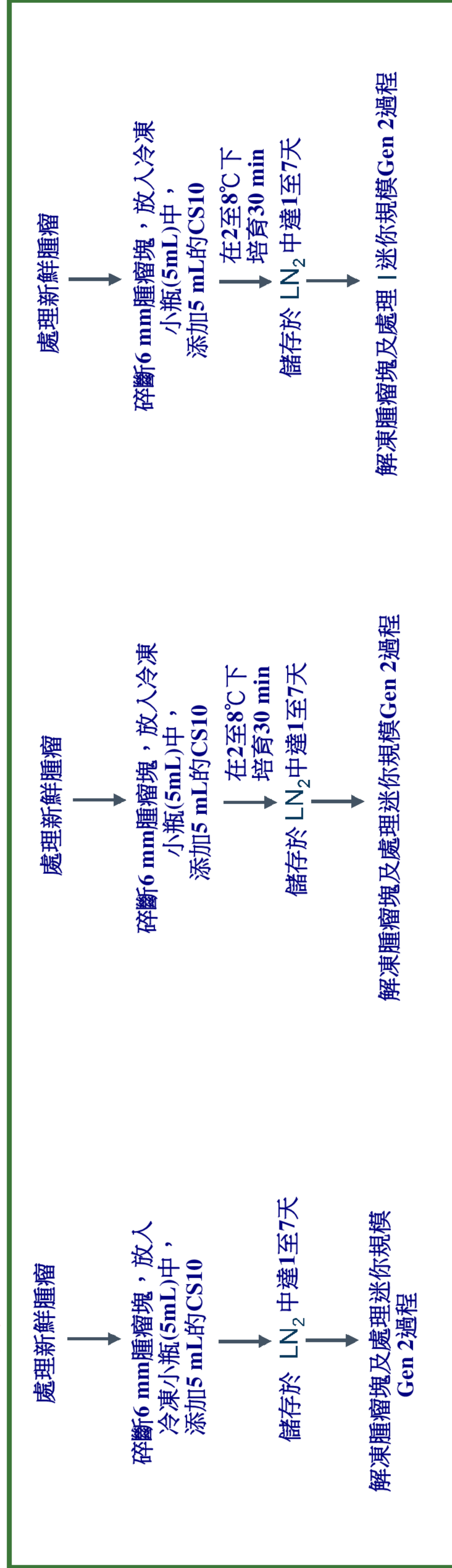
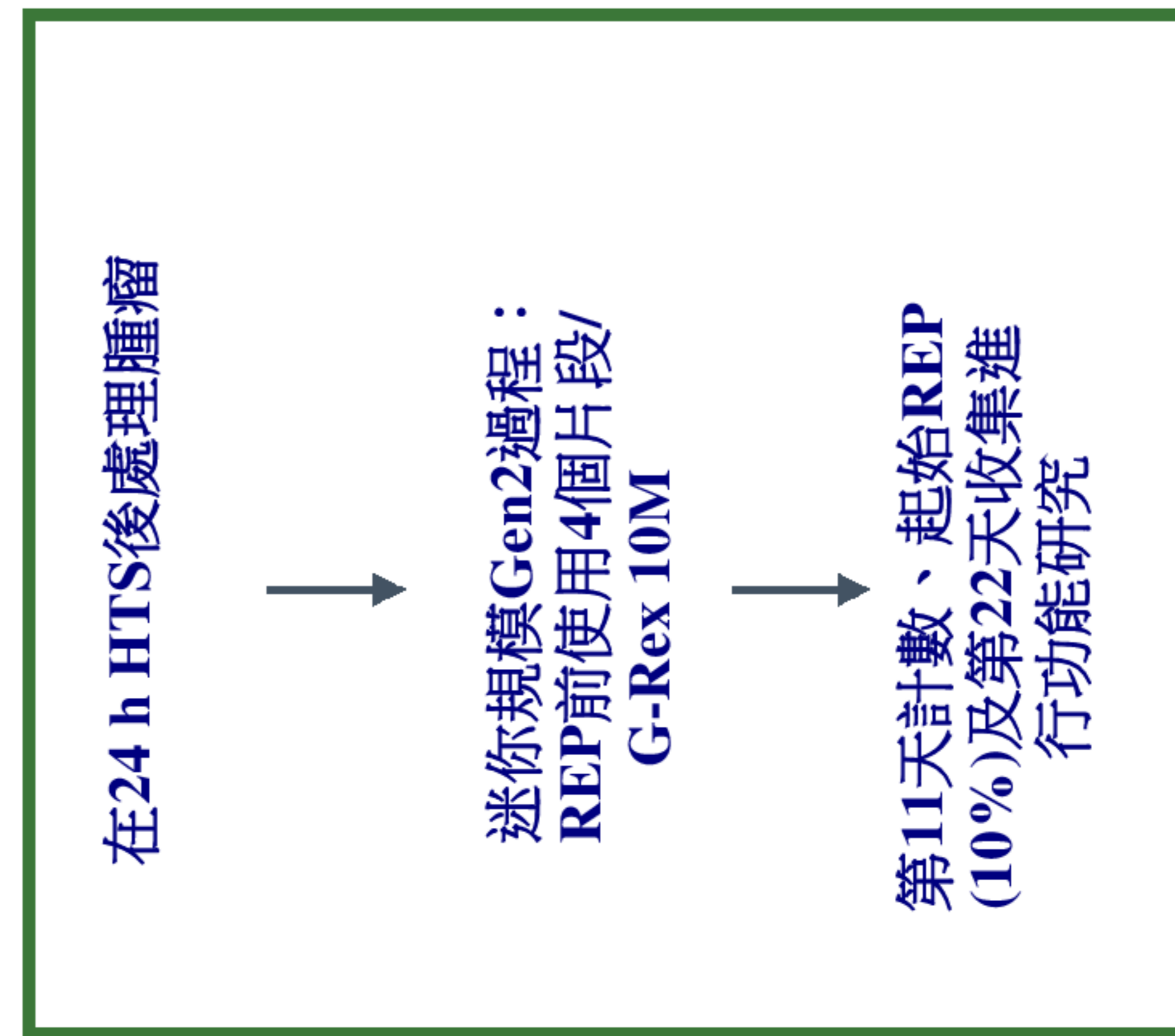
於儲存培養基中培育

無
直接急速
冷凍

Gen 2過程

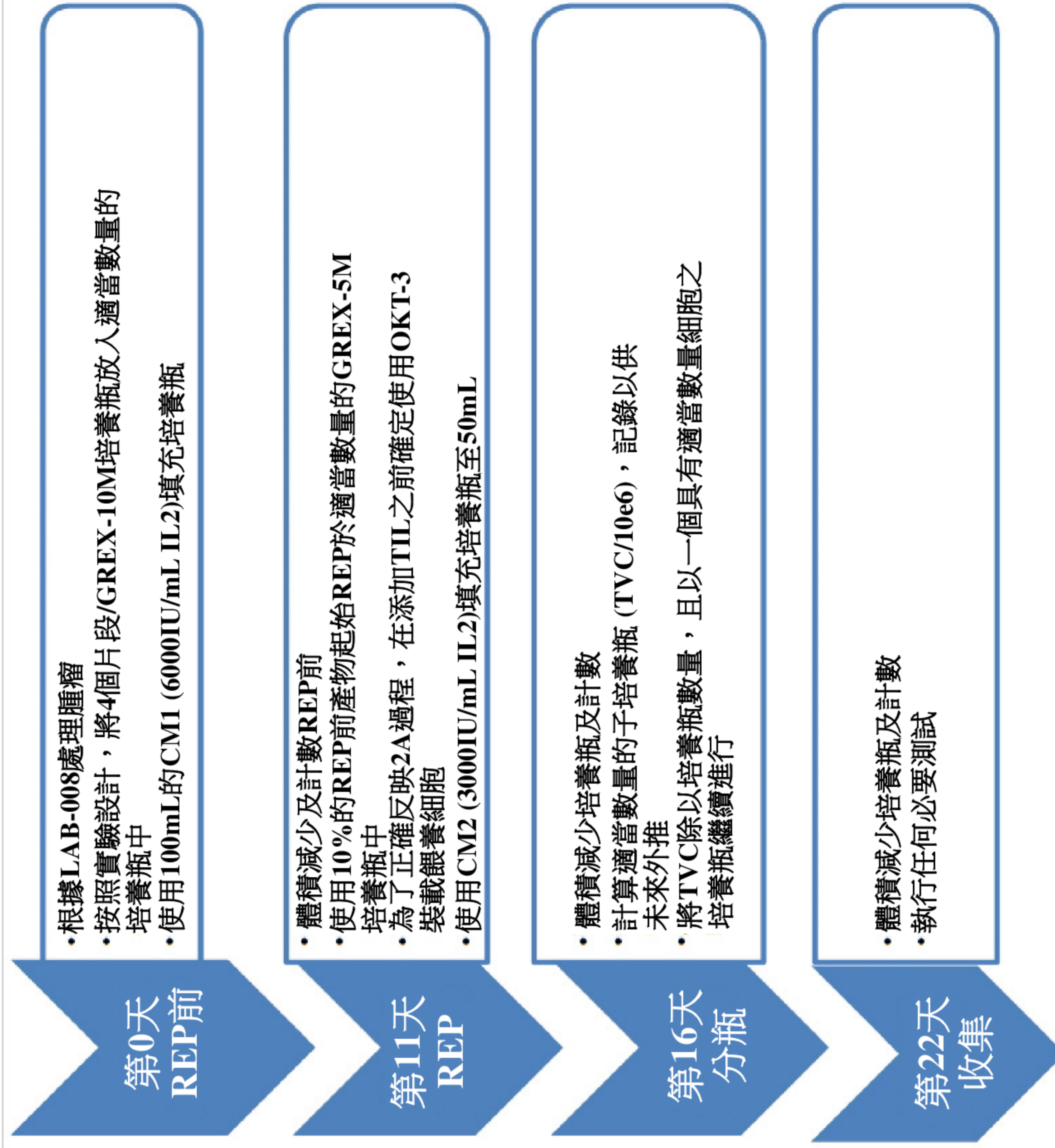
30 Min

60 min

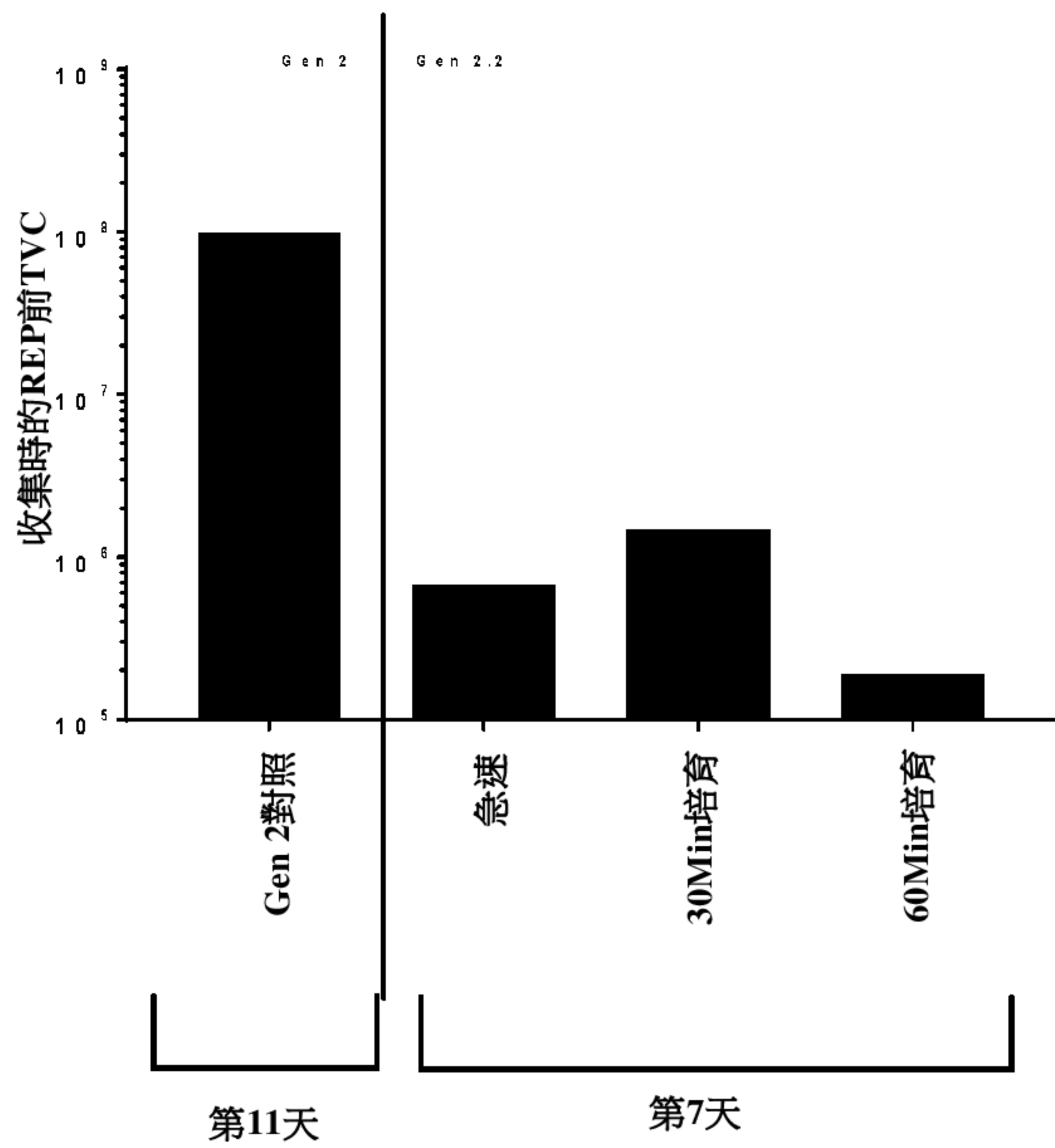


【圖 11】

1/100規模TIL產生

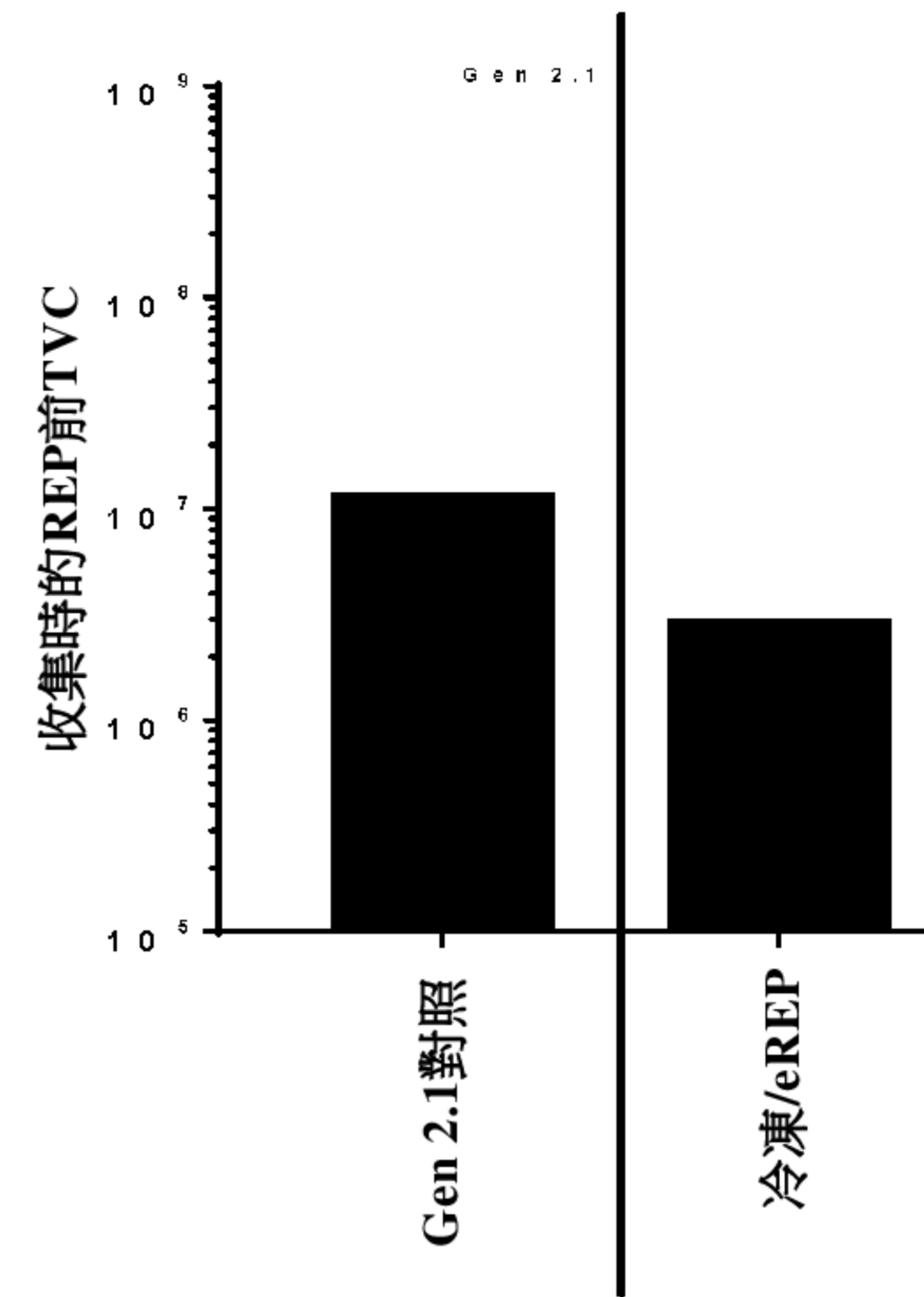


【圖 12】



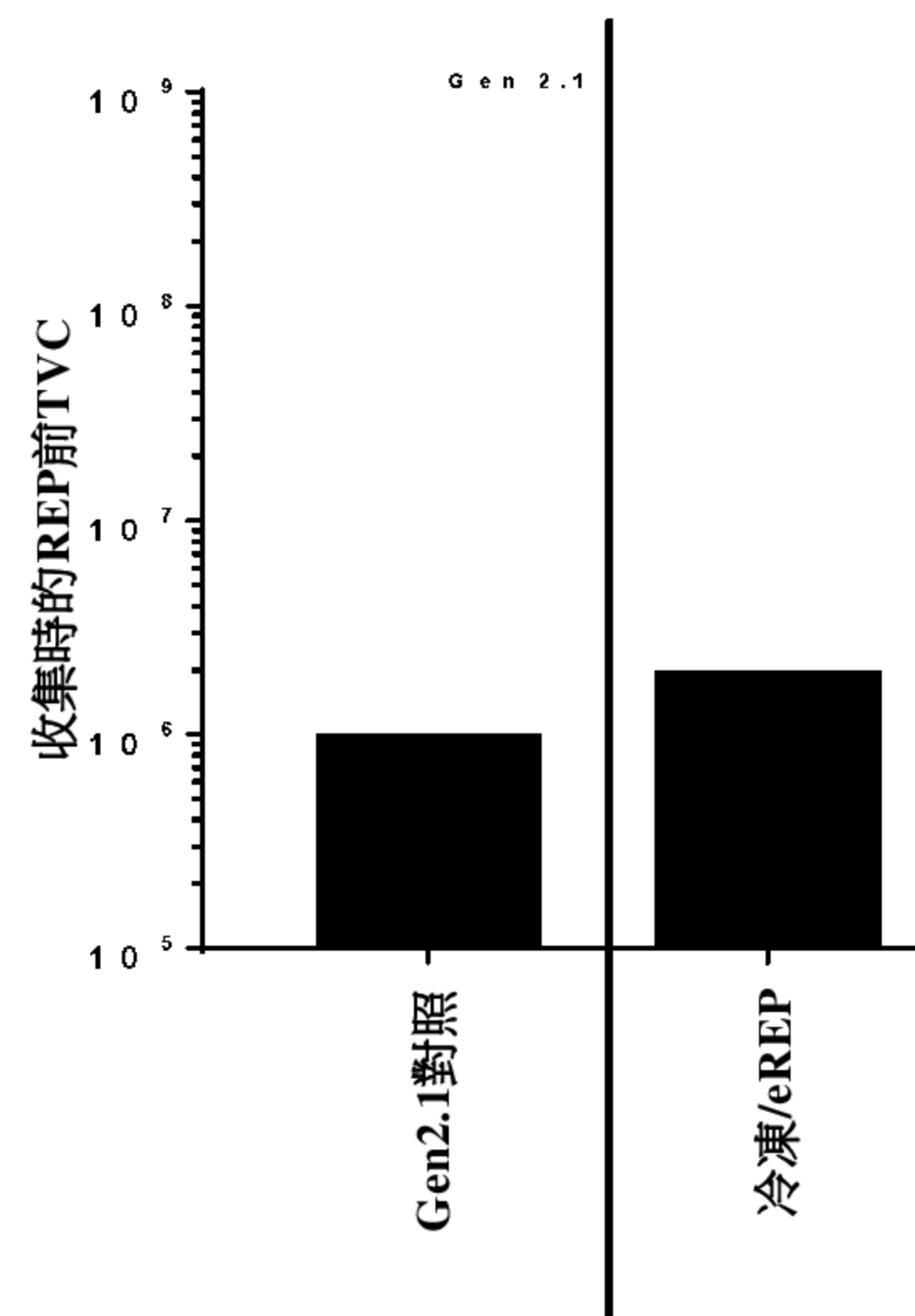
| REP前 | 新鮮 (第11天) | 冷凍 (第7天) |
|------------|-----------|----------|
| Gen 2對照(組) | 1.0E+08 | - |
| 急速 0 min | - | 6.7E+05 |
| 30 min 培育 | - | 1.6E+06 |
| 60 min 培育 | - | 1.9E+05 |

【圖 13A】



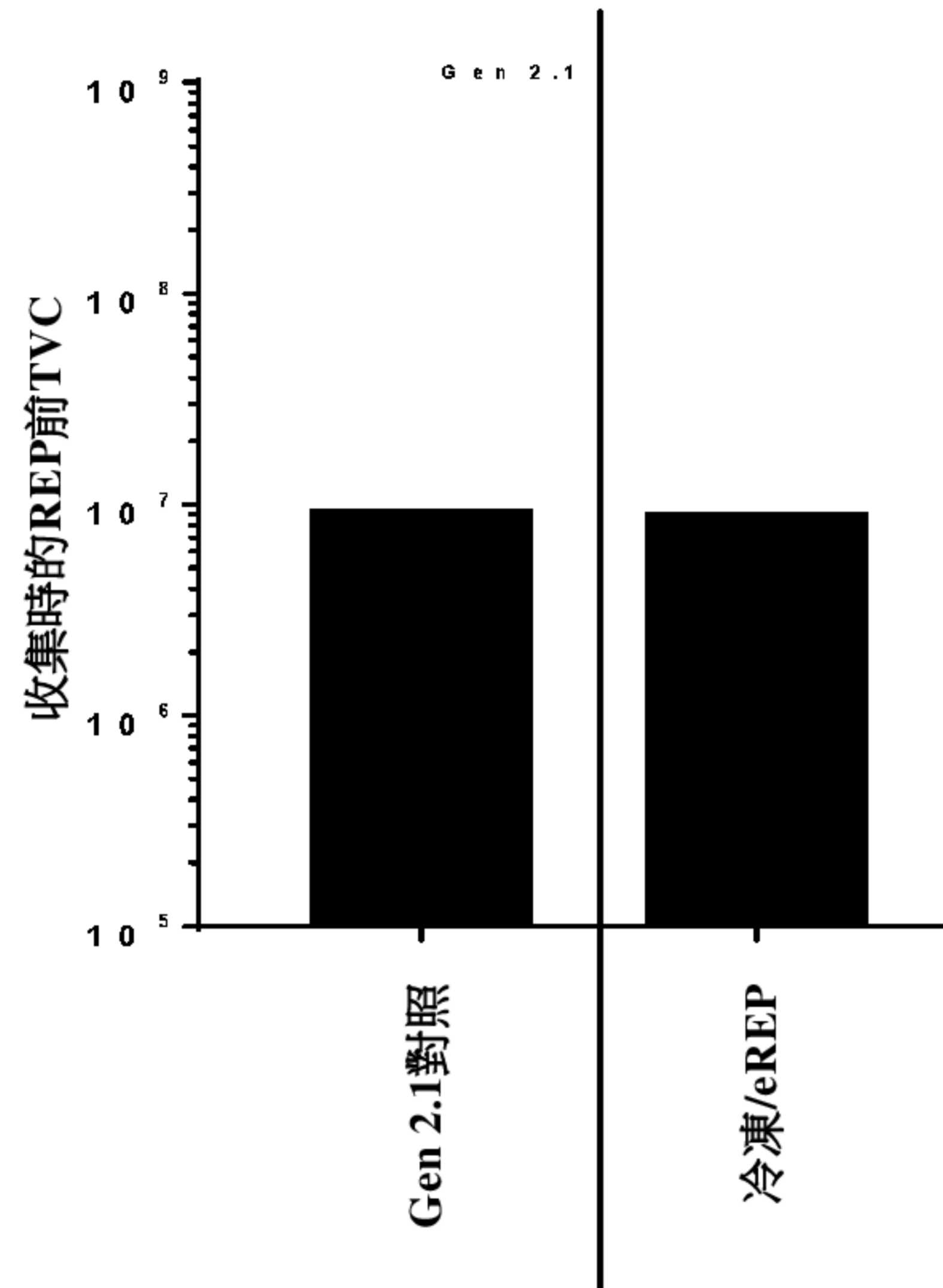
| REP前 | 新鮮 (第11天) | 冷凍 (第7天) |
|--------------|-----------|----------|
| Gen 2.1對照(組) | 12E+06 | - |
| 冷凍/eREP | - | 3E+06 |

【圖 13B】



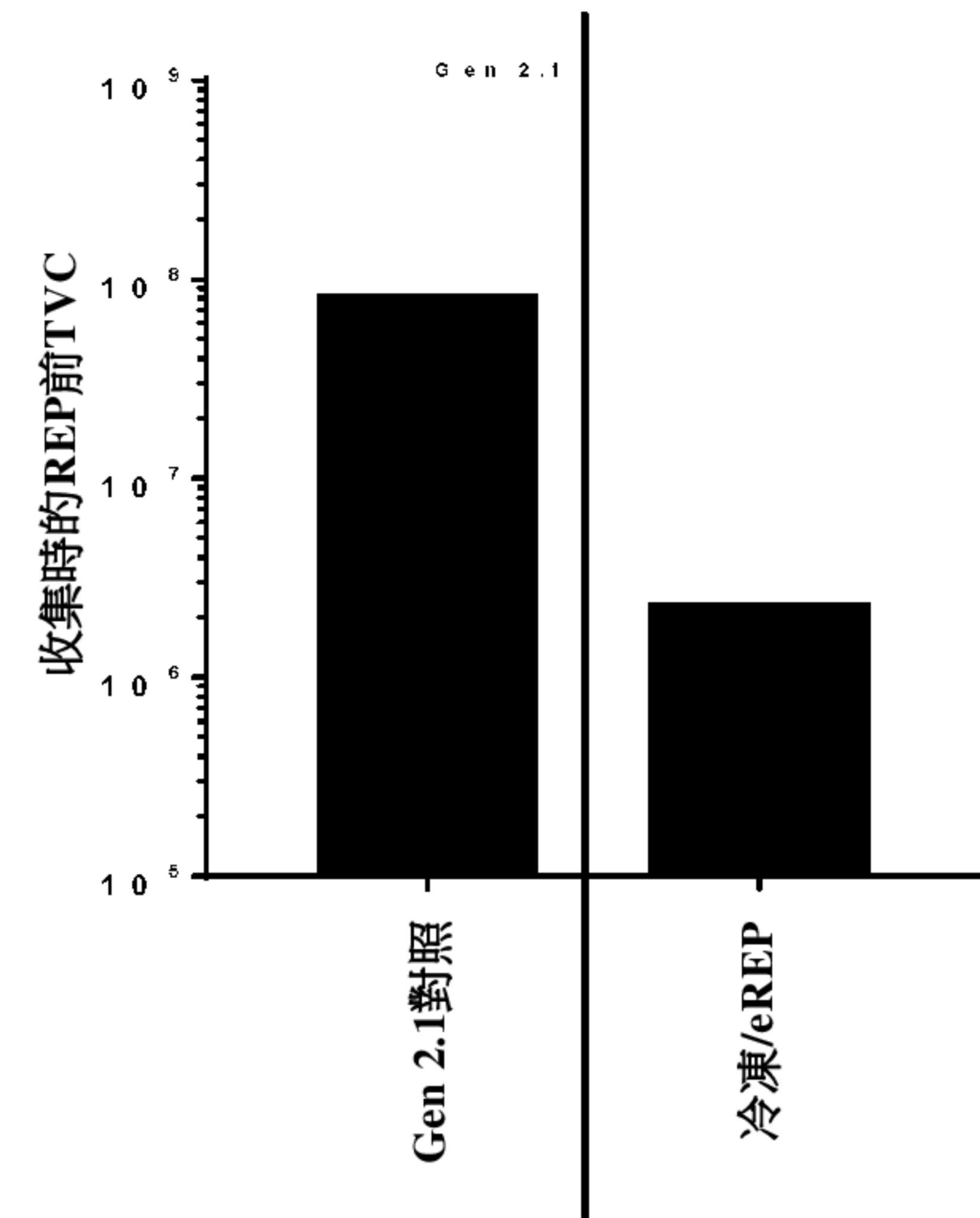
| REP前 | 新鮮 (第11天) | 冷凍 (第7天) |
|--------------|-----------|----------|
| Gen 2.1對照(組) | 1E+06 | - |
| 冷凍/eREP | - | 2E+06 |

【圖 13C】



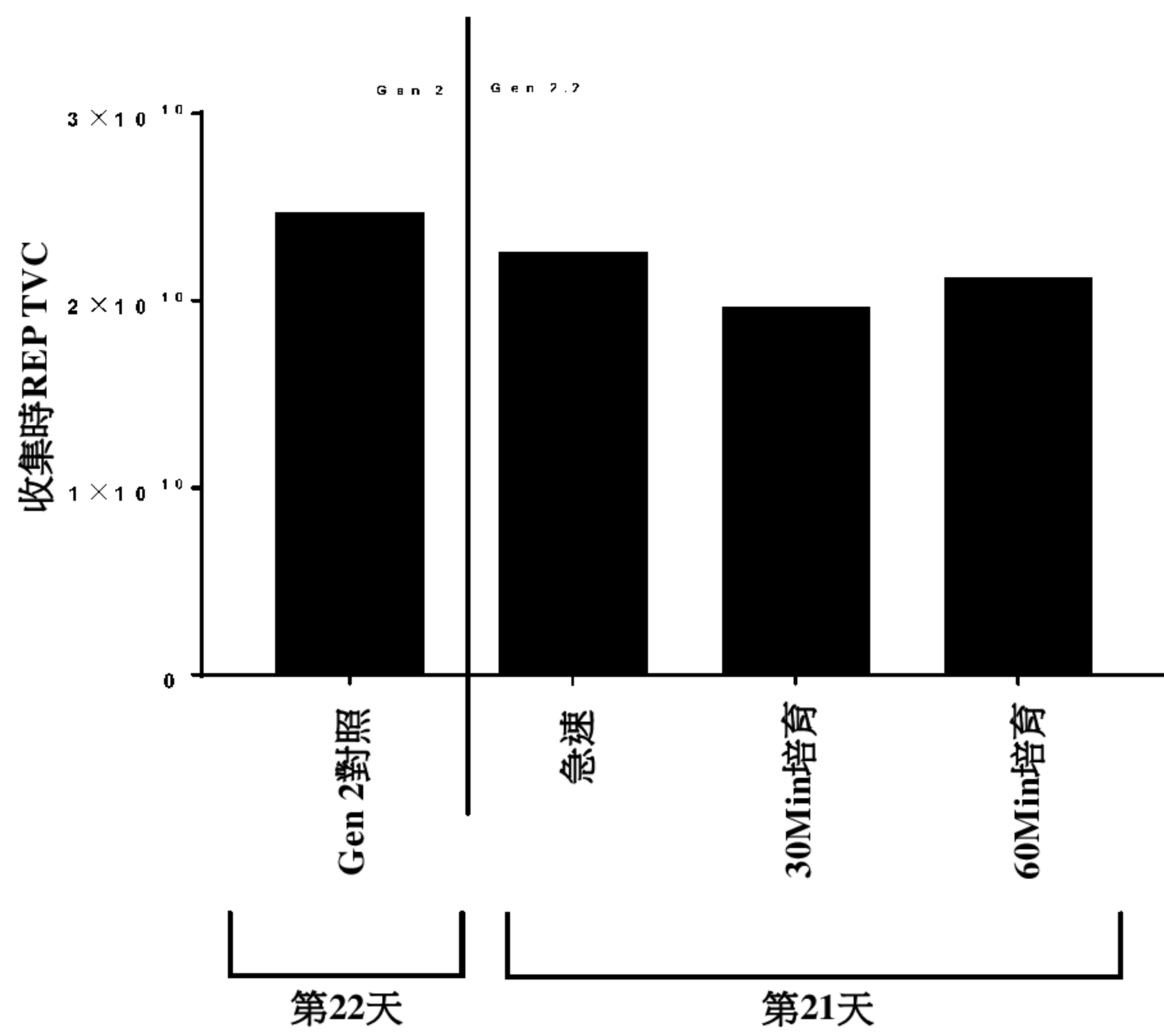
| REP前 | 新鮮 (第11天) | 冷凍 (第7天) |
|--------------|--------------|-------------|
| Gen 2.1對照(組) | 9.5E+06 | - |
| 冷凍/eREP | - | 9.2E+06 |

【圖 13D】



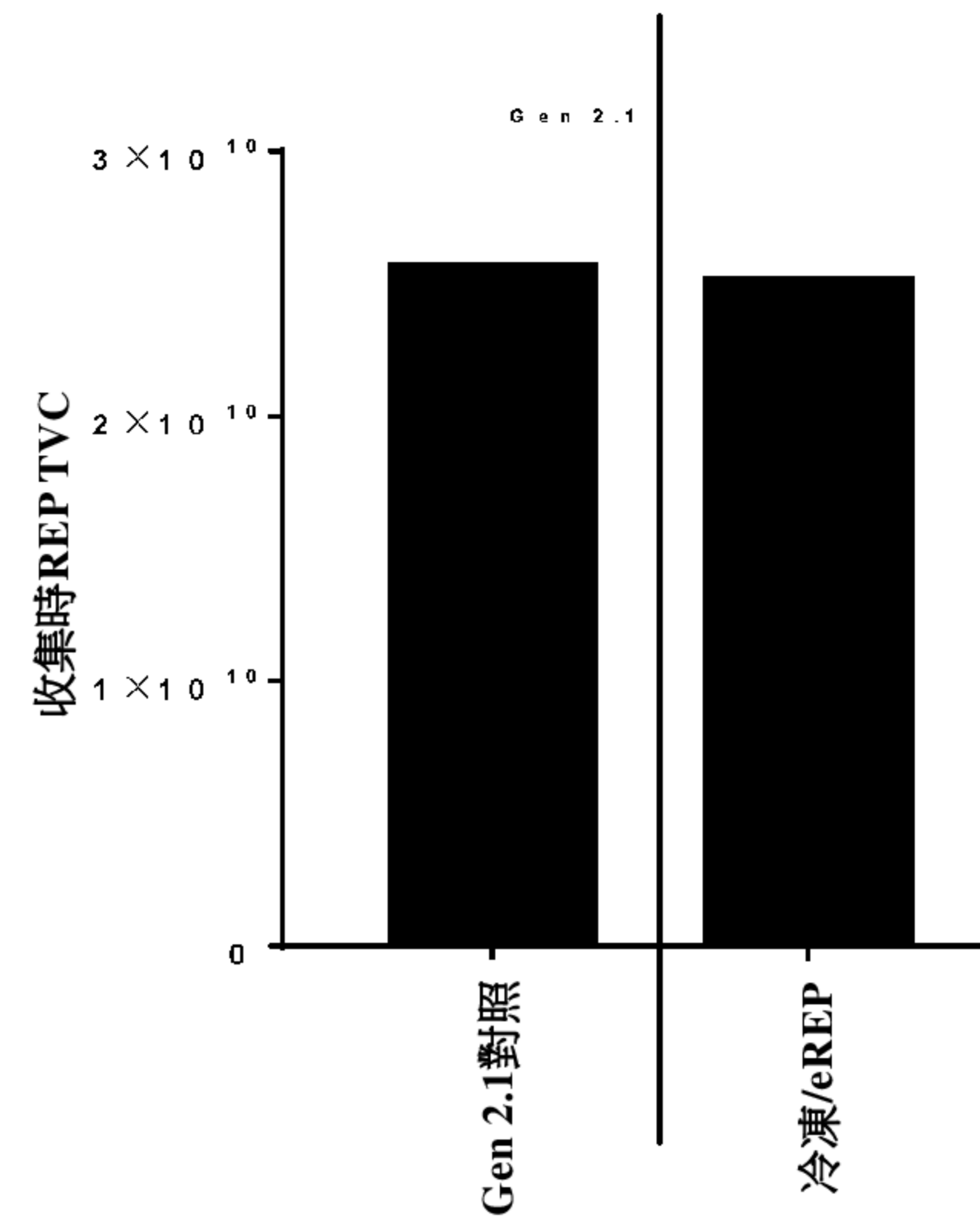
| REP前 | 新鮮 (第11天) | 冷凍 (第7天) |
|--------------|--------------|-------------|
| Gen 2.1對照(組) | 85E+06 | - |
| 冷凍/eREP | - | 2.4E+06 |

【圖 13E】



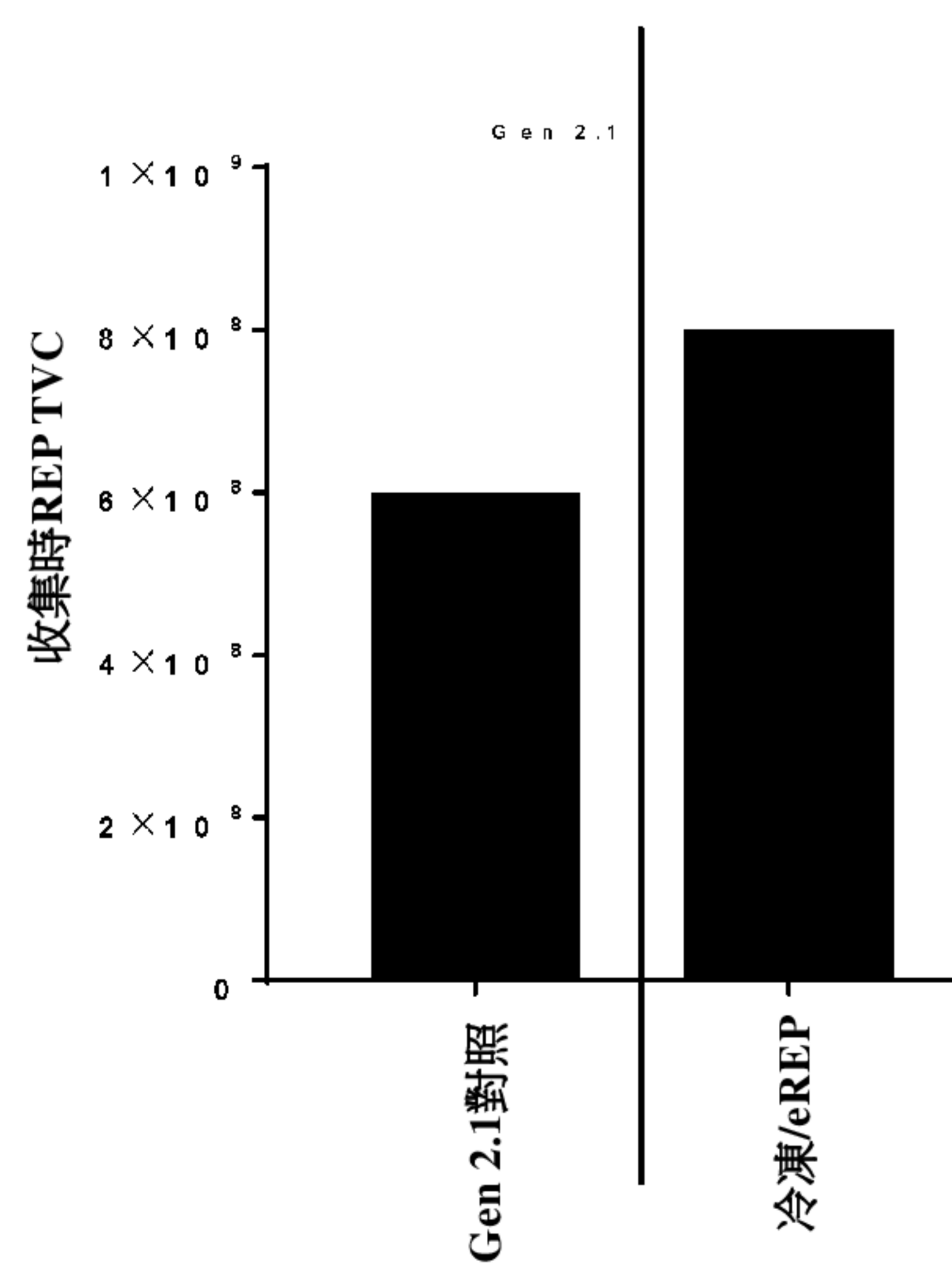
| 總REP產率 | Gen 2 (第22天) | 冷凍/早期REP(第21天) |
|-------------|--------------|----------------|
| Gen 2 對照(組) | 24.7E+09 | - |
| 急速0min | - | 22.6E+09 |
| 30Min培育 | - | 19.7E+09 |
| 60Min培育 | - | 21.2E+09 |

【圖 14A】



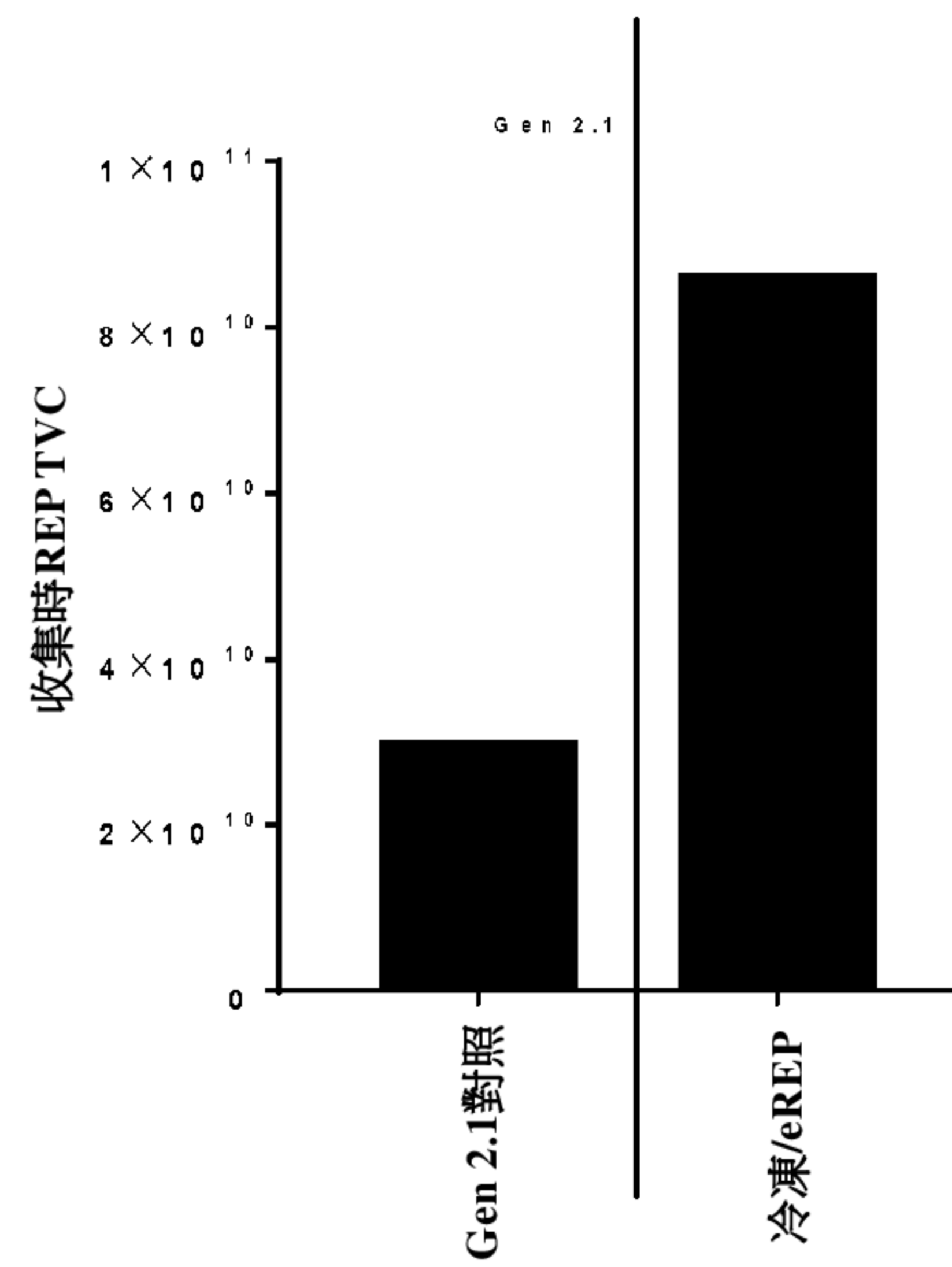
| 總REP產率 | Gen 2 (第22天) | 冷凍/早期REP(第21天) |
|--------------|--------------|----------------|
| Gen 2.1對照(組) | 25.8E+09 | - |
| 冷凍/eREP | - | 25.3E+09 |

【圖 14B】



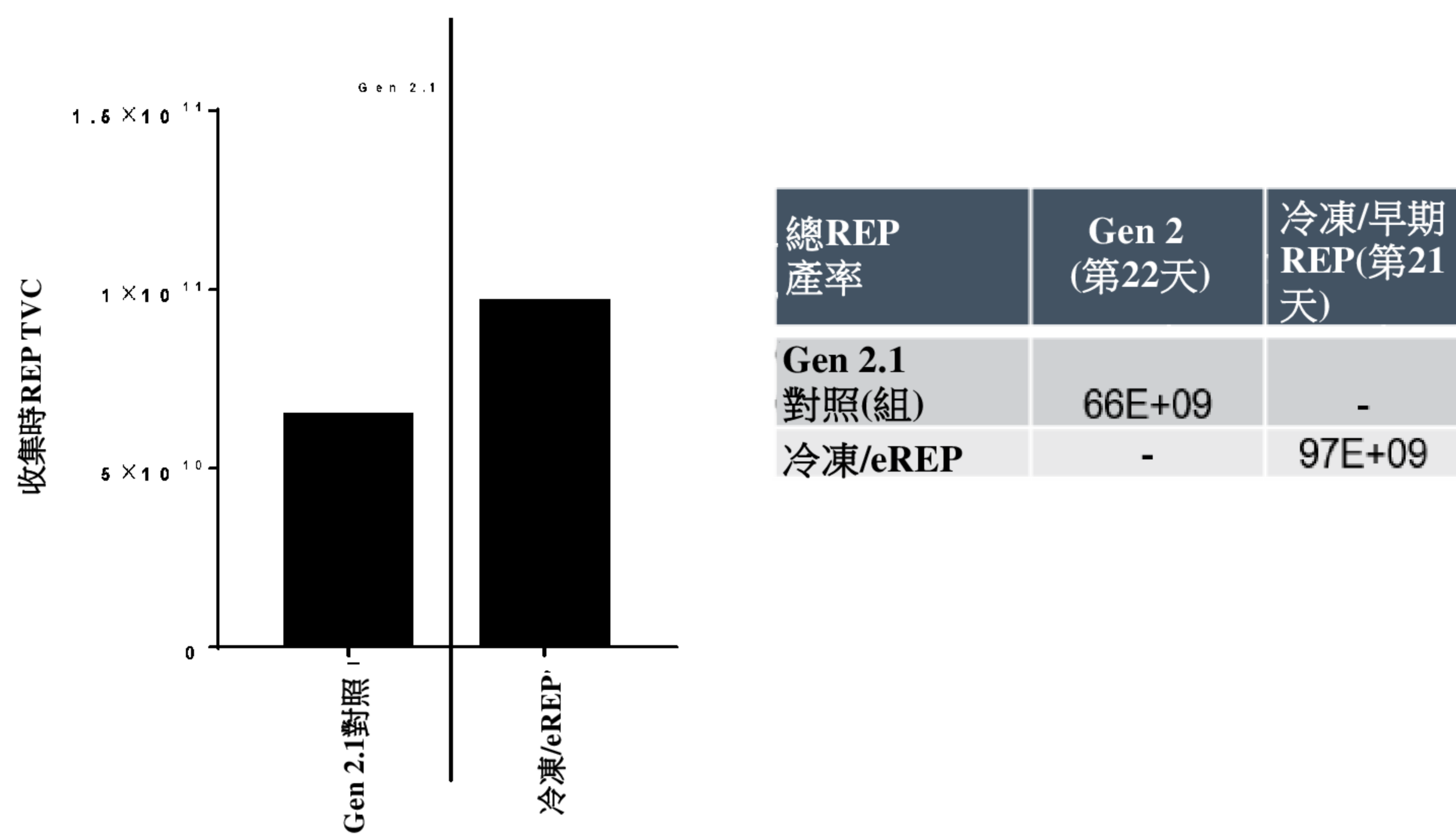
| 總REP產率 | Gen 2 (第22天) | 冷凍/早期REP(第21天) |
|--------------|--------------|----------------|
| Gen 2.1對照(組) | 0.6E+09 | - |
| 冷凍/eREP | - | 0.8E+09 |

【圖 14C】

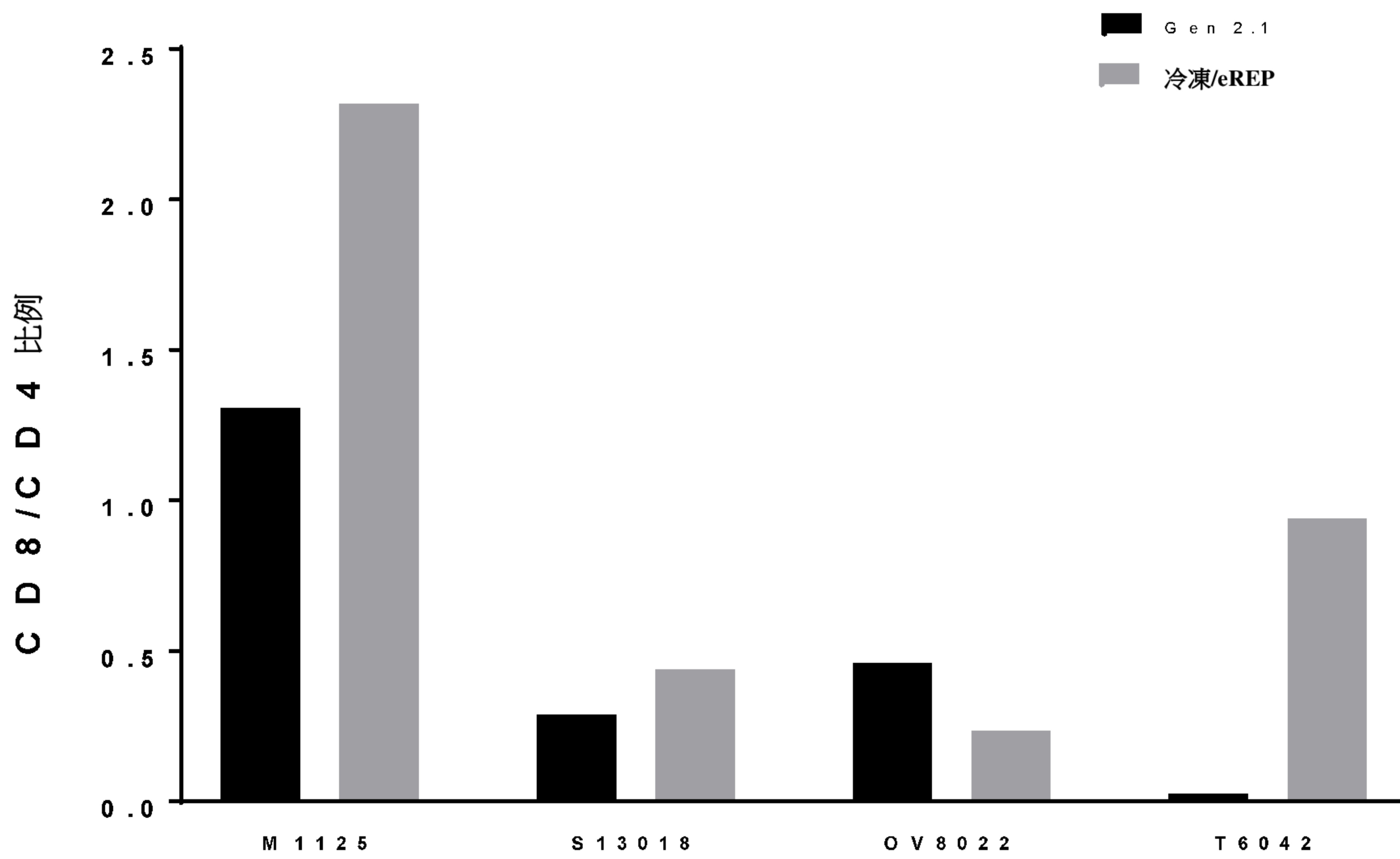


| 總REP產率 | Gen 2 (第22天) | 冷凍/早期REP(第21天) |
|--------------|--------------|----------------|
| Gen 2.1對照(組) | 30E+09 | - |
| 冷凍/eREP | - | 87E+09 |

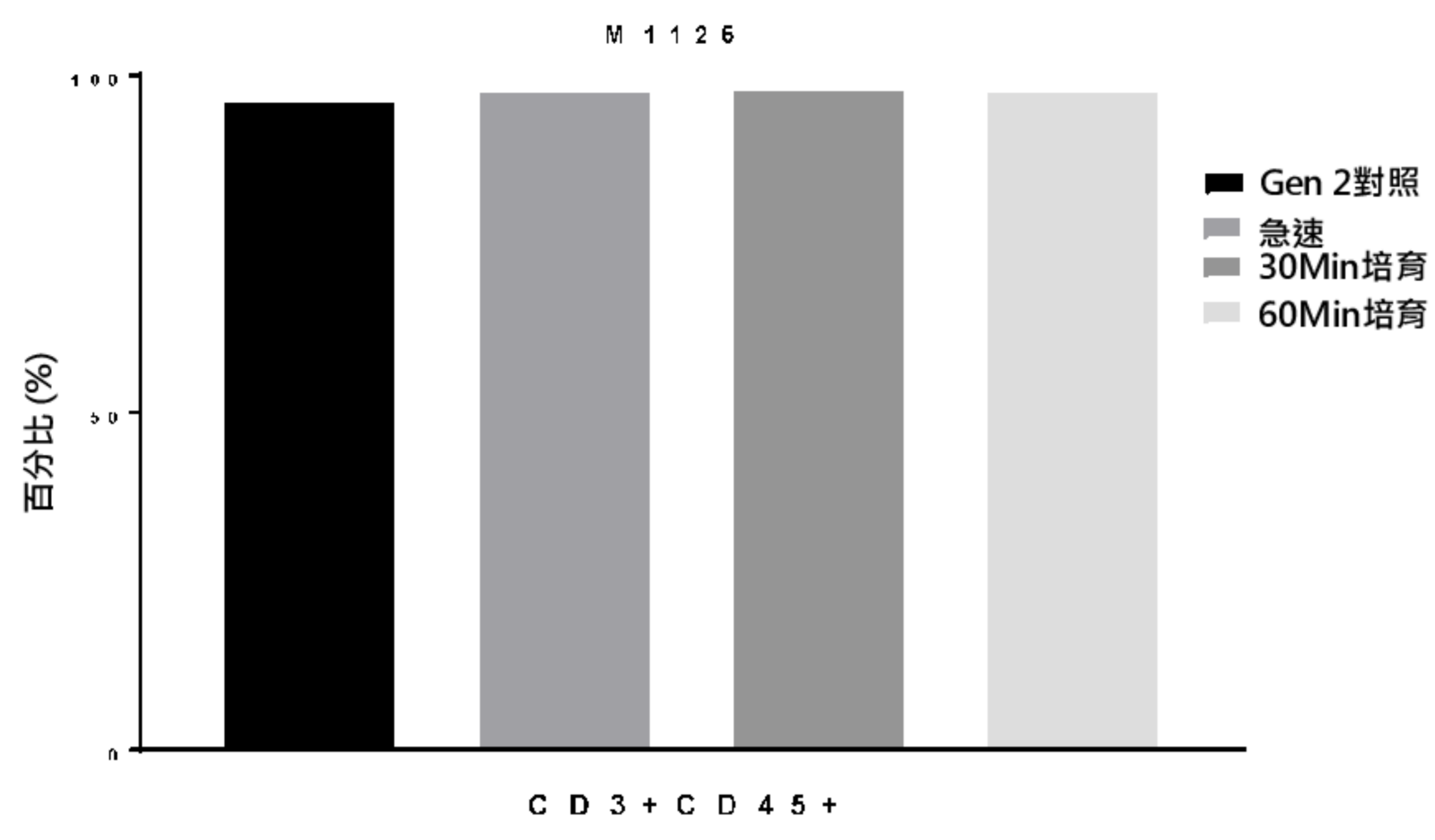
【圖 14D】



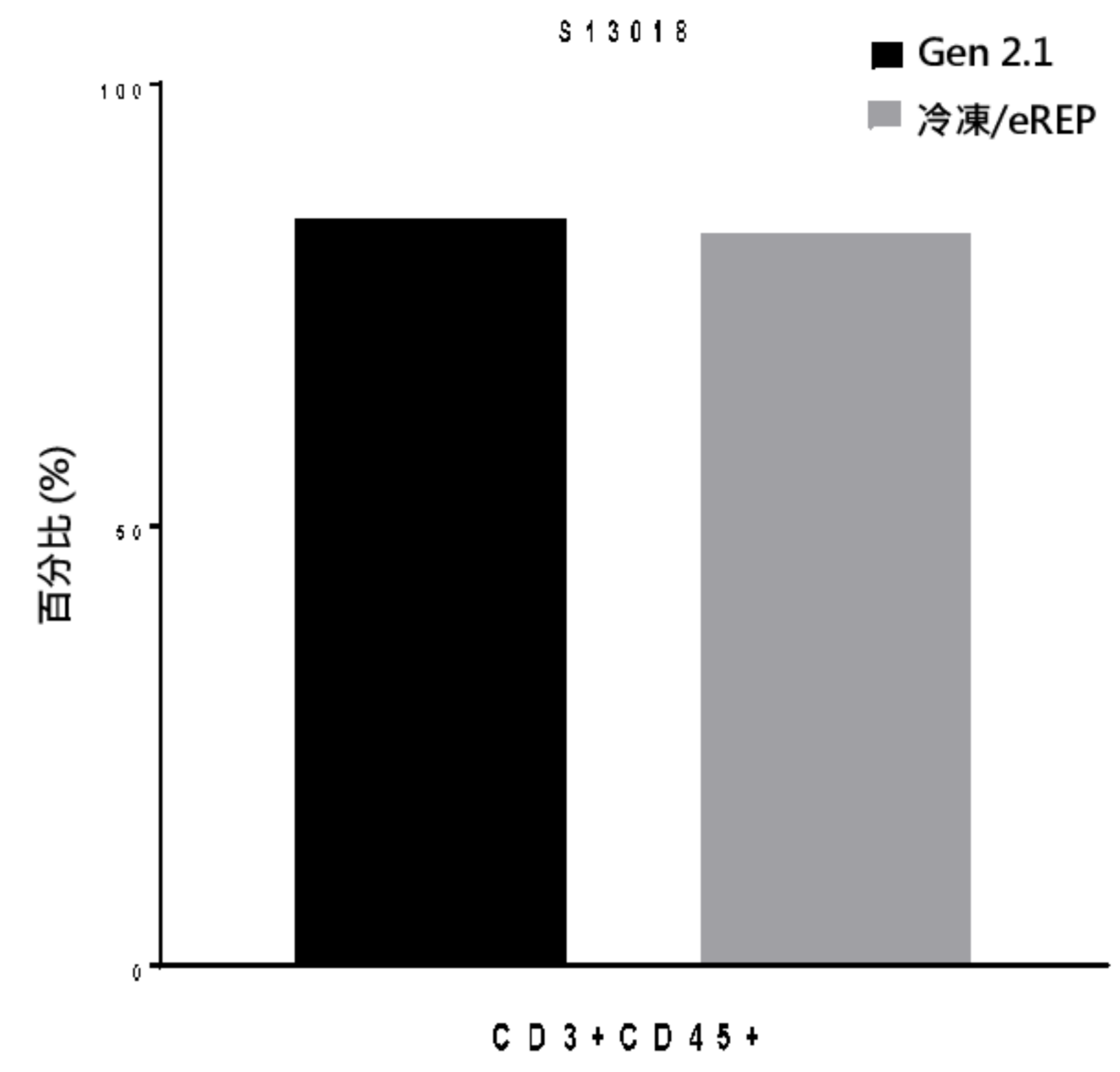
【圖 14E】



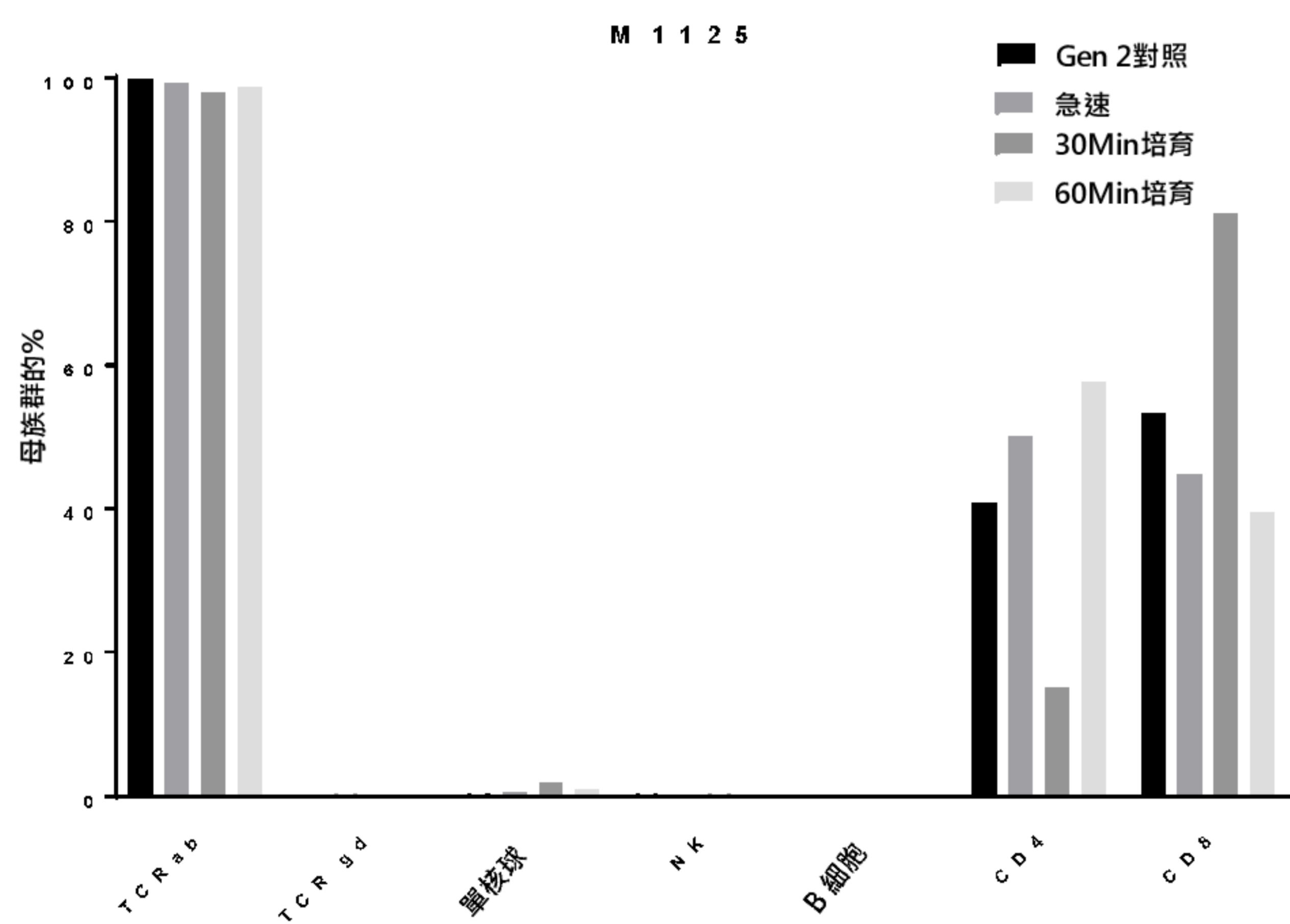
【圖 15】



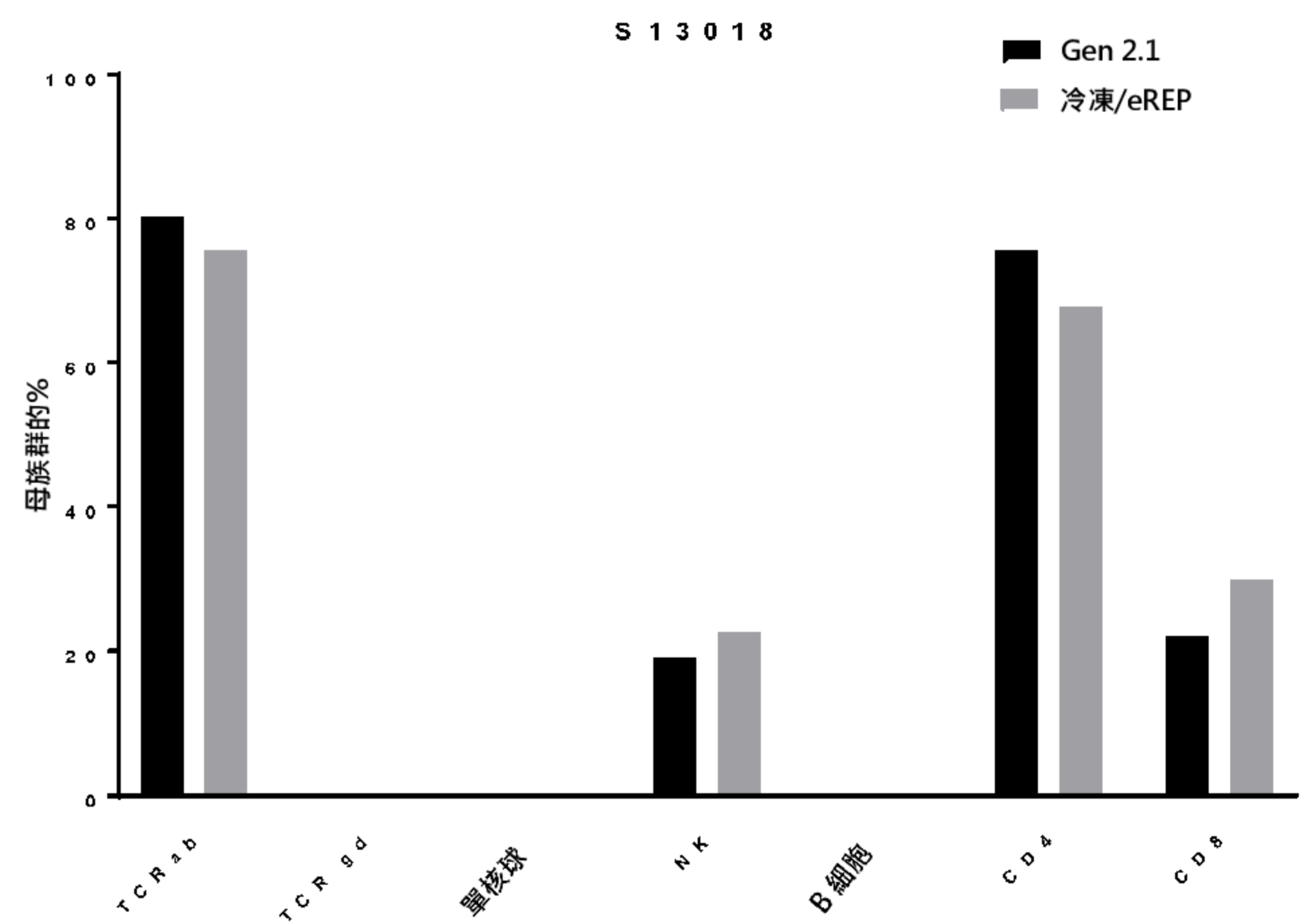
【圖 16A】



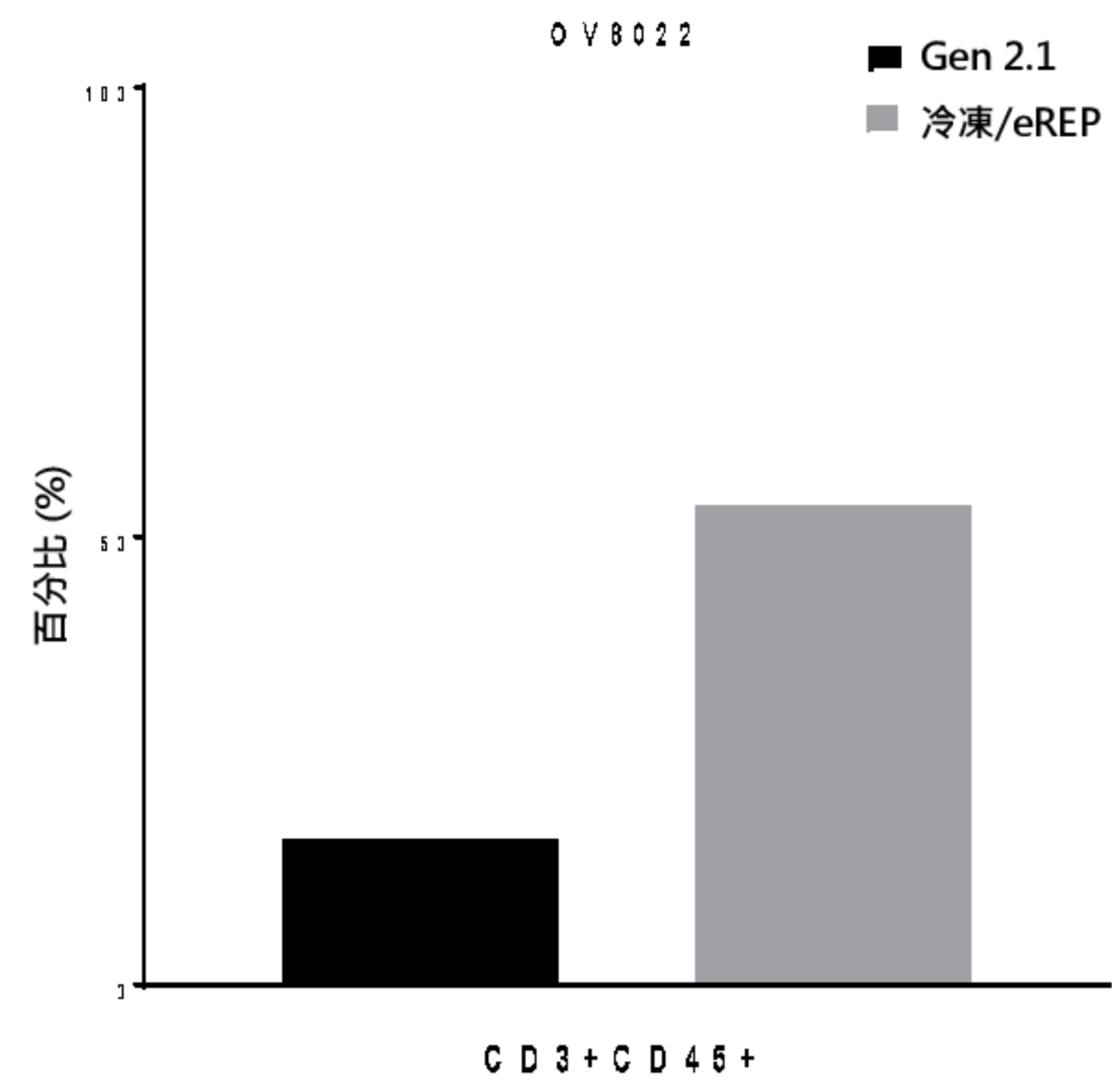
【圖 16C】



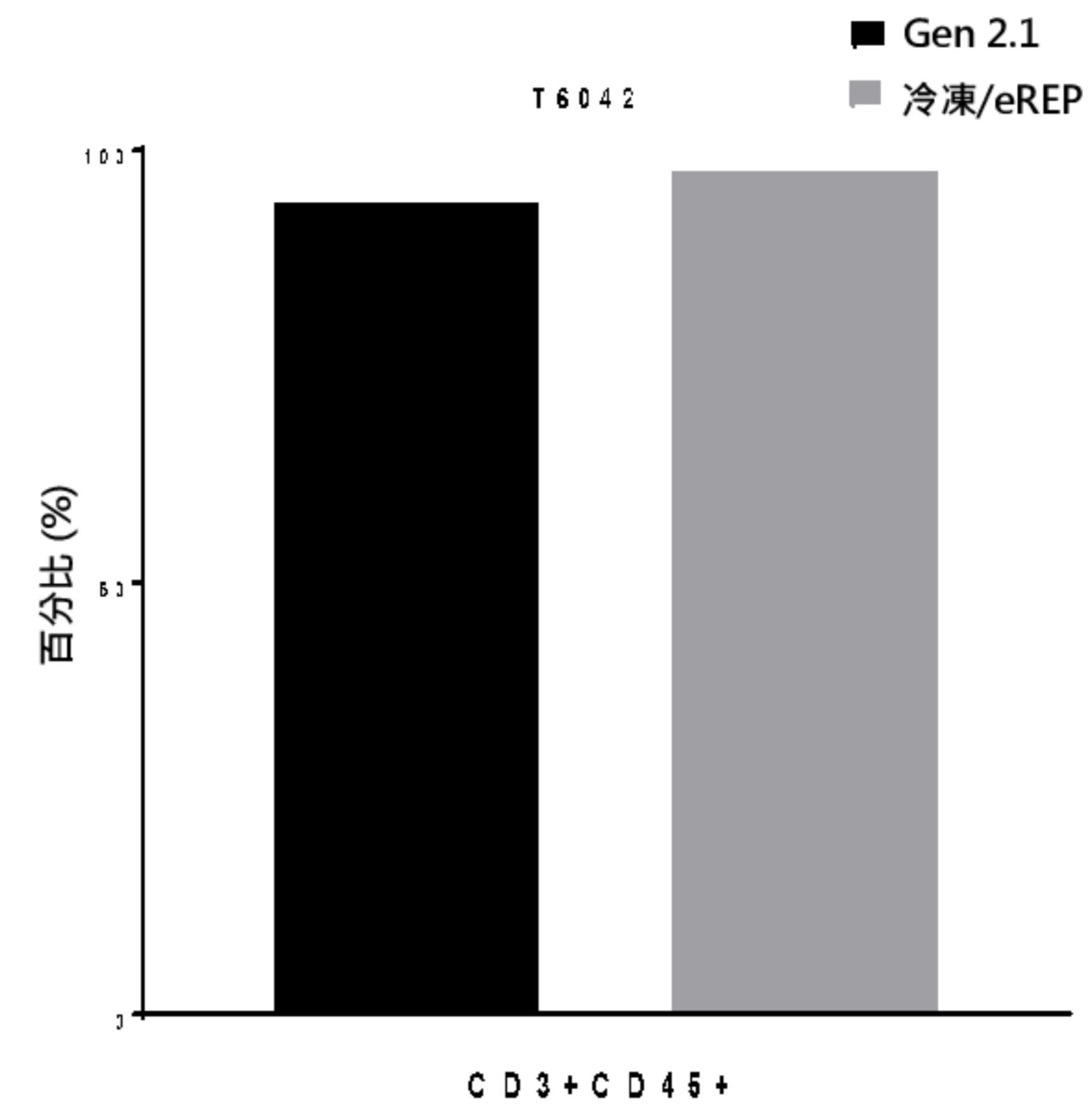
【圖 16B】



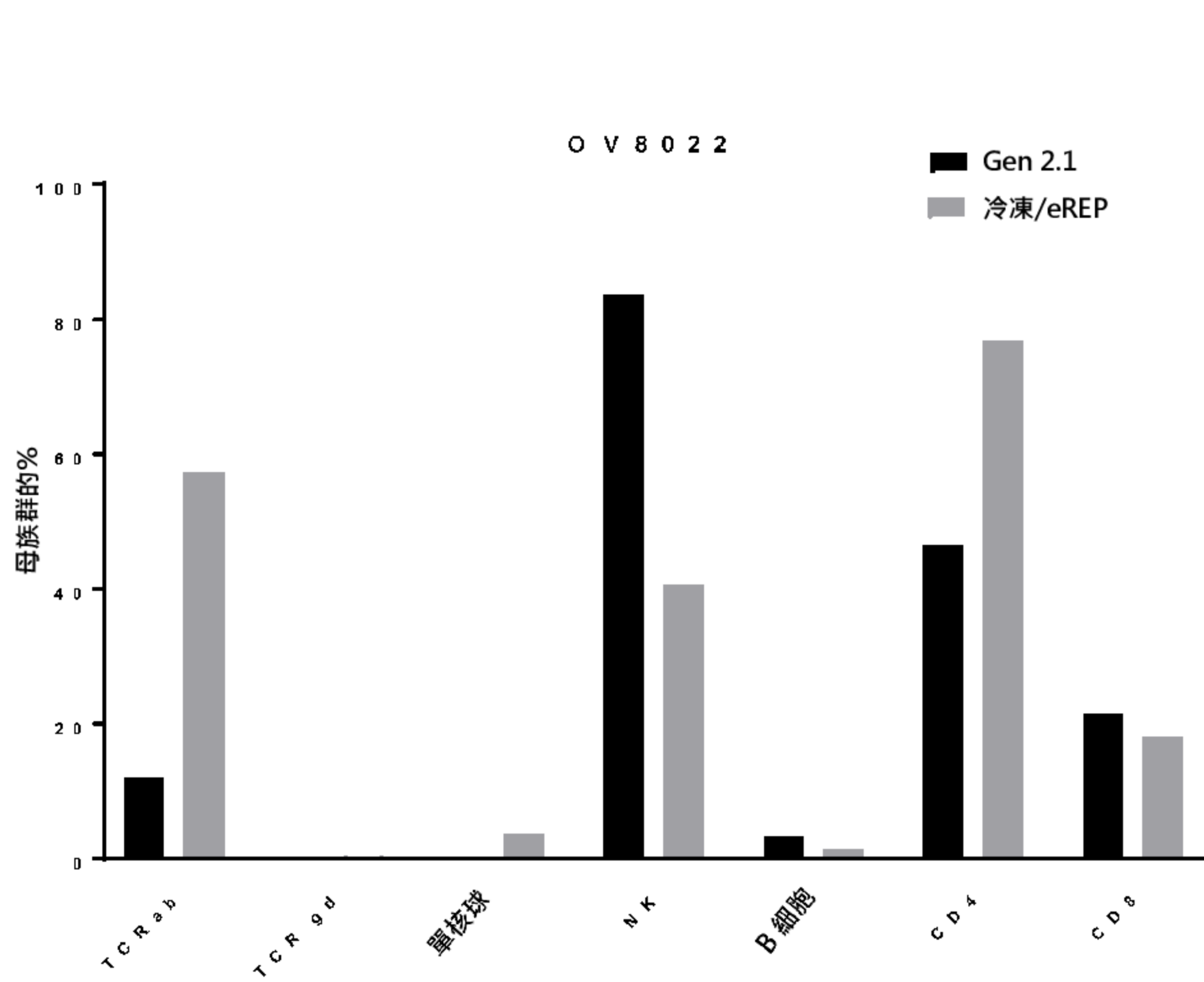
【圖 16D】



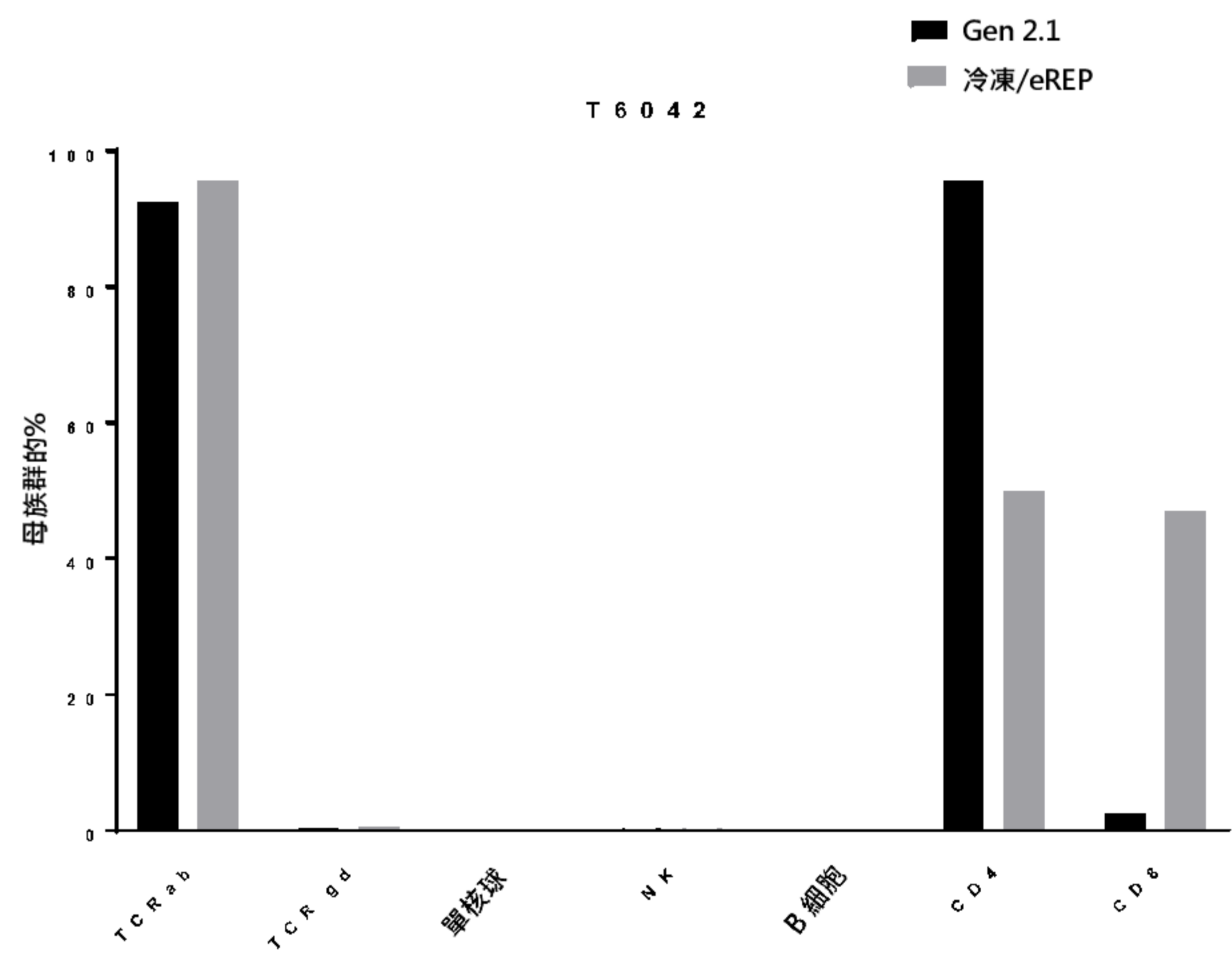
【圖 16E】



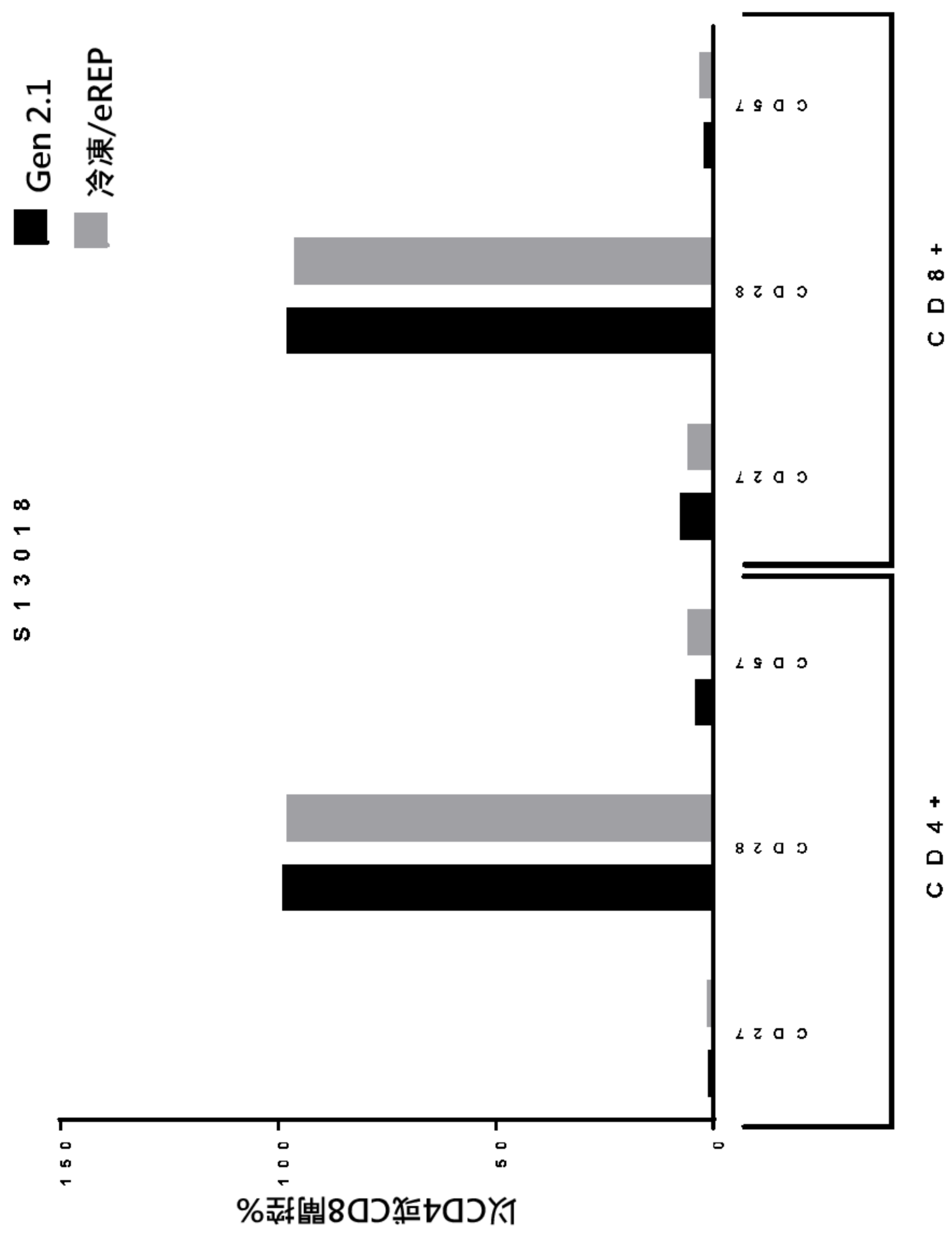
【圖 16G】



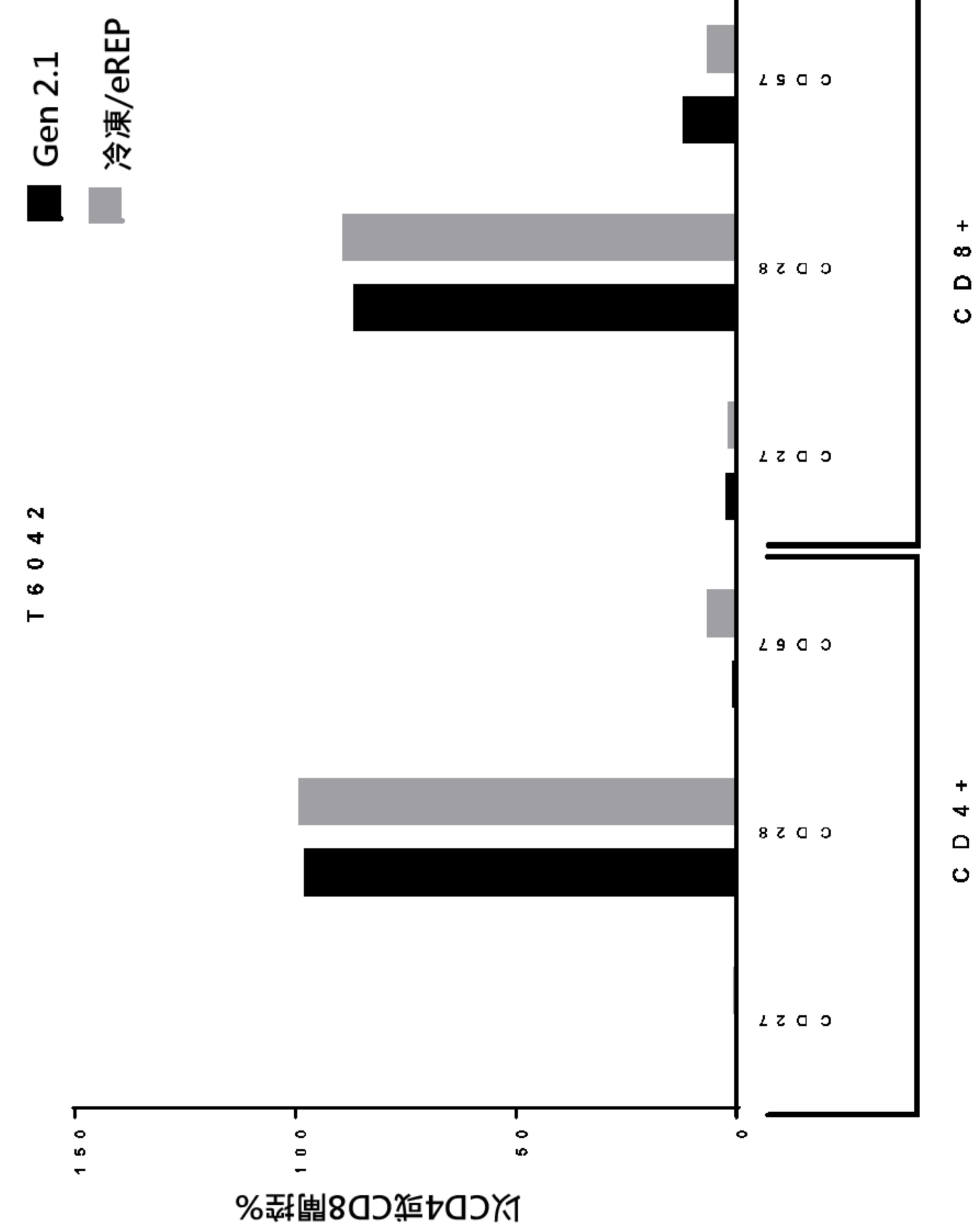
【圖 16F】



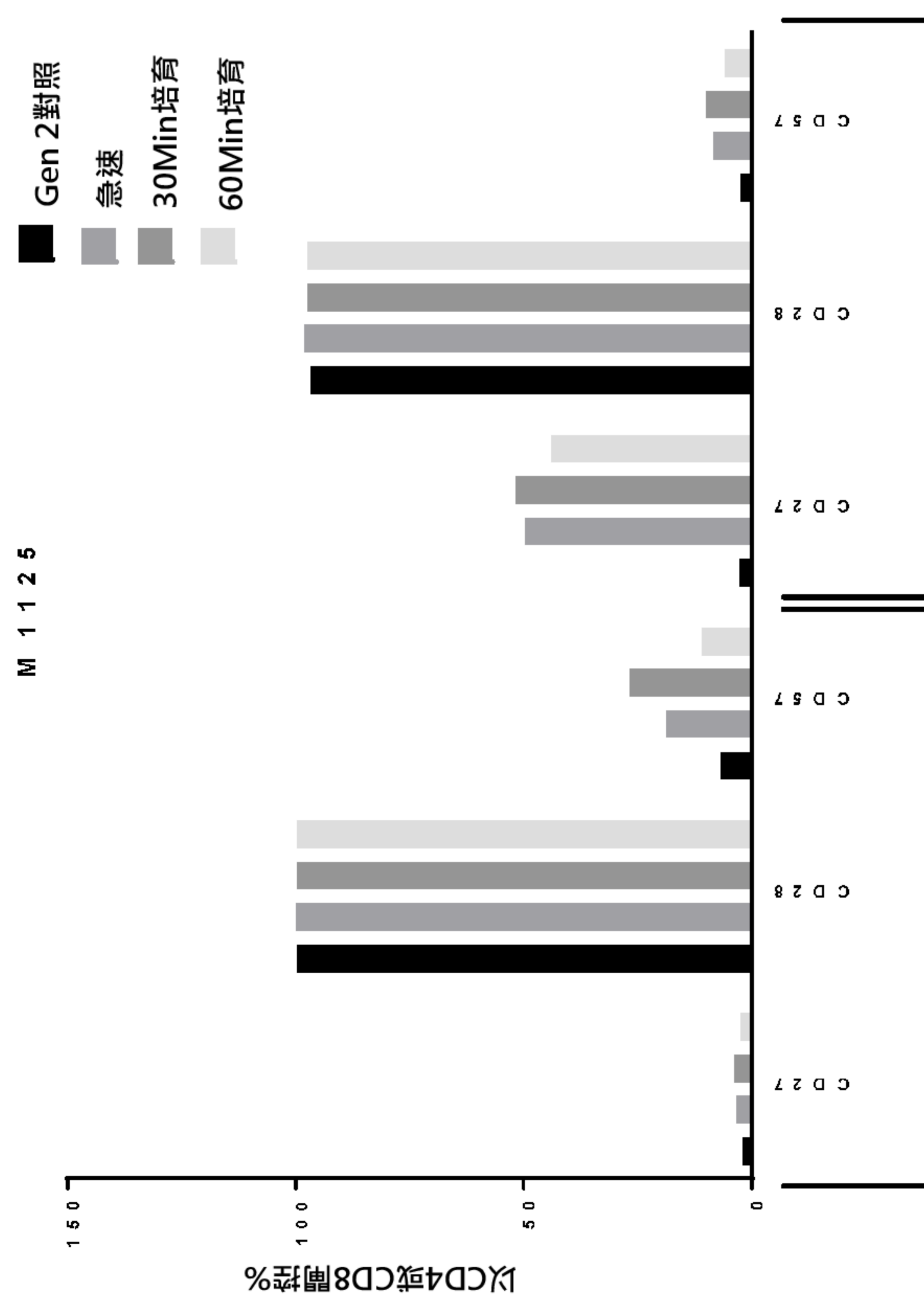
【圖 16H】



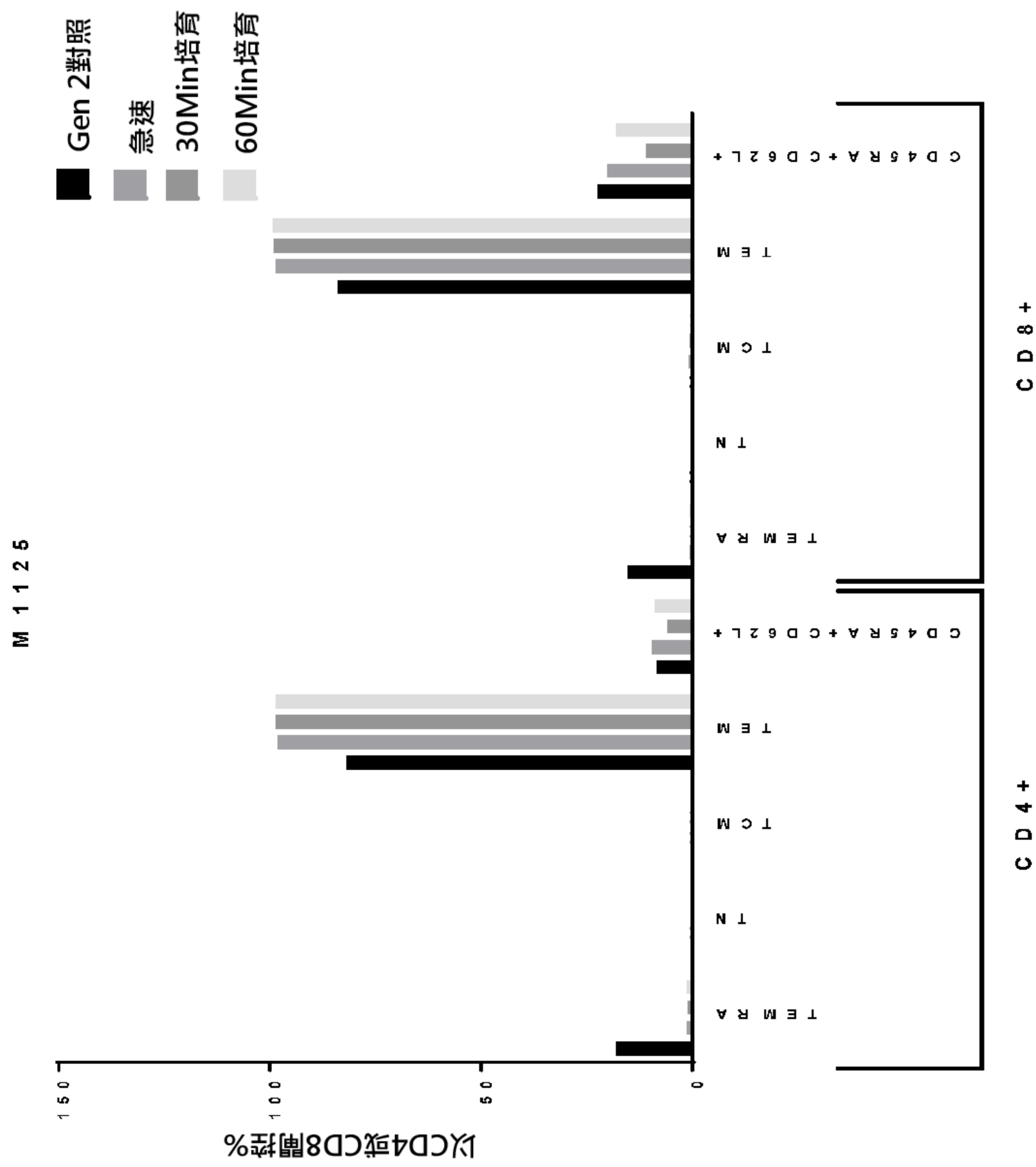
【圖 17B】



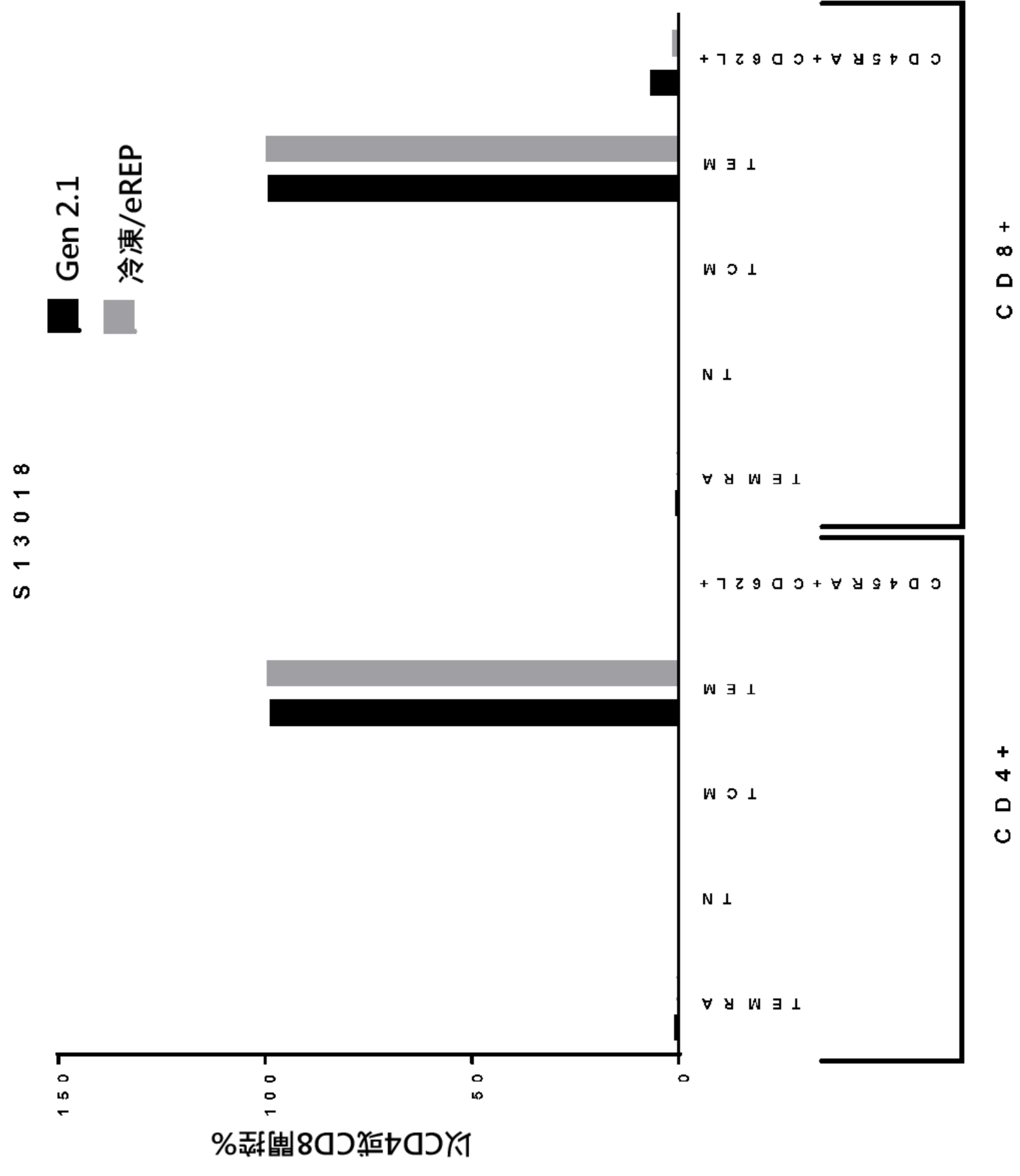
【圖 17C】



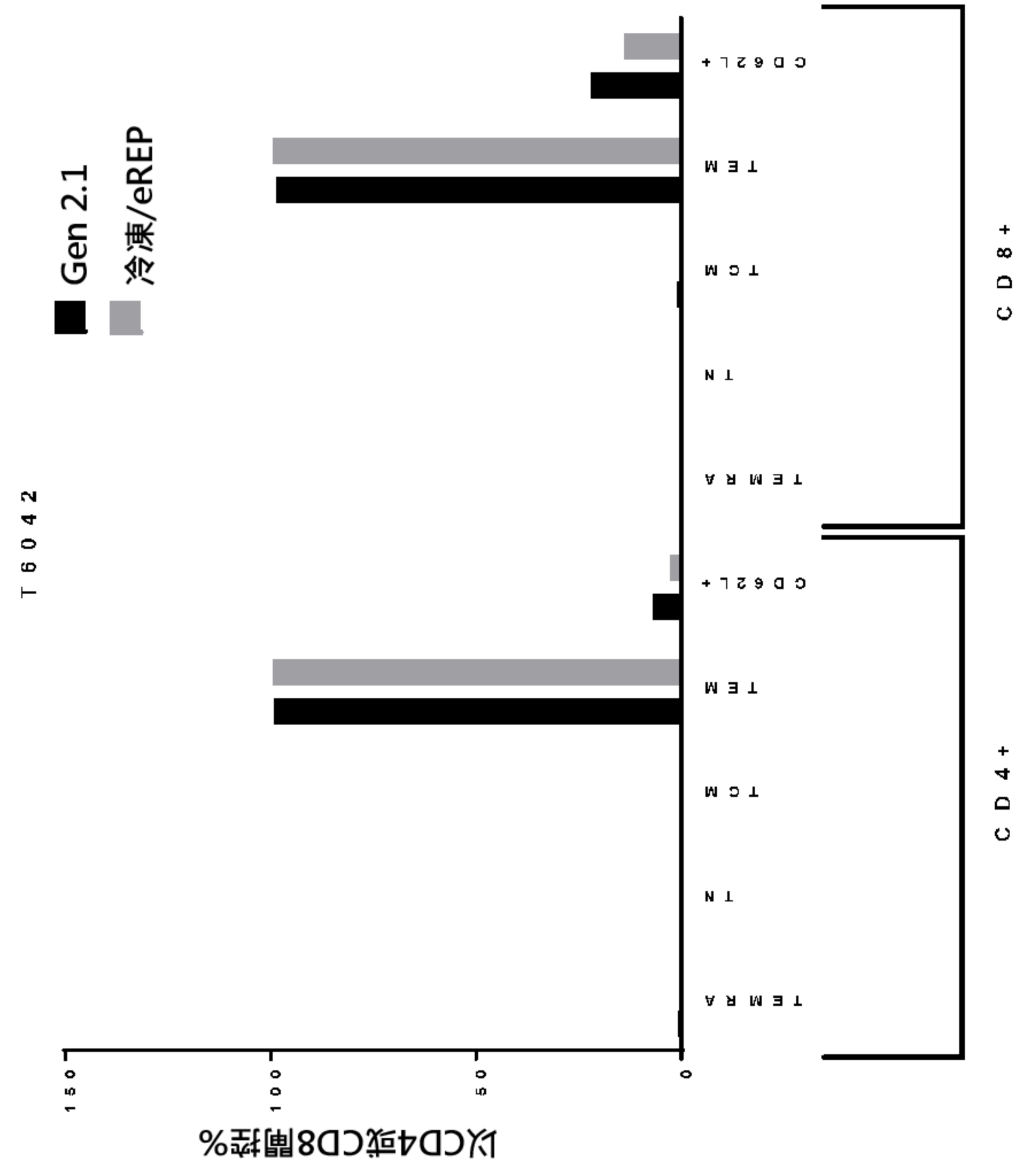
【圖 17A】



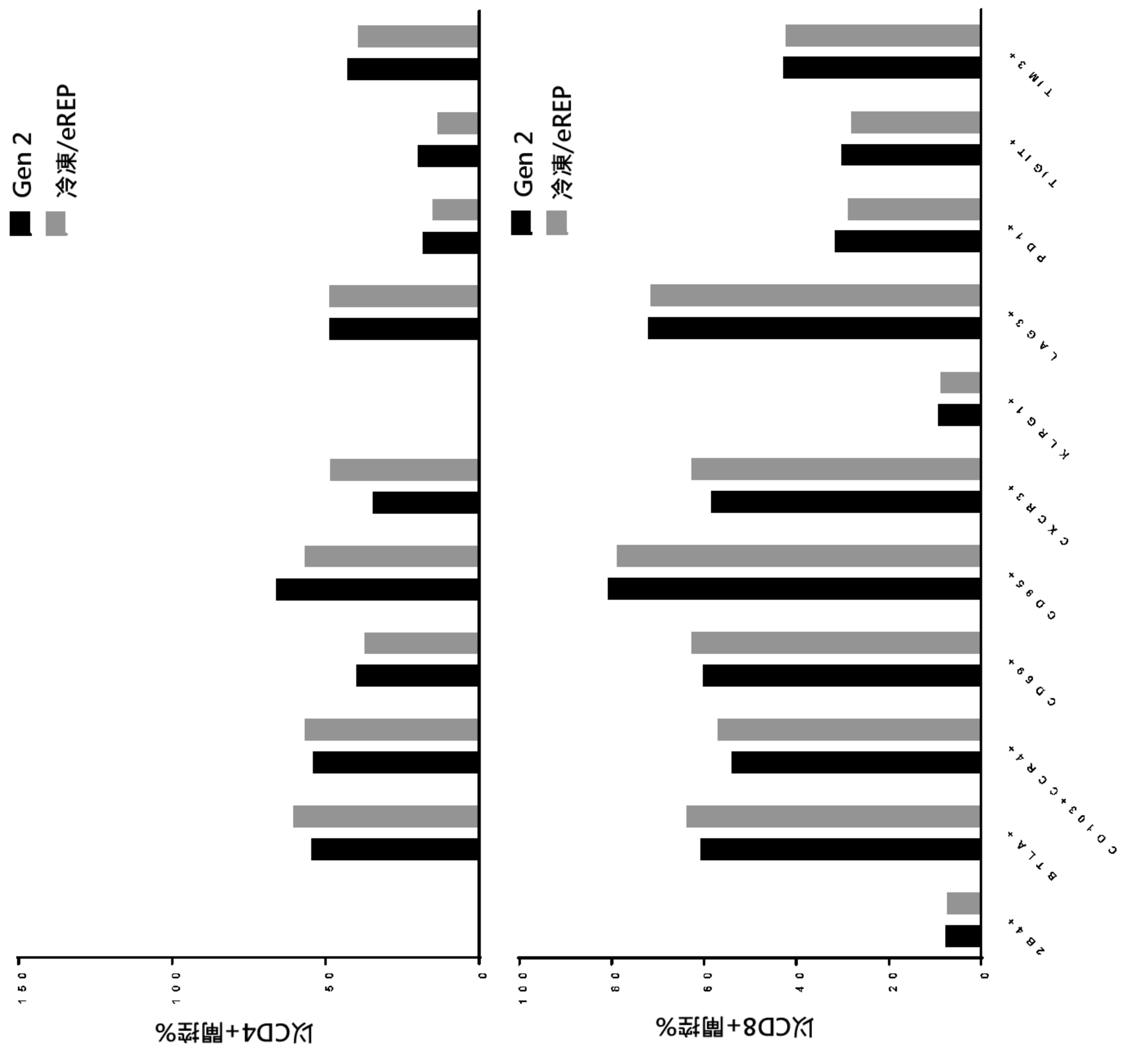
【圖 18A】



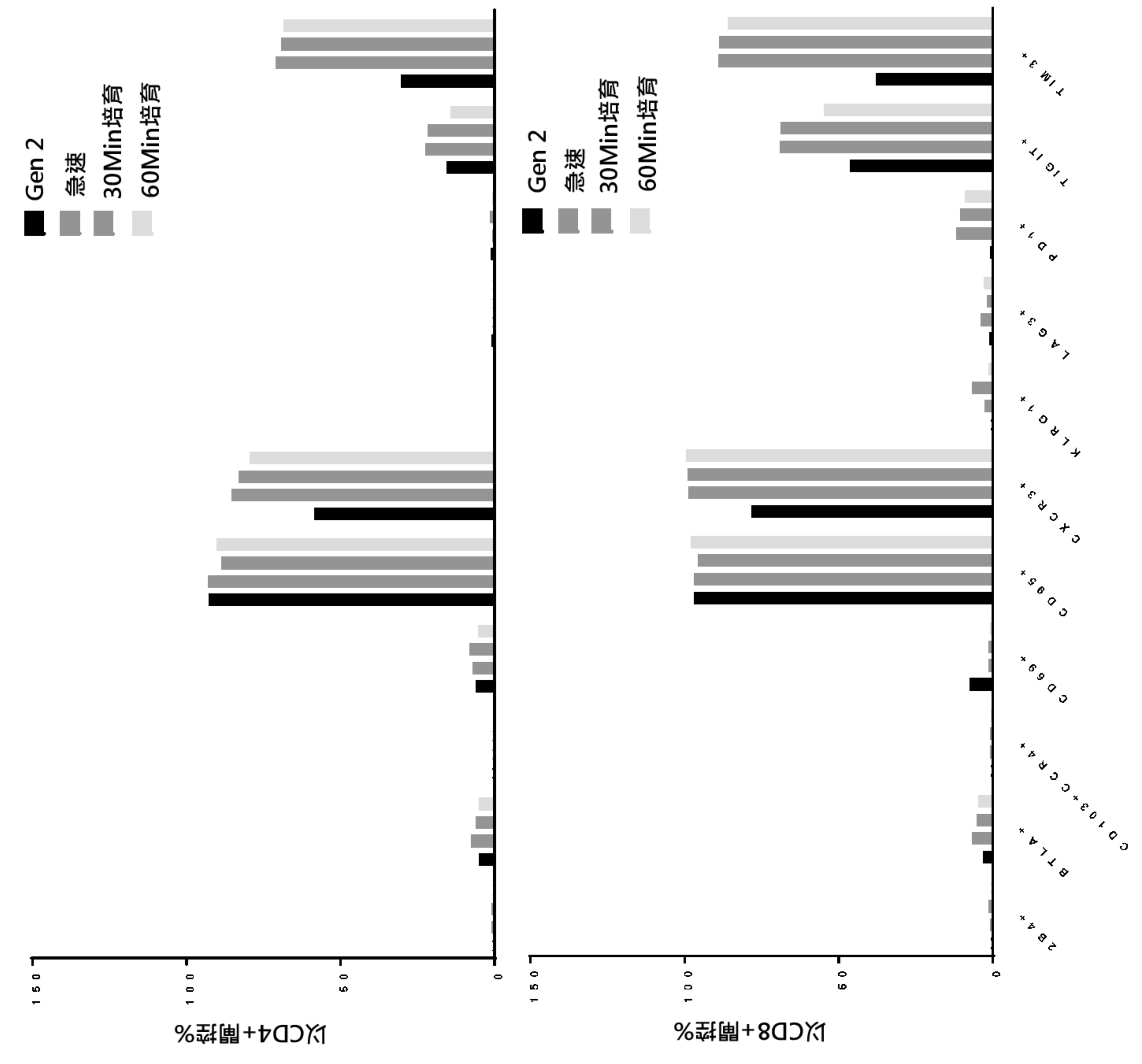
【圖 18B】



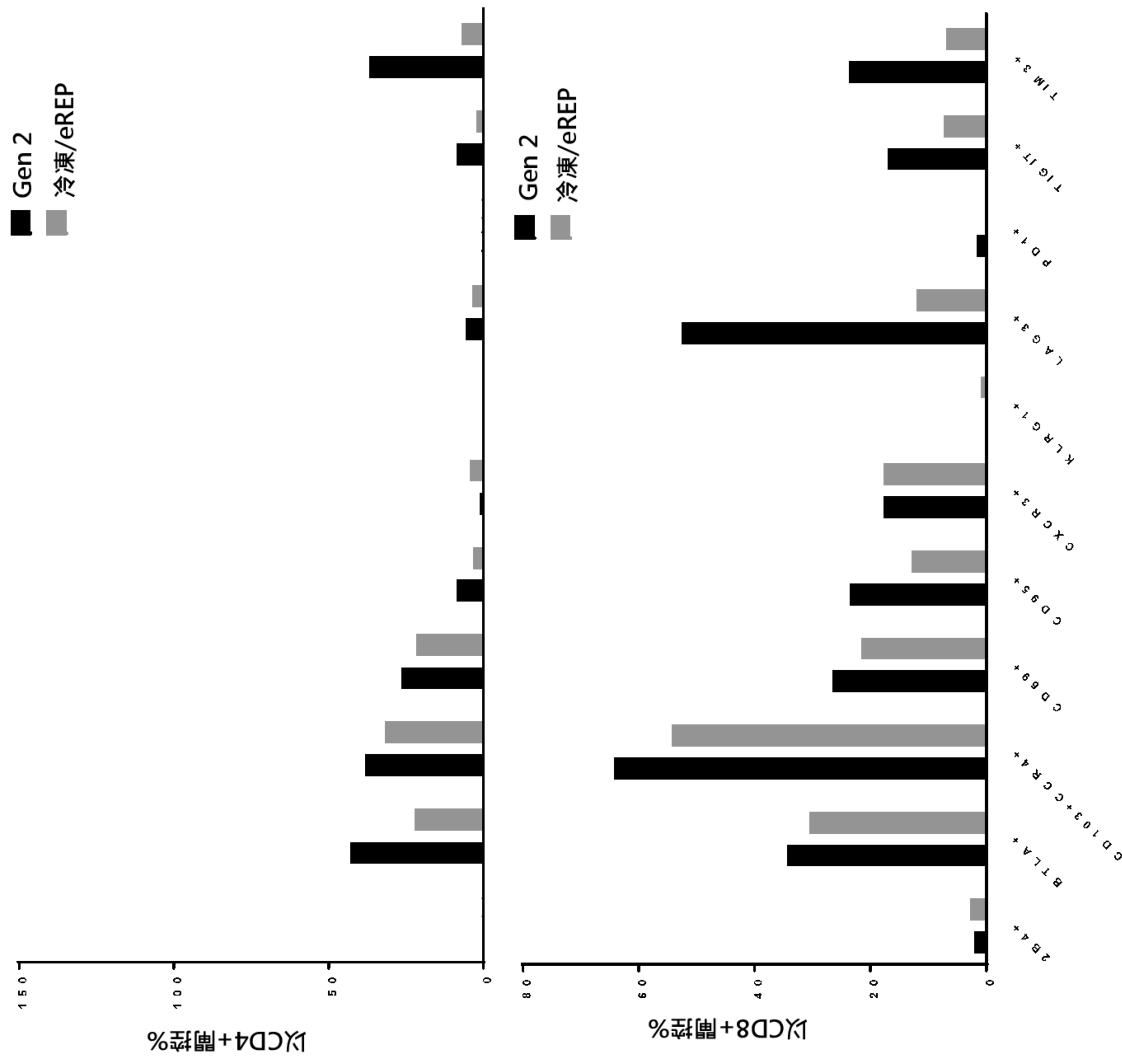
【圖 18C】



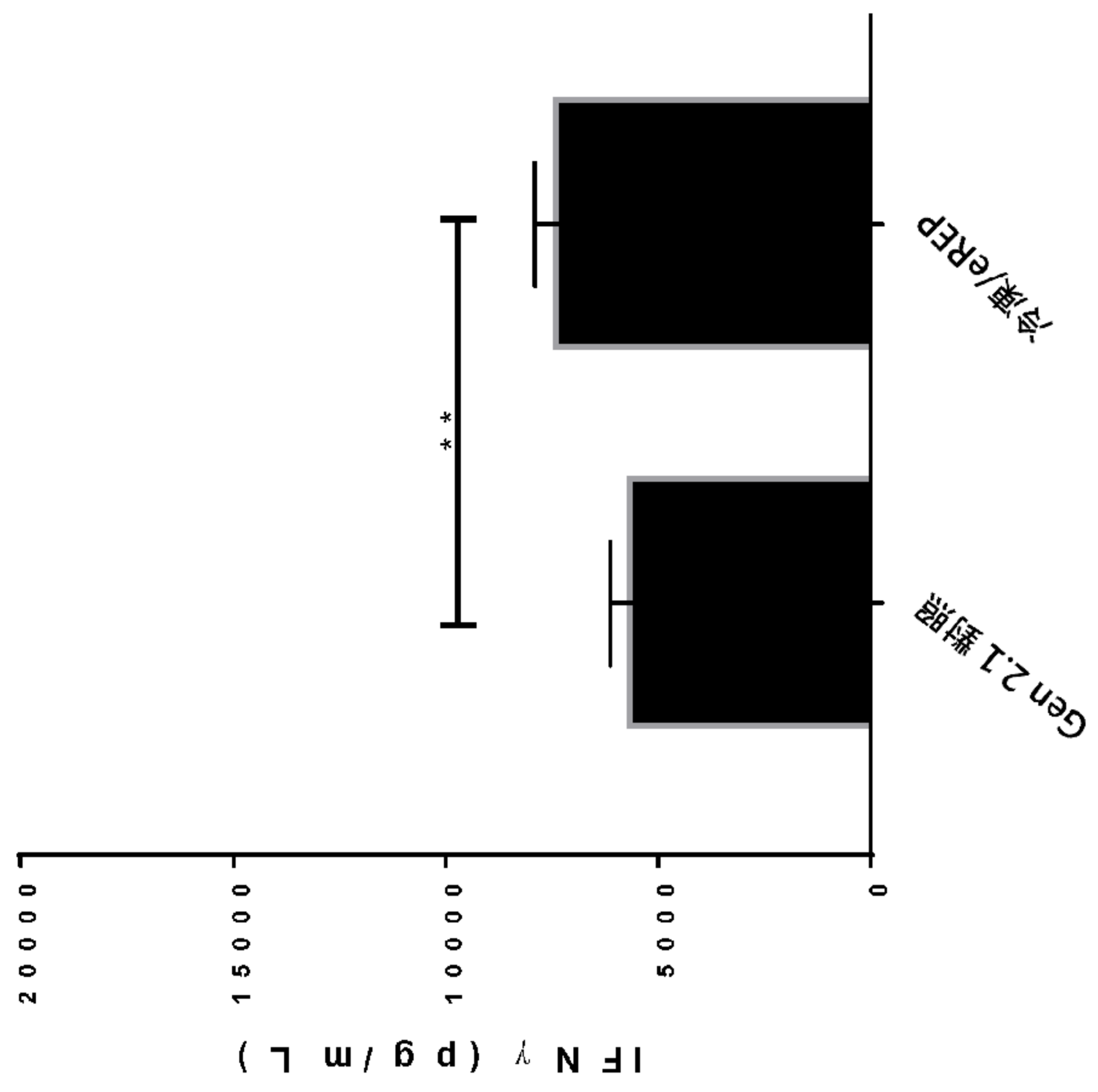
【圖 19B】



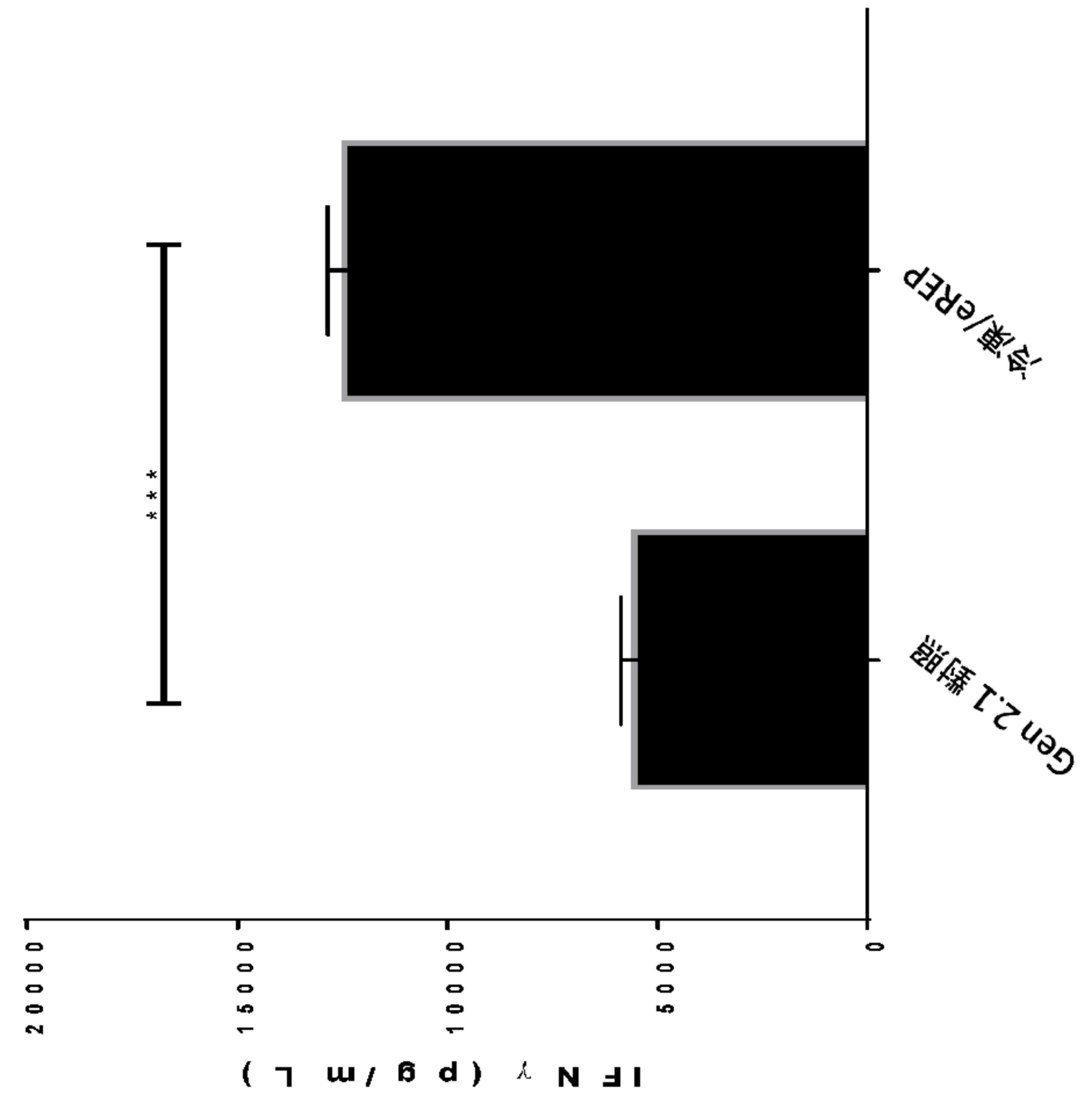
【圖 19A】



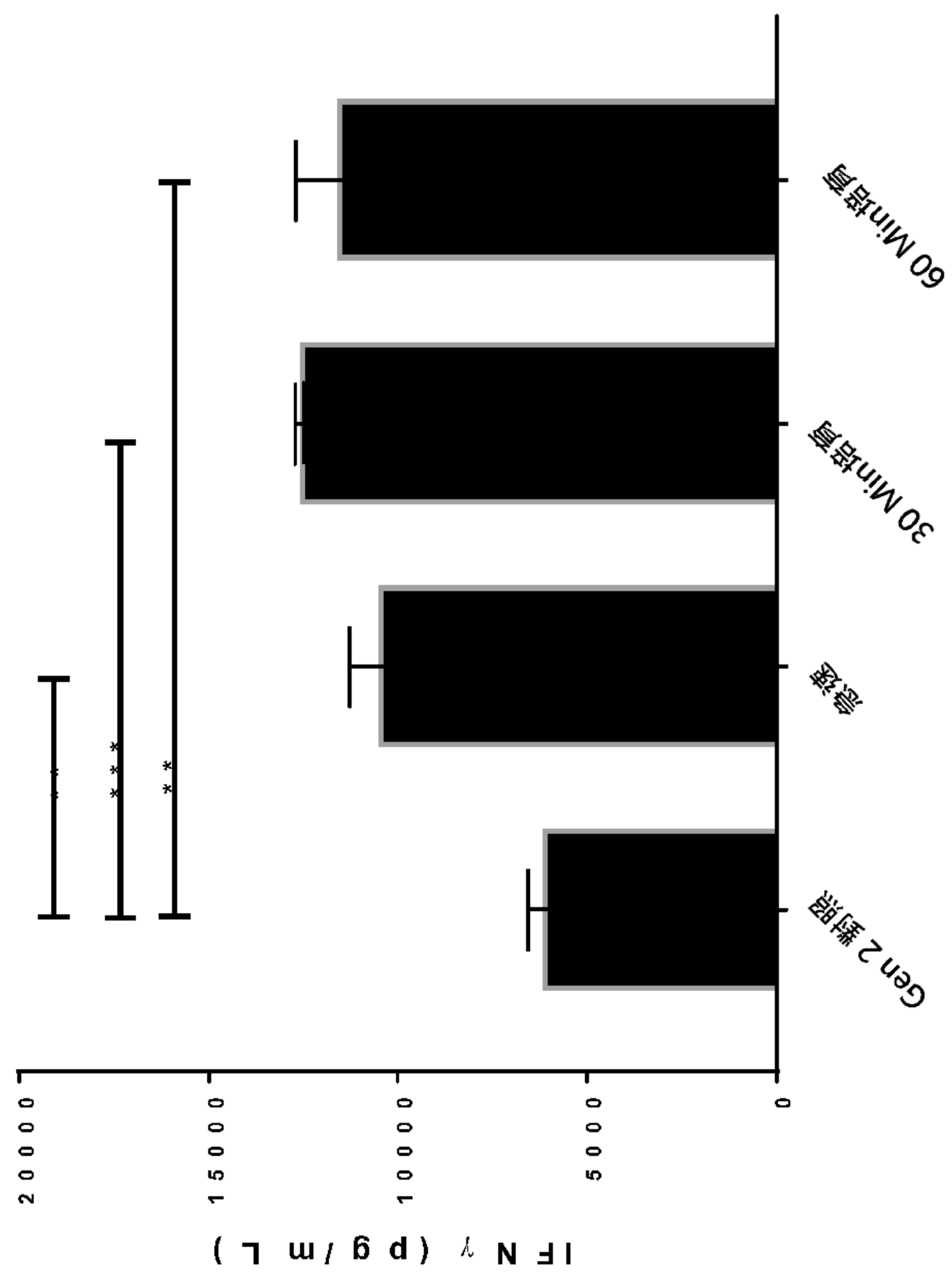
【圖 19C】



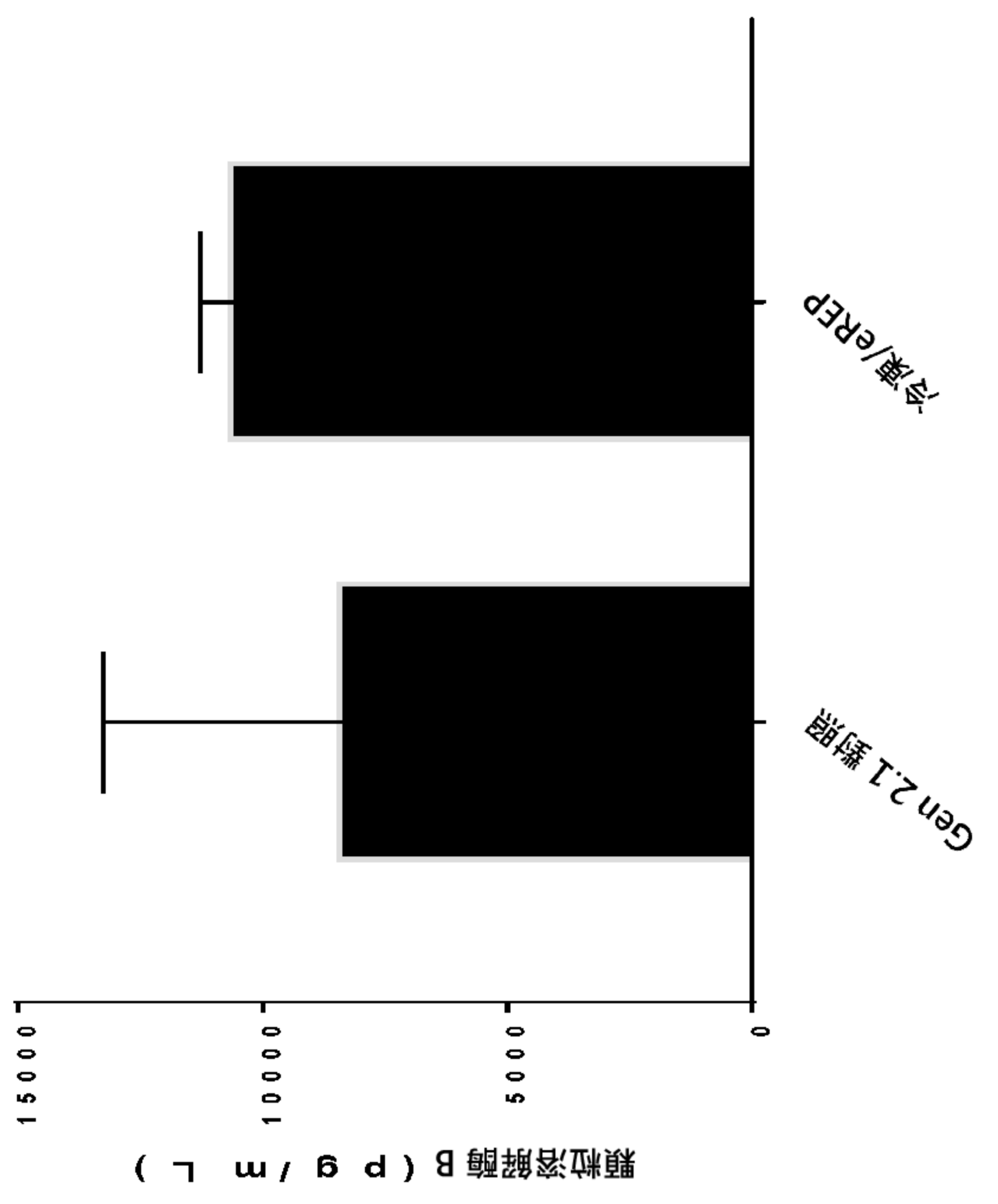
【圖 20B】



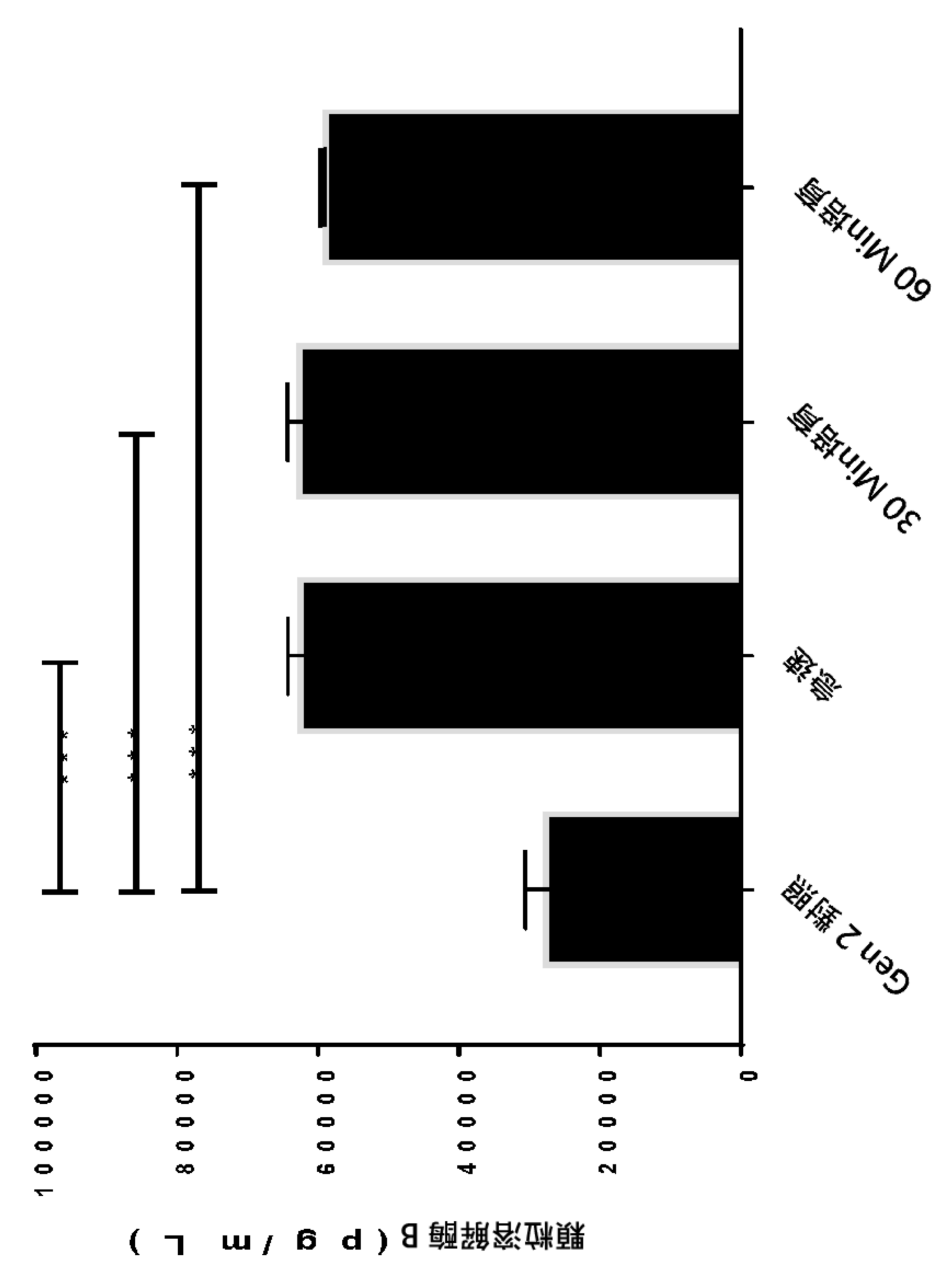
【圖 20C】



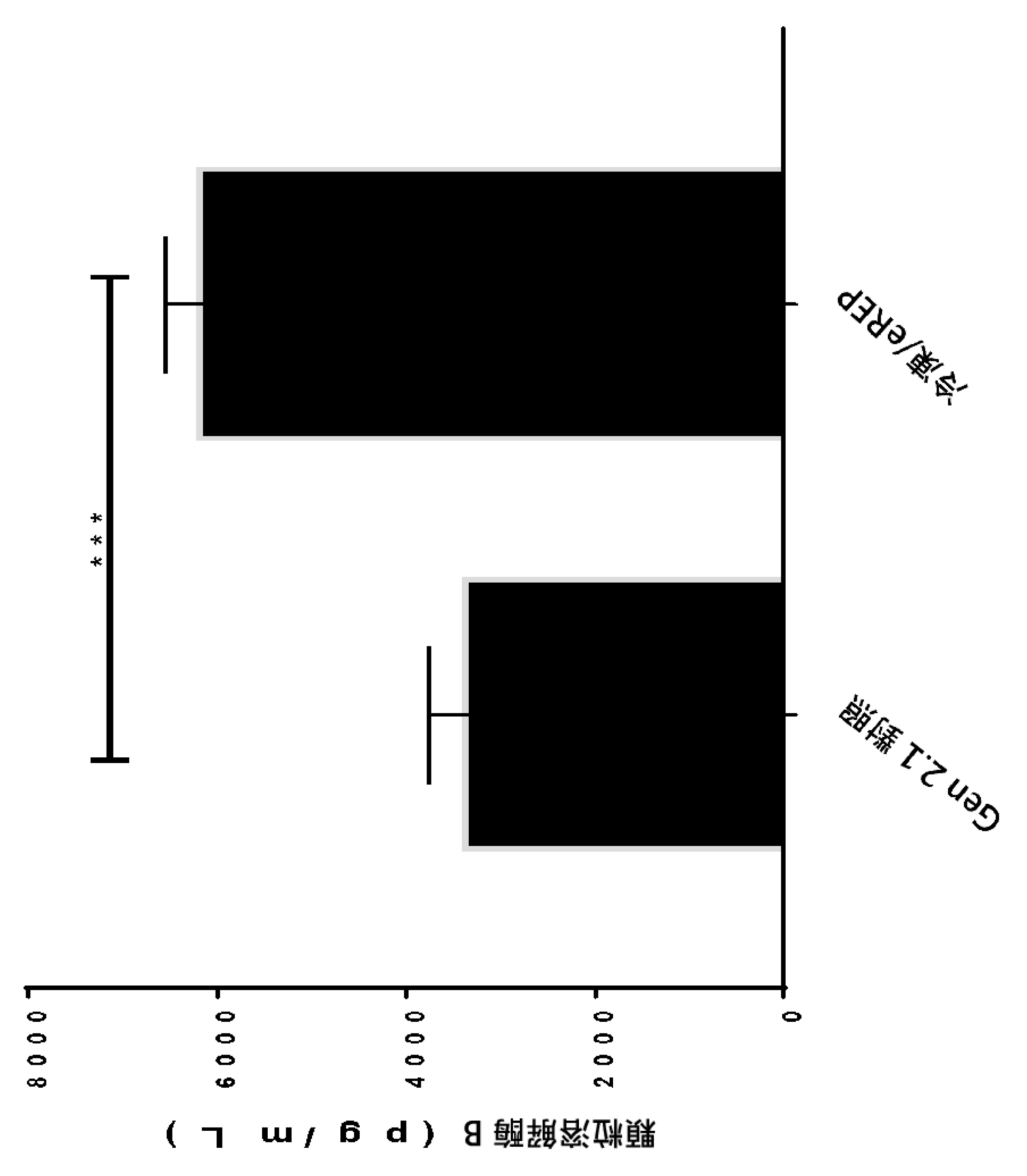
【圖 20A】



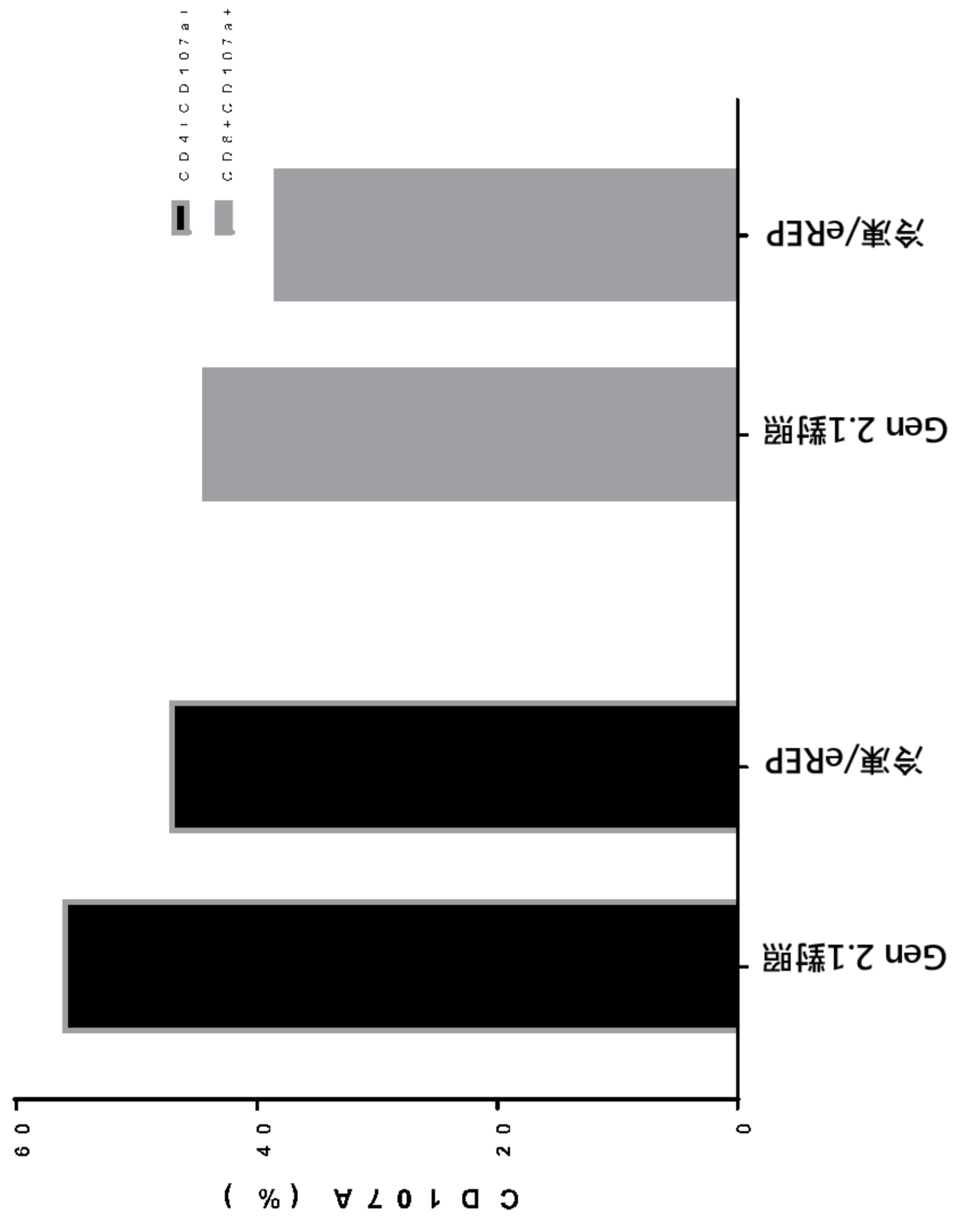
【圖 21B】



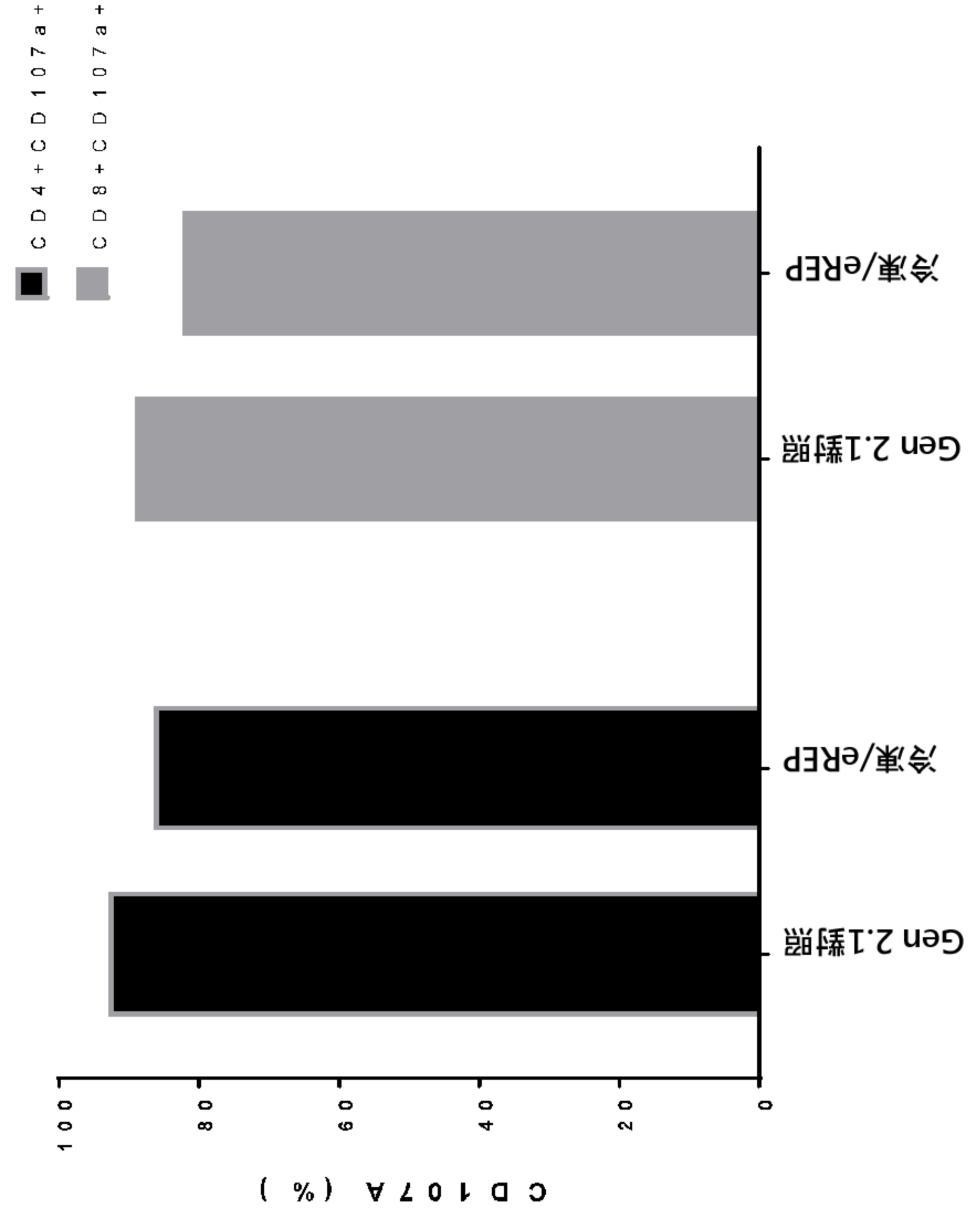
【圖 21A】



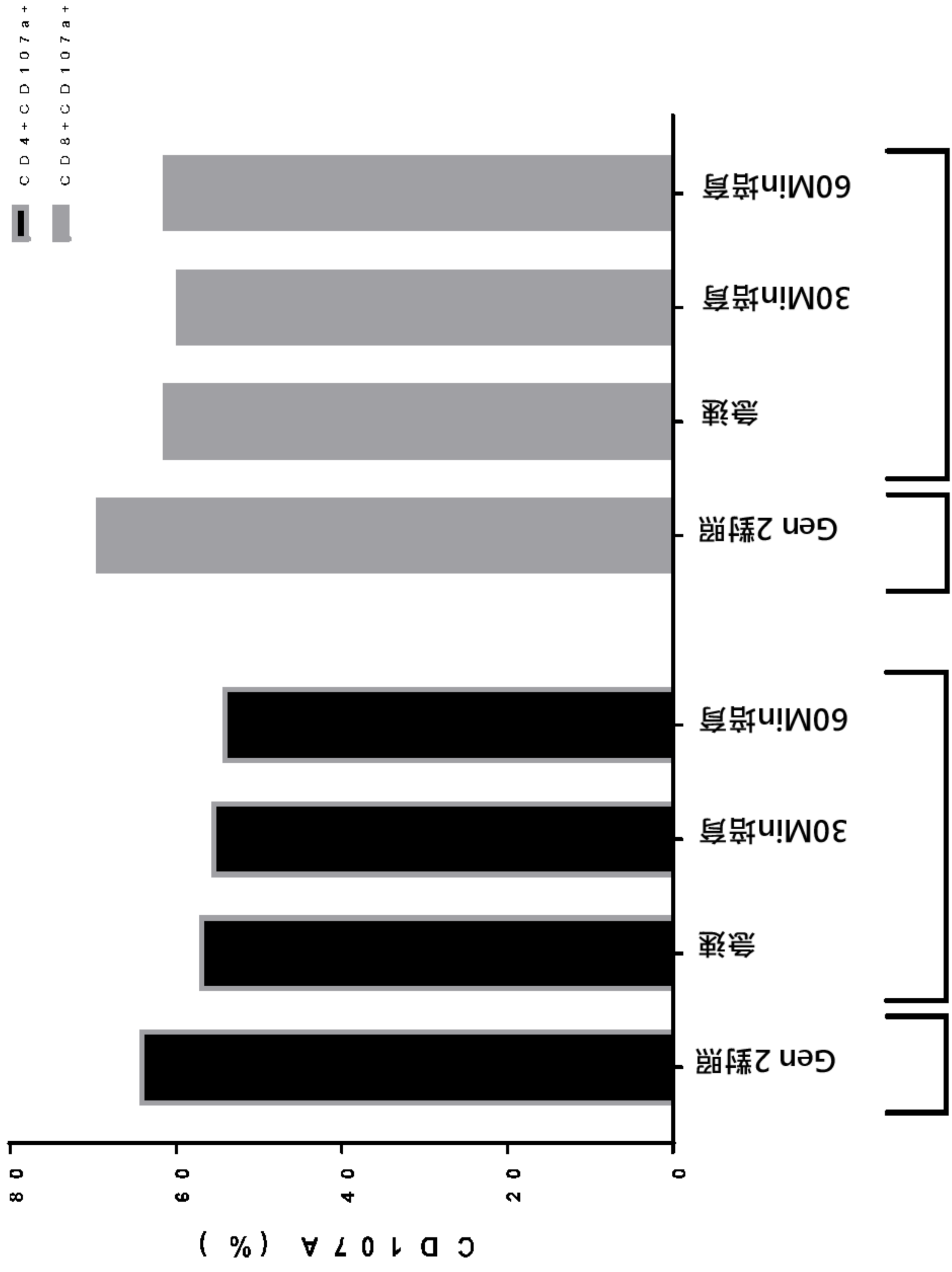
【圖 21C】



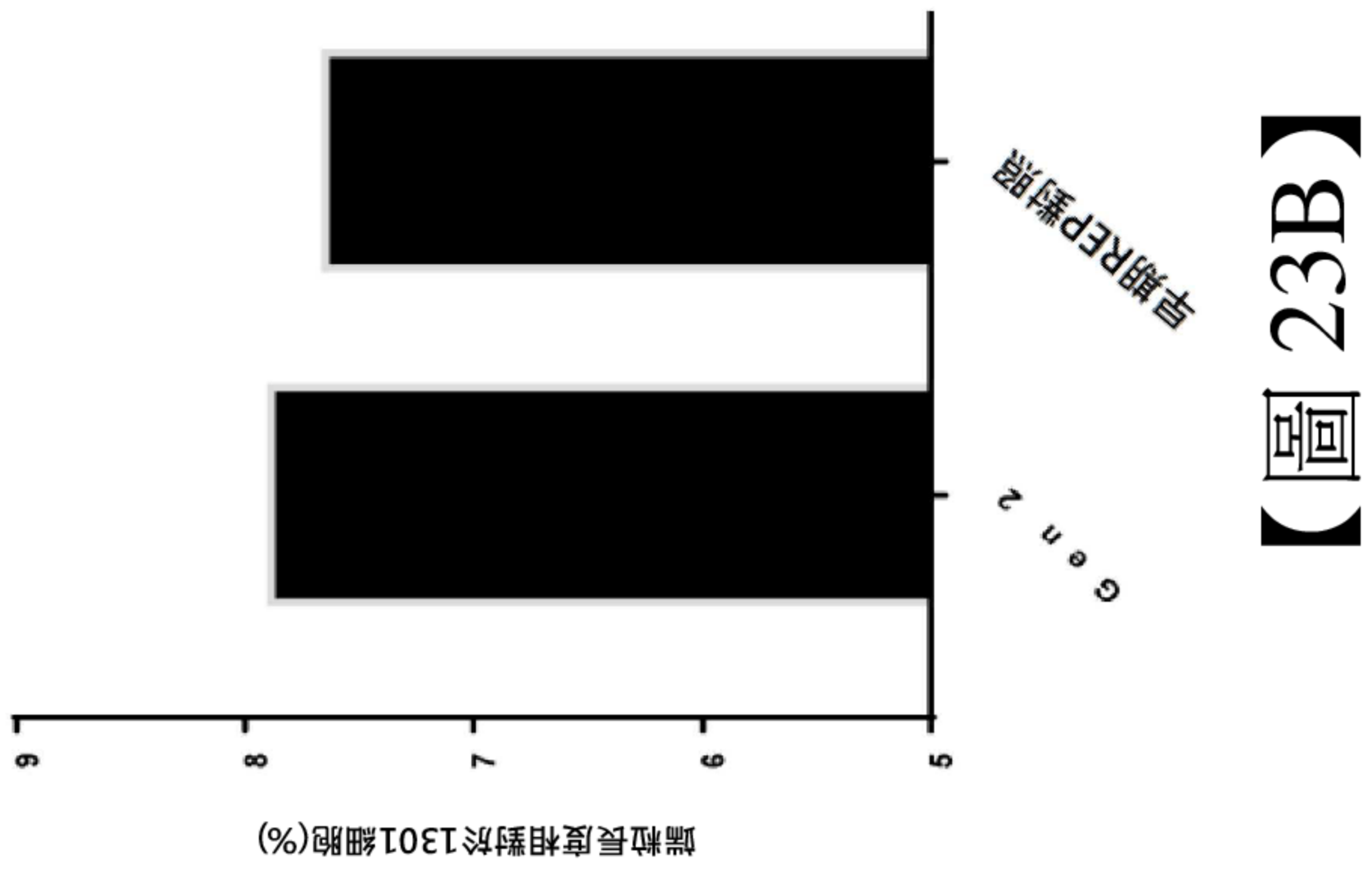
【圖 22B】



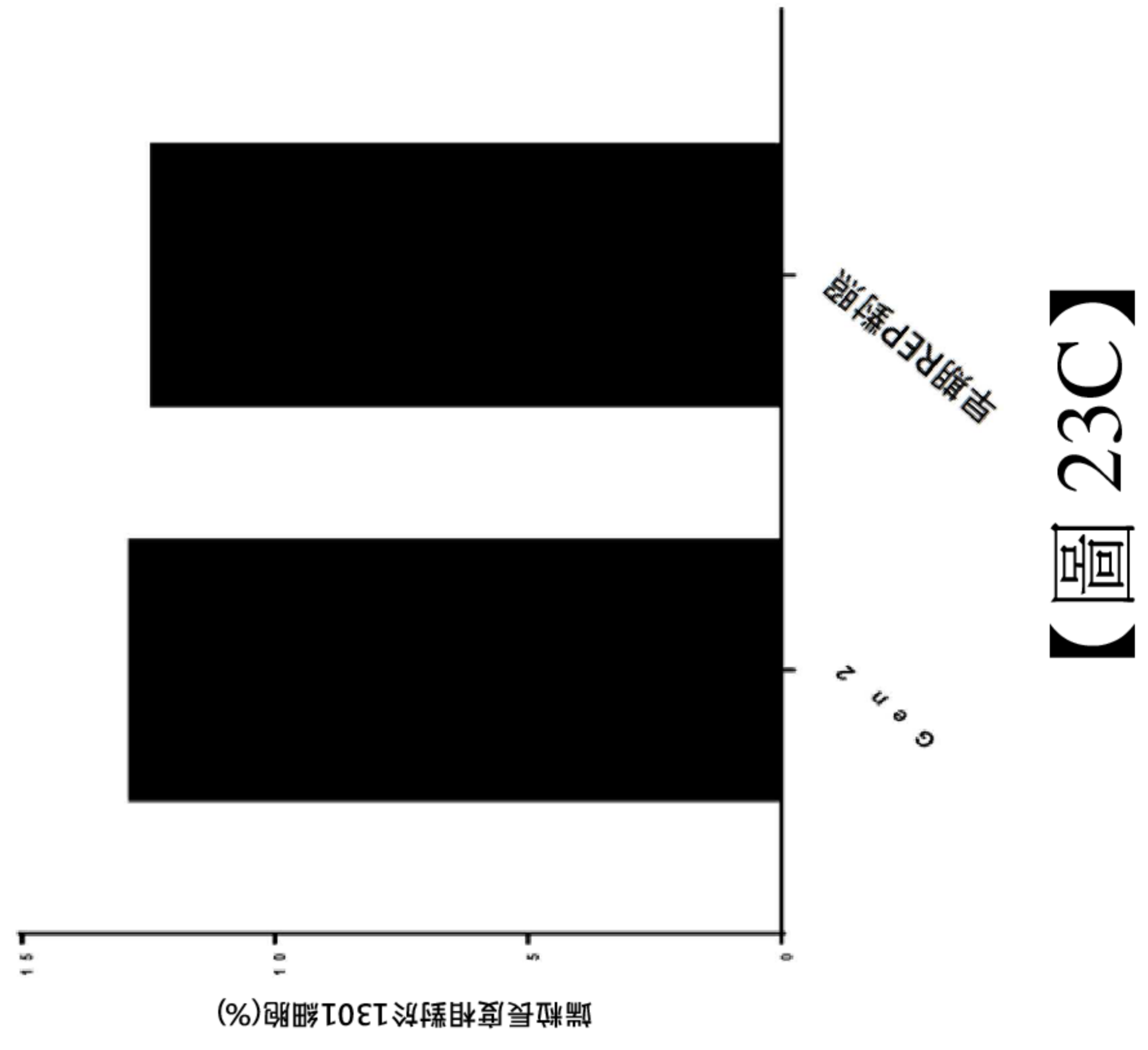
【圖 22C】



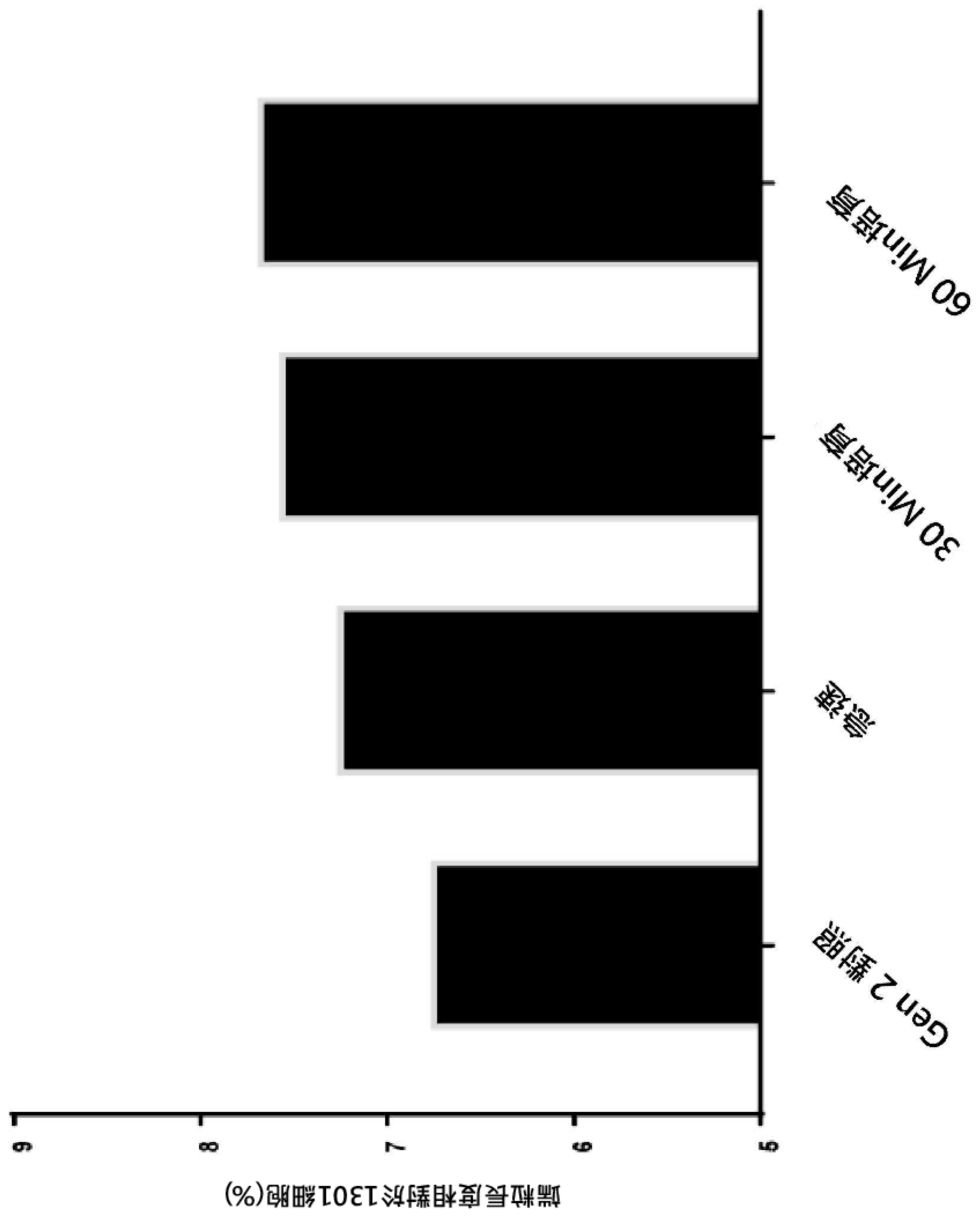
【圖 22A】



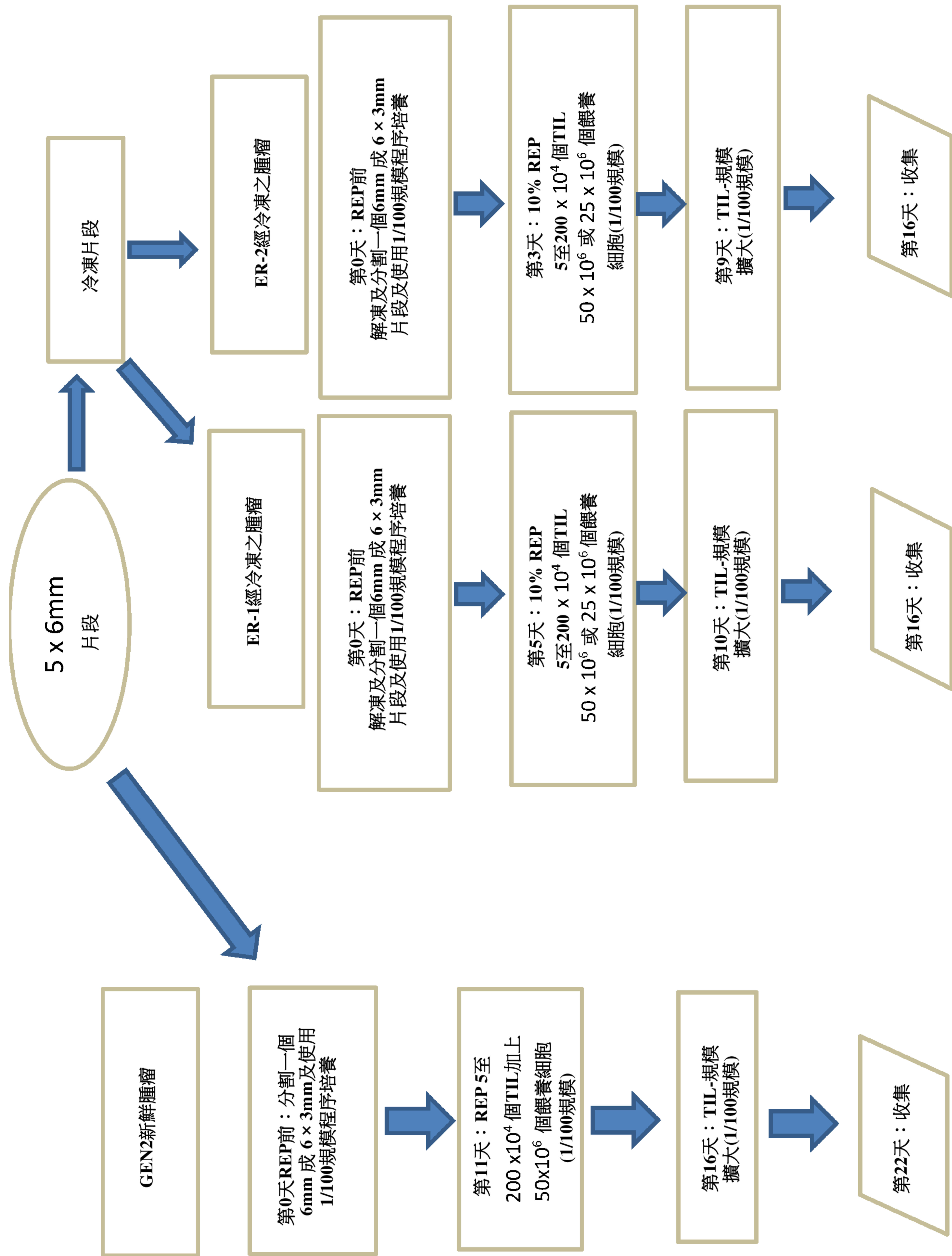
【圖 23B】



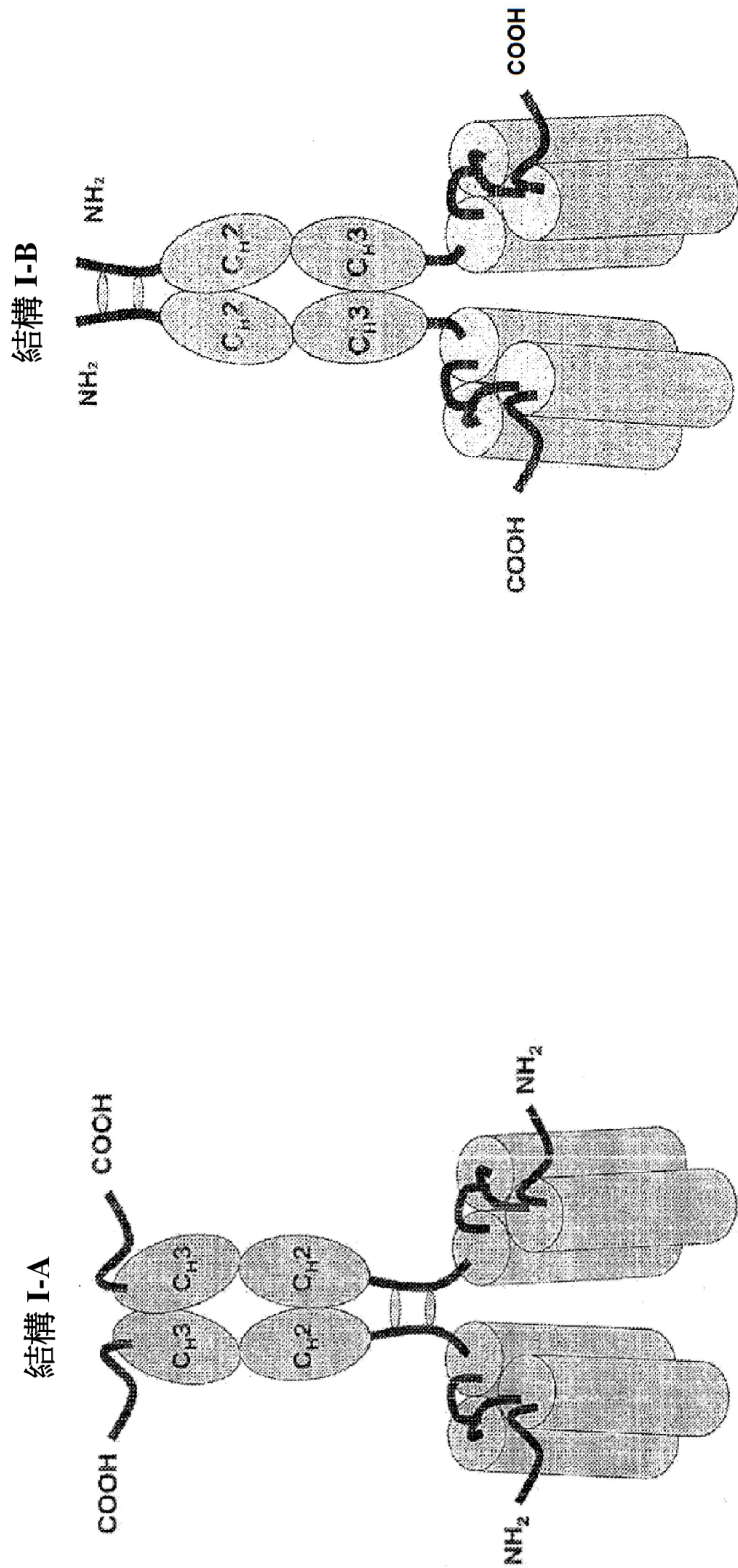
【圖 23C】



【圖 23A】



【圖 24】



【圖 25】