

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-523855

(P2023-523855A)

(43)公表日 令和5年6月7日(2023.6.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/04 (2006.01)	C 1 2 N	1/04		4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 6
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		4 C 0 8 7
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全469頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-567070(P2022-567070)	(71)出願人	519006377
(86)(22)出願日	令和3年5月4日(2021.5.4)		アイオバンス バイオセラピューティク
(85)翻訳文提出日	令和4年12月28日(2022.12.28)		ス, インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/030623		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(87)国際公開番号	WO2021/226061		4 0 7 0 サン カルロス インダストリ
(87)国際公開日	令和3年11月11日(2021.11.11)		アル ロード 8 2 5 스위트 4 0 0
(31)優先権主張番号	63/023,666	(74)代理人	100079108
(32)優先日	令和2年5月12日(2020.5.12)		弁理士 稲葉 良幸
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109346
			弁理士 大貫 敏史
(31)優先権主張番号	63/019,917	(74)代理人	100117189
(32)優先日	令和2年5月4日(2020.5.4)		弁理士 江口 昭彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100134120
			弁理士 内藤 和彦
(31)優先権主張番号	63/146,405	(72)発明者	ワーデル, セス
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腫瘍浸潤リンパ球の製造方法及び免疫療法におけるその使用

(57)【要約】

本発明は、T I Lを増殖し、治療用T I L集団を産生するための改善された及び/または短縮された方法を提供し、本方法には、これは微生物汚染を減少させるだけでなく、コストも削減しながらも、有効性の改善、表現型の改善、T I Lの代謝的健康の向上を短期間でもたらず、閉鎖システムでT I L集団を増殖するための新しい方法が含まれる。係るT I Lは、治療的処置レジメンでの使用が見出される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療用 T I L 集団に増殖させるための方法であって、前記方法は、

（ a ）対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記対象から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得る及び / または受け取ることと、

（ b ）前記第 1 の T I L 集団を第 1 の T I L 細胞培養物中に培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の T I L 細胞培養は、第 1 細胞培養培地と、 I L - 2 と、

i ) 第 1 の抗原提示フィーダー細胞（ A P C ）の培養物から得た第 1 の培養上清であって、 O K T - 3 を含む前記第 1 の培養上清、または

i i ) A P C 及び O K T - 3 のいずれかと、を含み、

前記第 1 の増殖のプライミングは、前記第 1 の T I L 細胞培養物を第 1 のガス透過性面積を含む第 1 の容器内で、約 1 ~ 7 または 1 ~ 8 日間の第 1 の期間培養して、第 2 の T I L 集団を得ることによって行われ、前記第 2 の T I L 集団は、前記第 1 の T I L 集団よりも数が多い、前記第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

（ c ）第 2 の T I L 細胞培養物を形成するために、前記第 1 の T I L 細胞培養物を補充することにより急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記補充は、追加の第 1 の細胞培養培地と、 I L - 2 と、

i ) 第 2 の A P C の培養物から得た第 2 の培養上清であって、 O K T - 3 を含む第 2 の培養上清、または

i i ) A P C 及び O K T - 3 のいずれかと、を含み、

前記急速な第 2 の増殖は、前記第 2 の T I L 細胞培養物を約 1 ~ 1 1 日間の第 2 の期間培養して、第 3 の T I L の集団を得ることによって行われ、前記第 3 の T I L の集団は、 T I L の治療用集団であり、前記第 1 の T I L 細胞培養物は、前記第 1 の培養上清及び A P C の両方を含まず、前記第 2 の T I L 細胞培養物は、前記第 2 の培養上清及び補足の A P C の両方を含まず、前記第 1 の細胞培養物は A P C を含まないか、及び / または、第 2 の細胞培養物は補足の A P C を含まないかのいずれかである、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

（ d ）ステップ（ c ）から得られた前記治療用 T I L 集団を採取することと、

（ e ）ステップ（ d ）から採取した T I L 集団を輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

## 【請求項 2】

ステップ（ b ）の前記第 1 の増殖のプライミングにおいて、前記第 1 の T I L 細胞培養物は前記第 1 の培養上清を含み、ステップ（ c ）の前記急速な第 2 の増殖において、前記第 1 の T I L 細胞培養物は O K T - 3 及び A P C が補充され、前記第 2 の T I L 細胞培養物を形成する、請求項 1 に記載の T I L を増殖するための方法。

## 【請求項 3】

ステップ（ b ）の前記第 1 の増殖のプライミングにおいて、前記第 1 の T I L 細胞培養物は O K T - 3 及び A P C を含み、ステップ（ c ）の前記急速な第 2 の増殖において、前記第 1 の T I L 細胞培養物は前記第 2 の培養上清が補充され、前記第 2 の T I L 細胞培養物を形成する、請求項 1 に記載の T I L を増殖するための方法。

## 【請求項 4】

ステップ（ b ）の前記第 1 の増殖のプライミングにおいて、前記第 1 の T I L 細胞培養物は前記第 1 の培養上清を含み、ステップ（ c ）の前記急速な第 2 の増殖において、前記第 1 の T I L 細胞培養物は前記第 2 の培養上清が補充され、前記第 2 の T I L 細胞培養物を形成する、請求項 1 に記載の T I L を増殖するための方法。

## 【請求項 5】

ステップ（ b ）で使用するための前記第 1 の培養上清を得ることが、

1 ) I L - 2 及び O K T - 3 を含む A P C 細胞培養培地を提供することと、

2) 1) からの前記 A P C 細胞培養培地中で少なくとも約  $5 \times 10^8$  個の A P C を約 3 ~ 4 日間培養して、前記第 1 の培養上清を生成することと、  
 3) 2) の前記細胞培養物から前記第 1 の培養上清を収集することと、を含む、請求項 1 に記載の T I L を増殖するための方法。

【請求項 6】

ステップ (c) で使用するための前記第 2 の培養上清を得ることが、  
 1) I L - 2 及び O K T - 3 を含む A P C 細胞培養培地を提供することと、  
 2) 1) からの前記 A P C 細胞培養培地中で少なくとも約  $1 \times 10^7$  個の A P C を約 3 ~ 4 日間培養して、前記第 2 の培養上清を生成することと、  
 3) 2) の前記細胞培養物から前記第 2 の培養上清を収集することと、を含む、請求項 1 に記載の T I L を増殖するための方法。 10

【請求項 7】

ステップ (c) の前記急速な第 2 の増殖が、  
 i) ステップ (c) における前記第 2 の期間の開始から約 3 または 4 日後に、前記第 2 の T I L 細胞培養物に追加の I L - 2 を補充するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 A P C が前記対象にとって外因性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 A P C が末梢血単核細胞 ( P B M C ) である、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 10】

ステップ (c) の前記急速な第 2 の増殖が、  
 i) 前記第 2 の期間の開始後、または約 3 または 4 日後に、前記第 2 の T I L 細胞培養物を前記第 1 の容器から複数の第 2 の容器に移して、前記複数の第 2 の容器のそれぞれにおいて前記第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を形成するステップと、  
 i i) 前記第 2 の期間の残りの間、前記複数の第 2 の容器のそれぞれにおいて前記第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を培養するステップと、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ i) において、等量の前記第 2 の T I L 細胞培養物が前記複数の第 2 の容器に移される、請求項 10 に記載の方法。 30

【請求項 12】

前記第 2 の容器のそれぞれは、前記第 1 の容器のサイズと等しい、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 2 の容器のそれぞれは、前記第 1 の容器よりも大きい、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 2 の容器はサイズが等しい、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記第 2 の容器は、前記第 1 の容器よりも大きい、請求項 14 に記載の方法。 40

【請求項 16】

前記第 2 の容器は、前記第 1 の容器よりも小さい、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 の容器が G - R e x 100 フラスコである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 1 の容器が G - R e x 100 フラスコであり、前記複数の第 2 の容器のそれぞれが G - R e x 100 フラスコである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

前記複数の第 2 の容器は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 50

、 14、15、16、17、18、19、20個の第2の容器からなる群から選択される、請求項10に記載の方法。

【請求項20】

前記複数の第2の容器が5個の第2の容器である、請求項10に記載の方法。

【請求項21】

ステップii)の前に、前記方法は、前記第2のTIL細胞培養物の各継代培養物に追加のIL-2を補充するステップをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項22】

ステップii)の前に、前記方法は、前記第2のTIL細胞培養物の各継代培養物に第2の細胞培養培地及びIL-2を補充するステップをさらに含む、請求項10に記載の方法。

10

【請求項23】

前記第1の細胞培養培地と前記第2の細胞培養培地が同じである、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記第1の細胞培養培地と前記第2の細胞培養培地が異なる、請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記第1の細胞培養培地がDM1であり、前記第2の細胞培養培地がDM2である、請求項22に記載の方法。

20

【請求項26】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法であって、前記方法は、

(a) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、

(b) IL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/またはOKT-3を含む第1のAPCの培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することによって、第1の増殖のプライミングを実施することであって、前記第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を含む容器内で実施され、前記第1の増殖のプライミングは、前記第2のTIL集団を得るために約1~7から1~8日の第1の期間実施され、前記第2のTIL集団の数は、前記第1のTIL集団の数よりも多い、前記プライミングを実施することと、

30

(c) 第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、ならびに、APC及び/またはOKT-3を含む第2のAPCの培養物からの培養上清のいずれかを補充することにより、前記急速な第2の増殖を実施することであって、前記急速な第2の増殖で添加されるAPCの数は、ステップ(b)で添加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の増殖は、前記第3のTIL集団を得るために約1~11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団は、治療的TIL集団であり、前記急速な第2の増殖は、前記第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

40

(d) ステップ(c)から得られた前記治療用TIL集団を採取することと、

(e) ステップ(d)から採取した前記TIL集団を輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

【請求項27】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法であって、前記方法は、

(a) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、

(b) IL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/ま

50

たはOKT-3を含む第1のAPCの培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、前記第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することによって、第1の増殖のプライミングを実施することによって、前記第1の増殖のプライミングは、前記第2のTIL集団を得るために約1～7日または1～8日の第1の期間実施され、前記第2のTIL集団の数は、第1のTIL集団の数よりも多い、前記第1の増殖のプライミングを実施することと、

(c) 第3のTIL集団を産生するために、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、APC及び/またはOKT-3を含む第2のAPCの培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地と、第2のTIL集団とを接触させることによって、急速な第2の増殖を実施することによって、前記急速な第2の増殖は、前記第3のTIL集団を得るために約1～11日の第2の期間実施され、前記第3のTIL集団は、治療用TIL集団である、前記急速な第2の増殖を実施することと、

(d) ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む前記方法。

10

#### 【請求項28】

ステップ(b)において、前記細胞培養培地は抗原提示細胞(APC)をさらに含み、ステップ(c)における前記培養培地中のAPCの数は、ステップ(b)における前記培養培地中のAPCの数よりも多い、請求項27に記載の方法。

#### 【請求項29】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

20

(a) 第2のTIL集団を産生するために、第1のTIL集団を培養することによって第1の増殖のプライミングを実施することによって、前記第1のTIL集団は、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/またはOKT-3を含む第1のAPCの培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中で、対象の腫瘍から切除された腫瘍サンプルを、複数の腫瘍断片にプロセスすることによって取ることが可能であり、前記第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記第1の増殖のプライミングは、前記第2のTIL集団を得るために、約1～7/8日の第1の期間実施され、前記第2のTIL集団の数は、前記第1のTIL集団の数よりも多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、

30

(b) 第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団を、追加のIL-2、任意にOKT-3、ならびに、APC及び/またはOKT-3を含むAPCの第2の培養物からの培養上清のいずれかを含む前記第2のTIL集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を実施することによって、前記急速な第2の増殖中のAPCの数はステップ(a)におけるAPCの少なくとも2倍の数であり、前記急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～11日の第2の期間実施され、前記第3のTIL集団は、治療用TIL集団であり、前記急速な第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

(c) ステップ(b)から得られた前記治療用TIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

40

#### 【請求項30】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

(a) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/またはOKT-3を含むAPCの第1の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、第1のTIL集団を培養することによって、第1の増殖のプライミングを実施することによって、前記第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために約1～7日または1～8日の第1の期間実施され、前記第2のTIL集団の数は、前記第1のTIL集団の数よりも多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、

50

(b) 第3のTIL集団を産生するために、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、APC及び/またはOKT-3を含むAPCの第2の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地と、前記第2のTIL集団とを接触させることによって、急速な第2の増殖を実施することであって、前記急速な第2の増殖は、前記第3のTIL集団を得るために約1~11日の第2の期間実施され、前記第3のTIL集団は、治療用TIL集団である、前記急速な第2の増殖を実施することと、

(c) ステップ(b)から得られた前記治療用TIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項31】

ステップ(a)において、前記細胞培養培地は抗原提示細胞(APC)をさらに含み、ステップ(c)における前記培養培地中のAPCの数は、ステップ(b)における前記培養培地中のAPCの数よりも多い、請求項30に記載の方法。

10

【請求項32】

前記急速な第2の増殖中のAPCの数の、前記第1の増殖のプライミングのAPCの数に対する比が、約1.5:1~約20:1の範囲にある、請求項26または28または31に記載の方法。

【請求項33】

前記急速な第2の増殖中のAPCの数の、前記第1の増殖のプライミングのAPCの数に対する比が、約1.5:1~約10:1の範囲にある、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記急速な第2の増殖中のAPCの数の、前記第1の増殖のプライミングのAPCの数に対する比が、約2:1~約5:1の範囲にある、請求項26または28または31に記載の方法。

20

【請求項35】

前記急速な第2の増殖中のAPCの数の、前記第1の増殖のプライミングのAPCの数に対する比が、約2:1~約3:1の範囲にある、請求項26または28または31に記載の方法。

【請求項36】

前記急速な第2の増殖中のAPCの数の、前記第1の増殖のプライミングのAPCの数に対する比が、約2:1である、請求項26または28または31に記載の方法。

30

【請求項37】

前記第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $1.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>~約 $4.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>の範囲であり、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $2.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>~約 $7.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>の範囲である、請求項26または28または31に記載の方法。

【請求項38】

前記第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $1.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>~約 $3.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>の範囲であり、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $3.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>~約 $6.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>の範囲である、請求項26または28または31に記載の方法。

40

【請求項39】

前記第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $2.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>~約 $3.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>の範囲であり、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $4.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>~約 $5.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>の範囲である、請求項26または28または31に記載の方法。

【請求項40】

前記第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $1 \times 10^8$  APC~約 $3.5 \times 10^8$  APCの範囲であり、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $3.5 \times 10^8$  APC~約 $1 \times 10^9$  APCの範囲である、請求項26または28または31に記載の方法。

50

## 【請求項 4 1】

前記第 1 の増殖のプライミングにおける APC の数は、約  $1.5 \times 10^8$  APC ~ 約  $3 \times 10^8$  APC の範囲であり、前記急速な第 2 の増殖における APC の数は、約  $4 \times 10^8$  APC ~ 約  $7.5 \times 10^8$  APC の範囲である、請求項 2 6 または 2 8 または 3 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

前記第 1 の増殖のプライミングにおける APC の数は、約  $2 \times 10^8$  APC ~ 約  $2.5 \times 10^8$  APC の範囲であり、前記急速な第 2 の増殖における APC の数は、約  $4.5 \times 10^8$  APC ~ 約  $5.5 \times 10^8$  APC の範囲である、請求項 2 6 または 2 8 または 3 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 4 3】

約  $2.5 \times 10^8$  APC が前記を第 1 の増殖のプライミングに添加され、 $5 \times 10^8$  APC が前記急速な第 2 の増殖に添加される、請求項 2 6、2 8、または 3 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記第 2 の TIL 集団の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団の TIL の数に対する比が、約 1.5 : 1 ~ 約 100 : 1 である、請求項 2 6 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 5】

前記第 2 の TIL 集団の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団の TIL の数に対する比が、約 50 : 1 である、請求項 2 6 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 4 6】

前記第 2 の TIL 集団の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団の TIL の数に対する比が、約 25 : 1 である、請求項 2 6 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 7】

前記第 2 の TIL 集団の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団の TIL の数に対する比が、約 20 : 1 である、請求項 2 6 ~ 4 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 8】

前記第 2 の TIL 集団の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団の TIL の数に対する比が、約 10 : 1 である、請求項 2 6 ~ 4 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4 9】

前記第 2 の TIL 集団の数は、前記第 1 の TIL 集団の数よりも少なくとも 50 倍多い、請求項 2 6 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 5 0】

前記方法が、前記治療用 TIL 集団を収集するステップの後に、前記採取した治療用 TIL 集団を輸液バッグに移す、追加のステップを含む、請求項 2 7 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5 1】

前記複数の腫瘍断片は複数の別個の容器に分配され、それぞれの別々の容器内で、前記第 2 の TIL 集団が、前記第 1 の増殖のプライミングのステップからの前記第 1 の TIL 集団から得られ、前記第 3 の TIL 集団が、前記急速な第 2 の増殖のステップにおける前記第 2 の TIL 集団から得られ、前記第 3 の TIL 集団から得られた前記治療的 TIL 集団が前記複数の容器のそれぞれから収集され、組み合わせられ、前記収集した TIL 集団を得る、請求項 2 7 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。

40

## 【請求項 5 2】

前記複数の別個の容器が、少なくとも 2 個の別個の容器を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

前記複数の別個の容器が、少なくとも 2 ~ 20 個の別個の容器を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

50

前記複数の別個の容器が、少なくとも 2 ~ 10 個の別個の容器を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記複数の別個の容器が、少なくとも 2 ~ 5 個の別個の容器を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記別個の容器のそれぞれが、第 1 のガス透過性表面積を含む、請求項 5 1 ~ 5 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 7】

前記複数の腫瘍断片が単一の容器に分配される、請求項 2 7 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 5 8】

前記単一の容器が第 1 のガス透過性表面積を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記細胞培養培地が抗原提示細胞 (APC) を含み、前記 APC は、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 5 6 または 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記 APC が、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 5 8 に記載の方法。 20

【請求項 6 1】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記 APC が、約 2 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 5 9 ~ 6 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 3】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 6 2 に記載の方法。 30

【請求項 6 4】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が約 4 細胞層の厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記第 1 の増殖のプライミングが、第 1 のガス透過性表面積を含む第 1 の容器内で実行され、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて、前記急速な第 2 の増殖ステップが、第 2 のガス透過性表面積を含む第 2 の容器内で実行される、請求項 2 7 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 6】

前記第 2 の容器は、前記第 1 の容器よりも大きい、請求項 6 5 に記載の方法。 40

【請求項 6 7】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記細胞培養培地が抗原提示細胞 (APC) を含み、前記 APC は、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 6 5 または 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記 APC が、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記 A P C が、約 2 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が約 3 細胞層～約 5 細胞層の厚さで前記第 2 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 6 5～6 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 1】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が約 3 . 5 細胞層～約 4 . 5 細胞層の厚さで前記第 2 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が約 4 細胞層の厚さで前記第 2 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記第 1 の増殖のプライミングが第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、係る第 1 の T I L 集団から生成された前記第 2 の T I L 集団に対して、前記急速な第 2 の増殖が同じ容器内で行われる、請求項 2 7～6 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 4】

前記各容器が第 1 のガス透過性表面積を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記細胞培養培地が抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、前記 A P C は、約 1 細胞層～約 3 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記 A P C が、約 1 . 5 細胞層～約 2 . 5 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記 A P C が、約 2 細胞層の平均厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が約 3 細胞層～約 5 細胞層の厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 4～7 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 9】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が約 3 . 5 細胞層～約 4 . 5 細胞層の厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が約 4 細胞層の厚さで前記第 1 のガス透過性表面領域上に積層される、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記第 1 の増殖プライミングが第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、前記第 1 の容器は、第 1 の表面積を含み、前記細胞培養培地は抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、前記 A P C は、第 1 のガス透過性表面領域上に積層され、前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 1～約 1 : 1 0 の範囲にある、請求項 2 7～5 7、6 5、6 6、または 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 2】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 2～

10

20

30

40

50

約 1 : 8 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 3 ~ 約 1 : 7 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 4 ~ 約 1 : 6 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 5 ~ 約 1 : 5 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 6 ~ 約 1 : 4 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 7 ~ 約 1 : 3 . 5 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 8 ~ 約 1 : 3 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 9 ~ 約 1 : 2 . 5 の範囲にある、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 2 である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて 2 ~ 3 日後に、前記細胞培養培地に追加の I L - 2 を補充する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 2】

前記治療用 T I L 集団を収集するステップにおいて前記採取された T I L 集団を、凍結保存プロセスを使用して凍結保存することをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 3】

前記輸液バッグを凍結保存するステップをさらに含む、請求項 2 6 または 5 0 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記凍結保存プロセスが、1 : 1 の採取された T I L 集団対凍結保存培地の比率を使用して実行される、請求項 9 2 または 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記抗原提示細胞が末梢血単核細胞 ( P B M C ) である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 6】

10

20

30

40

50

前記 P B M C が照射され、同種異系である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、前記細胞培養培地が末梢血単核細胞 ( P B M C ) を含み、前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて前記細胞培養培地に添加される前記 P B M C の総数は、約  $2.5 \times 10^8$  である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 8】

前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて、前記細胞培養培地中の前記抗原提示細胞 ( A P C ) は末梢血単核細胞 ( P B M C ) であり、前記急速な第 2 の増殖ステップにおいて前記細胞培養培地に添加される前記 P B M C の総数は約  $5 \times 10^8$  である、先行請求項のい  
10

【請求項 9 9】

前記抗原提示細胞が人工抗原提示細胞である、請求項 2 6 ~ 9 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記 T I L の治療的集団を採取するステップにおける前記採取が、膜ベースの細胞処理システムを使用して実施される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記 T I L の治療的集団を採取するステップにおける前記採取が、L O V O 細胞処理システムを使用して実施される、先行請求項のいずれかに記載の方法。  
20

【請求項 1 0 2】

前記複数の断片が、前記第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、容器当たり約 6 0 個の断片を含み、各断片は約  $2.7 \text{ mm}^3$  の体積を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記複数の断片が、総体積が約  $1.3 \text{ mm}^3$  ~ 約  $1.5 \text{ mm}^3$  の、約 3 0 個 ~ 約 6 0 個の断片を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記複数の断片が、総体積が約  $1.35 \text{ mm}^3$  の、約 5 0 個の断片を含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。  
30

【請求項 1 0 5】

前記複数の断片が、総質量が約 1 グラム ~ 約 1.5 グラムの、約 5 0 個の断片を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記細胞培養培地が、G 容器及び X u r i セルバッグからなる群から選択される容器で提供される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記 I L - 2 濃度が、約 1 0 , 0 0 0 I U / m L ~ 約 5 , 0 0 0 I U / m L である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記 I L - 2 濃度が、約 6 , 0 0 0 I U / m L である、先行請求項のいずれかに記載の方法。  
40

【請求項 1 0 9】

前記採取した治療用 T I L 集団を輸液バッグに移すステップにおける前記輸液バッグが、H y p o T h e r m o s o l 含有輸液バッグである、請求項 2 6 または 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記凍結保存培地がジメチルスルホキシド ( D M S O ) を含む、請求項 9 2 ~ 9 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記凍結保存媒体が、7%～10% DMSOを含む、請求項110に記載の方法。

【請求項112】

前記第1の増殖のプライミングステップにおける前記第1の期間及び前記急速な第2の増殖ステップにおける前記第2の期間が、それぞれ、5日、6日、または7日の期間内に個別に実施される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項113】

前記第1の増殖のプライミングステップにおける前記第1の期間が、5日、6日、または7日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。

【請求項114】

前記急速な第2の増殖ステップにおける前記第2の期間が、7日、8日、または9日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。 10

【請求項115】

前記第1の増殖のプライミングステップにおける前記第1の期間及び前記急速な第2の増殖ステップにおける前記第2の期間が、それぞれ、7日の期間内に個別に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。

【請求項116】

前記第1の増殖のプライミングステップから前記治療用TILの集団の採取までが、約14日～約16日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。

【請求項117】

前記第1の増殖のプライミングステップから前記治療用TILの集団の採取までが、約15日～約16日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。 20

【請求項118】

前記第1の増殖のプライミングステップから前記治療用TILの集団の採取までが、約14日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。

【請求項119】

前記第1の増殖のプライミングステップから前記治療用TILの集団の採取までが、約15日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。

【請求項120】

前記第1の増殖のプライミングステップから前記治療用TILの集団の採取までが、約16日の期間内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。 30

【請求項121】

前記収集した治療用TILの集団を、凍結保存プロセスを使用して凍結保存するステップをさらに含み、前記第1の増殖のプライミングステップから前記治療用TILの集団の収集及び凍結保存が16日以内に実施される、請求項26～111のいずれかに記載の方法。

【請求項122】

前記治療用TILの集団を採取するステップで採取された前記治療用TIL集団は、TILの治療上有効な用量に十分なTILを含む、請求項26～118のいずれかに記載の方法。

【請求項123】

前記治療上有効な用量に十分なTILの数が、約 $2.3 \times 10^{10}$ ～約 $13.7 \times 10^{10}$ である、請求項122に記載の方法。 40

【請求項124】

前記急速な第2の増殖ステップにおける前記第3のTIL集団は、効力の増大、インターフェロン-ガンマ産生の増大、及び/またはポリクローナリティの増加を提供する、請求項26～123のいずれかに記載の方法。

【請求項125】

前記急速な第2の増殖ステップにおける前記第3のTIL集団は、18日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロン-ガンマ産生を提供する、請求項26～123のいずれかに記載の方法。 50

## 【請求項 1 2 6】

前記急速な第 2 の増殖ステップで前記第 3 の T I L 集団から得られた、前記エフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞は、第 1 の増殖のプライミングステップで、第 2 の T I L 集団から得られたエフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞と比較して、増加した C D 8 及び C D 2 8 発現を示す、請求項 2 6 ~ 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2 7】

前記治療用 T I L 集団を採取するステップからの前記治療用 T I L 集団が患者に注入される、請求項 2 6 ~ 1 2 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 2 8】

がん罹患した対象を治療するための方法であって、増殖した腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を投与することを含む前記方法は、

( a ) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、前記対象から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得る及び / または受け取ることと、

( b ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、任意に O K T - 3、ならびに、任意に抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第 1 の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、前記第 1 の T I L 集団を培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で実施され、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために約 1 ~ 7 日または 1 ~ 8 日の期間実施される、前記プライミングを実施することと、

( c ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に追加の I L - 2、O K T - 3、ならびに、抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む第 2 の A P C の培養物からの培養上清のいずれかを補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記急速な第 2 の増殖で添加される前記 A P C の数は、ステップ ( b ) で添加される前記 A P C の数の少なくとも 2 倍であり、前記急速な第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために約 1 ~ 1 1 日間行われ、前記第 3 の T I L 集団は、治療的 T I L 集団であり、前記急速な第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた前記治療用 T I L 集団を採取することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取した T I L 集団を輸液バッグに移すことと、

( f ) 治療有効用量のステップ ( e ) からの前記 T I L を対象に投与することと、を含む、前記方法。

## 【請求項 1 2 9】

ステップ ( f ) における前記治療有効用量の投与に十分な前記 T I L の数は、約  $2 \cdot 3 \times 10^{10}$  ~ 約  $13 \cdot 7 \times 10^{10}$  である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 0】

前記抗原提示細胞 ( A P C ) が P B M C である、請求項 1 2 8 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 1】

ステップ ( f ) において治療有効用量の T I L 細胞を投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが患者に投与されている、請求項 1 2 8 ~ 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 1 3 2】

前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、 $60 \text{ mg} / \text{m}^2$  / 日の用量のシクロホスファミドを 2 日間、次いで  $25 \text{ mg} / \text{m}^2$  / 日の用量のフルダラビを 5 日間投与するステップを含む、請求項 1 3 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3 3】

ステップ ( f ) における前記患者への前記 T I L 細胞の投与の翌日から開始される、高用量 I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項 1 2 8 ~ 1 3 2 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 134】

前記高用量 I L - 2 レジメンが、600, 000 または 720, 000 IU / kg、寛容になるまで 8 時間ごとに 15 分間の静脈内ボラス注入として投与される、請求項 133 に記載の方法。

## 【請求項 135】

ステップ (b) における前記第 3 の T I L 集団が、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する、請求項 128 ~ 134 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 136】

ステップ (c) における前記第 3 の T I L 集団は、16 日より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍 ~ 5 倍以上のインターフェロン - ガンマ産生を提供する、請求項 128 ~ 134 のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 137】

ステップ (c) で前記第 3 の T I L 集団から得られた、前記エフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞が、ステップ (b) で、前記第 2 の集団から得られたエフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞と比較して、増加した C D 8 及び C D 28 発現を示す、請求項 128 ~ 134 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 138】

前記がんが、固形腫瘍である、請求項 128 ~ 137 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 139】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 128 ~ 137 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 140】

前記がんが、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 139 に記載の方法。

## 【請求項 141】

前記がんが、黒色腫である、請求項 139 に記載の方法。

## 【請求項 142】

前記がんが、H N S C C である、請求項 139 に記載の方法。

30

## 【請求項 143】

前記がんが、子宮頸癌である、請求項 139 に記載の方法。

## 【請求項 144】

前記がんが、N S C L C である、請求項 139 に記載の方法。

## 【請求項 145】

前記がんが、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) である、請求項 139 に記載の方法。

## 【請求項 146】

前記がんが、胃腸癌である、請求項 139 に記載の方法。

## 【請求項 147】

前記がんが、超異変型癌である、請求項 128 ~ 146 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 148】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項 128 ~ 146 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 149】

前記容器が、密閉容器である、請求項 128 ~ 148 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 150】

前記容器が、G - 容器である、請求項 128 ~ 149 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 151】

前記容器が、G R E X - 10 である、請求項 128 ~ 150 のいずれか一項に記載の方

50

法。

【請求項 152】

前記密閉容器が、GREX-100である、請求項128～150のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 153】

前記密閉容器が、GREX-500である、請求項128～150のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 154】

先行請求項のいずれかに記載の方法によって作製された治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団。

【請求項 155】

患者の腫瘍組織から調製された治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団であって、前記治療用TIL集団は、効力の増大、インターフェロン-ガンマ産生の増大、及び/またはポリクローナリティの増加を提供する、前記治療用TIL集団。

【請求項 156】

インターフェロン-ガンマ産生の増大を提供する、請求項154または請求項155に記載の治療用TIL集団。

【請求項 157】

ポリクローナリティの増加を提供する、請求項154または請求項155に記載の治療用TIL集団。

【請求項 158】

効力の増大を提供する、請求項154または請求項155に記載の治療用TIL集団。

【請求項 159】

前記治療用TIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多くのインターフェロン-ガンマ産生が可能である、請求項154～158のいずれかに記載の治療用TIL集団。

【請求項 160】

前記治療用TIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多くのインターフェロン-ガンマ産生が可能である、請求項154～158のいずれかに記載の治療用TIL集団。

【請求項 161】

前記治療用TIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多くのインターフェロン-ガンマ産生が可能である、請求項154～158のいずれかに記載の治療用TIL集団。

【請求項 162】

治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団であって、前記治療用TIL集団は、前記第1のTILの増殖を抗原提示細胞(APC)を追加せずに実施するプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多くのインターフェロン-ガンマ産生が可能である、前記治療用TIL集団。

【請求項 163】

前記治療用TIL集団が、前記第1のTILの増殖をAPCを追加せずに実施するプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多くのインターフェロン-ガンマ産生が可能である、請求項162に記載の治療用TIL集団。

【請求項 164】

前記治療用TIL集団が、前記第1のTILの増殖をAPCを追加せずに実施するプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多くのインターフェロン-ガンマ産生が可能である、請求項163に記載の治療用TIL集団。

【請求項 165】

治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団であって、前記治療用TIL集団は、前記第1のTILの増殖をOKT3を追加せずに実施するプロセスによって調製されたTILと比較

10

20

30

40

50

較して、少なくとも1倍多くのインターフェロン - ガンマ産生が可能である、前記治療用 T I L 集団。

【請求項 1 6 6】

前記治療用 T I L 集団が、前記第 1 の T I L の増殖を O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも2倍多くのインターフェロン - ガンマ産生が可能である、請求項 1 6 5 に記載の治療用 T I L 集団。

【請求項 1 6 7】

前記治療用 T I L 集団が、前記第 1 の T I L の増殖を O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも3倍多くのインターフェロン - ガンマ産生が可能である、請求項 1 6 5 に記載の治療用 T I L 集団。

10

【請求項 1 6 8】

治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 集団であって、前記治療用 T I L 集団は、前記第 1 の T I L の増殖を抗原提示細胞 ( A P C ) を追加せず、及び O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも1倍多くのインターフェロン - ガンマ産生が可能である、前記治療用 T I L 集団。

【請求項 1 6 9】

前記治療用 T I L 集団は、前記第 1 の T I L の増殖を抗原提示細胞 ( A P C ) を追加せず、及び O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも2倍多くのインターフェロン - ガンマ産生が可能である、請求項 1 6 8 に記載の治療用 T I L 集団。

20

【請求項 1 7 0】

前記治療用 T I L 集団は、前記第 1 の T I L の増殖を抗原提示細胞 ( A P C ) を追加せず、及び O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも3倍多くのインターフェロン - ガンマ産生が可能である、請求項 1 6 8 に記載の治療用 T I L 集団。

【請求項 1 7 1】

請求項 1 5 4 ~ 1 7 0 のいずれかに記載の前記治療用 T I L 集団及び薬学的に許容される担体を含む、腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物。

【請求項 1 7 2】

請求項 1 6 8 に記載の前記 T I L 組成物を含む滅菌輸液バッグ。

30

【請求項 1 7 3】

請求項 1 5 4 ~ 1 6 7 のいずれかに記載の治療用 T I L 集団の凍結保存調製。

【請求項 1 7 4】

請求項 1 5 4 ~ 1 7 0 のいずれかに記載の前記治療用 T I L 集団及び凍結保存培地を含む、腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物。

【請求項 1 7 5】

前記凍結保存培地が D M S O を含む、請求項 1 7 4 に記載の T I L 組成物。

【請求項 1 7 6】

前記凍結保存培地が 7 ~ 1 0 % D M S O を含む、請求項 1 7 5 に記載の T I L 組成物。

【請求項 1 7 7】

請求項 1 7 1 または 1 7 4 ~ 1 7 6 のいずれかに記載の T I L 組成物の凍結保存調製。

40

【請求項 1 7 8】

医薬品として使用するための、請求項 1 7 1 または 1 7 4 ~ 1 7 7 のいずれかに記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物。

【請求項 1 7 9】

がんの治療に使用するための、請求項 1 7 1 または 1 7 4 ~ 1 7 7 のいずれかに記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物。

【請求項 1 8 0】

固形腫瘍癌の治療に使用するための、請求項 1 7 1 または 1 7 4 ~ 1 7 7 のいずれかに記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物。

50

## 【請求項 181】

黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択されるがんの治療に使用するためのものである、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の前記腫瘍浸潤リンパ球（TIL）組成物。

## 【請求項 182】

黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌からなる群から選択されるがんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）組成物。

10

## 【請求項 183】

がんが黒色腫である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

## 【請求項 184】

がんが HNSCC である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

## 【請求項 185】

子宮頸癌である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

## 【請求項 186】

前記がんが NSCLC である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

20

## 【請求項 187】

前記がんが神経膠芽腫（GBMを含む）である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

## 【請求項 188】

前記がんが胃腸癌である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

## 【請求項 189】

前記がんが超異変型癌である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

30

## 【請求項 190】

前記がんが小児超異変型癌である、がんの治療に使用するための、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の TIL 組成物。

## 【請求項 191】

治療有効用量の TIL 組成物を対象に投与することを含む、前記対象におけるがんを治療する方法で使用するためのものである、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）組成物の使用。

## 【請求項 192】

前記がんが固形腫瘍である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。

40

## 【請求項 193】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。

## 【請求項 194】

前記がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。

## 【請求項 195】

前記がんが黒色腫である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。

50

- 【請求項 196】  
前記がんが HNSCC である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 197】  
前記がんが子宮頸癌である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 198】  
前記がんが NSCLC である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 199】  
前記がんが神経膠芽腫（GBM を含む）である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 200】 10  
前記がんが胃腸癌である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 201】  
前記がんが超異変型癌である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 202】  
前記がんが小児超異変型癌である、請求項 191 に記載の TIL 組成物の使用。
- 【請求項 203】  
治療有効用量の前記 TIL 組成物を対象に投与することを含む、前記対象におけるがんを治療する方法で使用するためのものである、請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）組成物。
- 【請求項 204】 20  
前記がんが固形腫瘍である、請求項 203 に記載の TIL 組成物。
- 【請求項 205】  
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBM を含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 203 に記載の TIL 組成物。
- 【請求項 206】  
前記がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBM を含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 203 に記載の TIL 組成物。
- 【請求項 207】 30  
対象におけるがんを治療するための方法であって、治療有効用量の請求項 171 または 174 ~ 177 のいずれかに記載の腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。
- 【請求項 208】  
前記がんが固形腫瘍である、請求項 207 に記載の方法。
- 【請求項 209】  
前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBM を含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 207 に記載の方法。
- 【請求項 210】 40  
前記がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBM を含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 207 に記載の方法。
- 【請求項 211】  
前記がんが、黒色腫である、請求項 207 に記載の方法。
- 【請求項 212】  
前記がんが、HNSCC である、請求項 207 に記載の方法。
- 【請求項 213】  
前記がんが、子宮頸癌である、請求項 207 に記載の方法。
- 【請求項 214】 50

前記がんが、NSCLCである、請求項207に記載の方法。

【請求項215】

前記がんが、神経膠芽腫（GBMを含む）である、請求項207に記載の方法。

【請求項216】

前記がんが、胃腸癌である、請求項207に記載の方法。

【請求項217】

前記がんが、超異変型癌である、請求項207に記載の方法。

【請求項218】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項207に記載の方法。

【請求項219】

T細胞を増殖させる方法であって、

(a) 第1のT細胞集団を増殖させ、かつ活性をプライミングするために、前記第1のT細胞集団を培養することによって、ドナーから得られた前記第1のT細胞集団の第1の増殖のプライミングを実施することと、

(b) ステップ(a)でプライミングされた前記第1のT細胞集団の活性化が崩壊し始めた後、第2のT細胞集団を得るために、前記第1のT細胞集団を培養して増殖させ、かつ前記第1のT細胞集団の活性をブーストすることにより、前記第1のT細胞集団の急速な第2の増殖を実施することと、

(c) 前記第2のT細胞集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項220】

ステップ(a)の前記第1の増殖のプライミングが、最大7日間の期間中に実施される、請求項219に記載の方法。

【請求項221】

ステップ(b)の前記急速な第2の増殖が、最大11日間の期間中に実施される、請求項219または220に記載の方法。

【請求項222】

ステップ(b)の前記急速な第2の増殖が、最大9日間の期間中に実施される、請求項221に記載の方法。

【請求項223】

ステップ(a)の前記第1の増殖のプライミングが最大7日間の期間中に実施され、ステップ(b)の前記急速な第2の増殖が最大9日間の期間中に実施される、請求項219～222のいずれかに記載の方法。

【請求項224】

ステップ(a)の前記第1の増殖のプライミングが、最大8日間の期間中に実施される、請求項219に記載の方法。

【請求項225】

ステップ(b)の前記急速な第2の増殖が、最大8日間の期間中に実施される、請求項219または220に記載の方法。

【請求項226】

ステップ(a)の前記第1の増殖のプライミングが最大8日間の期間中に実施され、ステップ(b)の前記急速な第2の増殖が最大8日間の期間中に実施される、請求項219～222のいずれかに記載の方法。

【請求項227】

ステップ(a)における、前記第1のT細胞集団が、OKT-3及びIL-2を含む第1の培養培地で培養される、請求項219～226のいずれかに記載の方法。

【請求項228】

前記第1の培養培地がOKT-3、IL-2及び抗原提示細胞(APC)を含む、請求項227に記載の方法。

【請求項229】

ステップ(b)において、前記第1のT細胞の集団が、OKT-3、IL-2、ならび

10

20

30

40

50

に、抗原提示細胞（A P C）及び／またはO K T - 3を含むA P C培養物からの培養上清のいずれかを含む第2の培養培地中で培養される、請求項219～226のいずれかに記載の方法。

【請求項230】

ステップ（a）において、前記第1のT細胞の集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され、前記第1の培養培地が、任意にO K T - 3、I L - 2及び任意で、第1の抗原提示細胞（A P C）集団またはO K T - 3を含む第1のA P C培養物からの培養上清を含み、前記第1のA P C集団が、前記第1のT細胞集団にとって外因性であり、前記第1のA P C集団が、前記第1のガス透過性表面上に積層され、ステップ（b）において、前記第1のT細胞集団が、前記容器内の第2の培養培地中で培養され、前記第2の培養培地が、O K T - 3、I L - 2及び第2のA P Cの集団、またはO K T - 3を含む第2のA P C培養物からの培養上清を含み、前記第2のA P C集団は、前記第1のT細胞集団のドナーにとって外因性であり、前記第2のA P C集団は、前記第1のガス透過性表面上に積層され、前記第2のA P C集団は、前記第1のA P C集団よりも多い、請求項219～226のいずれかに記載の方法。

10

【請求項231】

前記第2のA P C集団のA P Cの数の、前記第1のA P C集団のA P Cの数に対する比が、約2：1である、請求項230に記載の方法。

【請求項232】

前記第1のA P C集団中のA P Cの数は約 $2.5 \times 10^8$ であり、前記第2のA P C集団中のA P Cの数は約 $5 \times 10^8$ である、請求項230または231に記載の方法。

20

【請求項233】

ステップ（a）において、前記第1のA P C集団が、2 A P C層の平均厚さで前記第1のガス透過性表面上に積層される、請求項230～232のいずれかに記載の方法。

【請求項234】

ステップ（b）において、前記第2のA P C集団が、4～8 A P C層の平均厚さで前記第1のガス透過性表面上に積層される、請求項230～233のいずれかに記載の方法。

【請求項235】

ステップ（b）で前記第1のガス透過性表面上に積層されたA P C層の平均数の、ステップ（a）で前記第1のガス透過性表面上に積層されたA P C層の平均数に対する比が、2：1である、請求項230～234のいずれかに記載の方法。

30

【請求項236】

前記A P Cが末梢血単核細胞（P B M C）である、請求項230～235のいずれかに記載の方法。

【請求項237】

A P Cが、照射され、前記第1のT細胞集団のドナーにとって外因性であるP B M Cを含む、請求項230～236のいずれかに記載の方法。

【請求項238】

前記T細胞が、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）である、請求項227～234のいずれかに記載の方法。

40

【請求項239】

前記T細胞が、髄浸潤リンパ球（M I L）である、請求項227～234のいずれかに記載の方法。

【請求項240】

前記T細胞が、末梢血リンパ球（P B L）である、請求項227～234のいずれかに記載の方法。

【請求項241】

前記細胞培養培地が、限定培地及び／または無血清培地である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項242】

50

前記限定培地が、（任意に組換え）トランスフェリン、（任意に組換え）インスリン、及び（任意に組換え）アルブミンを含む、請求項 2 4 1 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

前記無血清培地または限定培地が、基礎細胞培養培地ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4 4】

前記基礎細胞培地が、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CTS（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI 増殖用培地、及び Iscove's Modified Dulbecco's Medium からなる群から選択される、請求項 2 4 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 4 5】

前記血清サプリメントまたは前記血清代替物が、CTS（商標）Optmizer T細胞増殖血清サプリメント及びCTS（商標）免疫細胞血清代替物からなる群から選択される、請求項 2 4 3 または 2 4 4 に記載の方法。

20

【請求項 2 4 6】

前記細胞培養培地が、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記細胞培養培地が、1つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 4 8】

前記細胞培養培地が、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 7 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 2 4 9】

前記細胞培養培地が、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5 0】

前記細胞培養培地が、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の抗生物質、及び、1つまたは複数の微量元素を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5 1】

前記細胞培養培地が、アルブミンを含む、請求項 2 4 1 ~ 2 5 0 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 2 5 2】

前記細胞培養培地が、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに、微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、Br、T、 $Mn^{2+}$ 、P、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される 1 つまたは複数の成分と、を含む、請求項 2 4 1 ~ 2 5 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5 3】

50

前記細胞培養培地が、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む、請求項241~252のいずれかに記載の方法。

【請求項254】

前記細胞培養培地が、前記細胞培養培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%の総血清置換物濃度(体積%)を含む、請求項241~253のいずれかに記載の方法。

【請求項255】

前記細胞培養培地が、前記細胞培養培地の総量の約3%、約5%、または約10%の総血清置換物濃度を含む、請求項241~254のいずれかに記載の方法。

10

【請求項256】

前記細胞培養培地が、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度のグルタミン(すなわち、Glutamax(登録商標))をさらに含む、請求項241~255のいずれかに記載の方法。

【請求項257】

前記細胞培養培地が、約2mMの濃度でグルタミン(すなわち、Glutamax(登録商標))をさらに含む、請求項241~256のいずれかに記載の方法。

【請求項258】

前記細胞培養培地が、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM~約100mM、35mM~約95mM、40mM~約90mM、45mM~約85mMまで、50mM~約80mM、55mM~約75mM、60mM~約70mM、または約65mMの濃度で-ルカプトエタノールをさらに含む、請求項241~257のいずれかに記載の方法。

20

【請求項259】

前記細胞培養培地が、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールをさらに含む、請求項241~258のいずれかに記載の方法。

【請求項260】

前記細胞培養培地が、国際PCT公開第WO/1998/030679号に記載の限定培地を含む、請求項241~259のいずれかに記載の方法。

30

【請求項261】

前記細胞培養培地が、約5~200mg/Lの範囲のグリシン、約5~250mg/Lの範囲のL-ヒスチジン、約5~300mg/Lの範囲のL-イソロイシン、約5~200mg/Lの範囲のL-メチオニン、約5~400mg/Lの範囲のL-フェニルアラニン、約1~1000mg/Lの範囲のL-プロリン、約1~45mg/Lの範囲のL-ヒドロキシプロリン、約1~250mg/Lの範囲のL-セリン、約10~500mg/Lの範囲のL-スレオニン、約2~110mg/Lの範囲のL-トリプトファン、約3~175mg/Lの範囲のL-チロシン、約5~500mg/Lの範囲のL-バリン、約1~20のmg/L範囲のチアミン、約1~20mg/Lの範囲の還元型グルタチオン、約1~200mg/Lの範囲のL-アスコルビン酸-2-リン酸、約1~50mg/Lの範囲の鉄飽和トランスフェリン、約1~100mg/Lの範囲のインスリン、約0.000001~0.00001mg/Lの範囲の亜セレン酸ナトリウム、及び/または約5000~50,000mg/Lの範囲のアルブミン(例えばAlbumax(登録商標)I)を含む、請求項241~260のいずれかに記載の方法。

40

【請求項262】

前記細胞培養培地が、本明細書に提供される表4の「1X培地中の濃度範囲」という見出しの下の列に列挙される濃度範囲で、1つまたは複数の非微量元素部分成分を含む、請求項241~261のいずれかに記載の方法。

50

## 【請求項 263】

前記細胞培養培地の浸透圧が、約 260 ~ 350 mOsmol である、請求項 241 ~ 262 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 264】

前記細胞培養培地が、約 3.7 g/L、または約 2.2 g/L の重炭酸ナトリウムをさらに含む、請求項 241 ~ 263 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 265】

細胞培養培地が、L-グルタミン（約 2 mM の最終濃度）、1 つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（NEAA；約 100  $\mu$ M の最終濃度）、及び/または 2-メルカプトエタノール（約 100  $\mu$ M の最終濃度）をさらに含む、請求項 241 ~ 263 のいずれかに記載の方法。 10

## 【請求項 266】

前記第 1 及び/または第 2 のガス透過性容器中の細胞培養培地には、ベータ-メルカプトエタノール（BME または ME；2-メルカプトエタノール、CAS 60-24-2 としても知られている）が含まれていない、請求項 241 ~ 265 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 267】

前記細胞培養培地が、CTS Optmizer T-Cell Expansion SFM、3% CTS Immune Cell Serum Replacement、55 mM BME、及び任意でグルタミンを含む、請求項 241 ~ 265 のいずれかに記載の方法。 20

## 【請求項 268】

前記細胞培養培地が、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Supplement（26 mL/L）を補充した CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Medium（26 mL/L）、及び 3% CTS（商標）Immune Cell SR、及び 2 mM Glutamax を含み、任意に 6,000 IU/mL の IL-2 をさらに含む、請求項 241 ~ 265 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 269】

前記細胞培養培地が、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Supplement（26 mL/L）を補充した CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Medium（26 mL/L）、及び 3% CTS（商標）Immune Cell SR、2 mM Glutamax を含み、任意に 3,000 IU/mL の IL-2 をさらに含む、請求項 241 ~ 265 のいずれかに記載の方法。 30

## 【請求項 270】

前記腫瘍サンプルが、前記対象における前記腫瘍の 1 つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 271】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用 TIL 集団に増殖するための方法であって、前記方法は、 40

(i) IL-2 を含む第 1 の細胞培養培地中で約 3 日間腫瘍サンプルを培養することによって、対象における腫瘍の 1 つ以上の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルから第 1 の TIL 集団を得る及び/または受け取ることと、

(ii) 第 2 の TIL 集団を産生するために、IL-2、OKT-3、ならびに、抗原提示細胞（APC）及び/または OKT-3 を含む第 1 の APC の培養物からの培養上清のいずれかを含有する第 2 の細胞培養培地中に、前記第 1 の TIL 集団を培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で実施され、前記第 1 の増殖のプライミングは、前記第 2 の TIL 集団を得るために約 7 ~ 8 日の第 1 の期間実施され、前記第 2 の TIL 50

集団の数は、前記第 1 の T I L 集団の数よりも多い、前記第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( i i i ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記第 2 の細胞培養培地に追加の I L - 2、O K T - 3、ならびに、抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む第 2 の A P C 培養物からの培養上清のいずれかを補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記急速な第 2 の増殖で添加される前記 A P C の数は、ステップ ( i i ) で添加される前記 A P C の数の少なくとも 2 倍であり、前記急速な第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために約 1 1 日間の第 2 の期間行われ、前記第 3 の T I L 集団は、治療的 T I L 集団であり、前記急速な第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、  
( i v ) ステップ ( i i i ) から得られた前記治療用 T I L 集団を採取することと、  
( v ) ステップ ( i v ) から採取した前記 T I L 集団を輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

10

【請求項 2 7 2】

腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を治療用 T I L 集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

( i ) I L - 2 を含む第 1 の細胞培養培地中で約 3 日間腫瘍サンプルを培養することによって、対象における腫瘍の 1 つ以上の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルから第 1 の T I L 集団を得る及び / または受け取ることと、

( i i ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、O K T - 3、ならびに、抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第 1 の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、前記第 1 の T I L 集団を培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために約 7 日または 8 日の第 1 の期間実施され、前記第 2 の T I L 集団の数は、前記第 1 の T I L 集団の数よりも多い、前記第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

20

( i i i ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、O K T - 3、ならびに、抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第 2 の培養物からの培養上清のいずれかを含む第 3 の細胞培養培地と、前記第 2 の T I L 集団とを接触させることによって、急速な第 2 の増殖を実施することであって、急速な第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために約 1 1 日の第 2 の期間実施され、第 3 の T I L 集団は、治療用 T I L 集団である、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

30

( i v ) ステップ ( i i i ) から得られた前記治療用 T I L 集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項 2 7 3】

前記第 2 期間の 5 日目の後、前記培養物を 2 つ以上の継代培養に分割し、各継代培養に追加量の第 3 培養培地を補充し、約 6 日間培養する、請求項 2 7 1 または 2 7 2 に記載の方法。

【請求項 2 7 4】

前記第 2 期間の 5 日目に後、前記培養物を最大 5 つの継代培養物に分割する、請求項 2 7 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 7 5】

前記方法のすべてのステップが約 2 2 日間で完了する、請求項 2 7 1 ~ 2 7 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 7 6】

T 細胞を増殖させる方法であって、

( i ) 第 1 の T 細胞集団を増殖させ、かつ活性をプライミングするために、前記第 1 の T 細胞集団を培養することによって、ドナーの腫瘍の 1 つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルからの前記第 1 の T 細胞集団の第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

50

( i i ) ステップ ( a ) でプライミングされた前記第 1 の T 細胞集団の活性化が崩壊し始めた後、第 2 の T 細胞集団を得るために、前記第 1 の T 細胞集団を培養して増殖させ、かつ前記第 1 の T 細胞集団の活性をブーストすることにより、前記第 1 の T 細胞集団の急速な第 2 の増殖を実施することと、

( i v ) 第 2 の T 細胞集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項 277】

前記腫瘍サンプルが、複数のコア生検から得られる、請求項 270 ~ 276 のいずれかに記載の方法。

【請求項 278】

前記複数のコア生検が、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 個のコア生検からなる群から選択される、請求項 277 に記載の方法。 10

【請求項 279】

腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) または増殖腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物であって、i) 任意に請求項 1 ~ 278 のいずれかに従って誘導される腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の集団、及び

ii) 任意に ( 任意に組換え ) トランスフェリン、( 任意に組換え ) インスリン、及び ( 任意に組換え ) アルブミンを含む、限定培地または無血清培地、を含む、前記 T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 280】

限定培地または無血清培地が、( 任意に組換え ) トランスフェリン、( 任意に組換え ) インスリン、及び ( 任意に組換え ) アルブミンを含む、請求項 270 に記載の T I L または増殖 T I L 組成物。 20

【請求項 281】

前記無血清培地または限定培地が、基礎細胞培養培地ならびに血清サプリメント及び / または血清置換物を含む、請求項 270 または 271 に記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 282】

前記基礎細胞培地には、CTS ( 商標 ) OpTmizer ( 商標 ) T - Cell Expansion Basal Medium、CTS ( 商標 ) OpTmizer ( 商標 ) T - Cell Expansion SFM、CTS ( 商標 ) AIM - V Medium、CTS ( 商標 ) AIM - V SFM、LymphoONE ( 商標 ) T - Cell Expansion Xeno - Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium ( DMEM )、Minimal Essential Medium ( MEM )、Basal Medium Eagle ( BME )、RPMI 1640、F - 10、F - 12、Minimal Essential Medium ( MEM )、Glasgow's Minimal Essential Medium ( G - MEM )、RPMI 増殖用培地、及び Iscove's Modified Dulbecco's Medium が含まれるが、これらに限定されない、請求項 272 に記載の T I L または増殖 T I L 組成物。 30

【請求項 283】

前記血清サプリメントまたは前記血清代替物が、CTS ( 商標 ) OpTmizer T 細胞増殖血清サプリメント及び CTS ( 商標 ) 免疫細胞血清代替物からなる群から選択される、請求項 281 または 282 に記載の T I L または増殖 T I L 組成物。 40

【請求項 284】

前記限定培地または無血清培地が、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物を含む、請求項 279 ~ 283 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 285】

前記限定培地または無血清培地が、1つまたは複数のアミノ酸を含む、請求項 279 ~ 284 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 286】

前記限定培地または無血清培地が、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物を含む、請求項289~285のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項287】

前記限定培地または無血清培地が、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物を含む、請求項279~286のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項288】

前記限定培地または無血清培地が、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素を含む、請求項279~287のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。 10

【請求項289】

前記限定培地または無血清培地が、アルブミンを含む、請求項279~288のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項290】

前記限定培地または無血清培地が、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに、微量元素部分 $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$ 及び $Zr^{4+}$ を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む、請求項279~289のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。 20

【請求項291】

前記限定培地または無血清培地が、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む、請求項279~290のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項292】

前記限定培地または無血清培地が、前記細胞培養培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%の総血清置換物濃度(体積%)を含む、請求項279~291のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。 30

【請求項293】

前記限定培地または無血清培地が、前記細胞培養培地の総量の約3%、約5%、または約10%の総血清置換物濃度を含む、請求項279~292のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項294】

前記限定培地または無血清培地が、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度のグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))をさらに含む、請求項279~293のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。 40

【請求項295】

前記限定培地または無血清培地が、約2mMの濃度でグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))をさらに含む、請求項279~294のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項296】

前記限定培地または無血清培地が、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM 50

M ~ 約 100 mM、35 mM ~ 約 95 mM、40 mM ~ 約 90 mM、45 mM ~ 約 85 mM まで、50 mM ~ 約 80 mM、55 mM ~ 約 75 mM、60 mM ~ 約 70 mM、または約 65 mM の濃度で 2 -メルカプトエタノールをさらに含む、請求項 279 ~ 295 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 297】

前記限定培地または無血清培地が、約 55 mM の濃度で 2 -メルカプトエタノールをさらに含む、請求項 279 ~ 296 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 298】

前記限定培地または無血清培地が、国際 P C T 公開第 W O / 1998 / 030679 号に記載の限定培地を含む、請求項 279 ~ 297 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

10

【請求項 299】

前記限定培地または無血清培地が、約 5 ~ 200 mg / L の範囲のグリシン、約 5 ~ 250 mg / L の範囲の L -ヒスチジン、約 5 ~ 300 mg / L の範囲の L -イソロイシン、約 5 ~ 200 mg / L の範囲の L -メチオニン、約 5 ~ 400 mg / L の範囲の L -フェニルアラニン、約 1 ~ 1000 mg / L の範囲の L -プロリン、約 1 ~ 45 mg / L の範囲の L -ヒドロキシプロリン、約 1 ~ 250 mg / L の範囲の L -セリン、約 10 ~ 500 mg / L の範囲の L -スレオニン、約 2 ~ 110 mg / L の範囲の L -トリプトファン、約 3 ~ 175 mg / L の範囲の L -チロシン、約 5 ~ 500 mg / L の範囲の L -バリン、約 1 ~ 20 mg / L の範囲のチアミン、約 1 ~ 20 mg / L の範囲の還元型グルタチオン、約 1 ~ 200 mg / L の範囲の L -アスコルビン酸 - 2 -リン酸、約 1 ~ 50 mg / L の範囲の鉄飽和トランスフェリン、約 1 ~ 100 mg / L の範囲のインスリン、約 0.000001 ~ 0.0001 mg / L の範囲の亜セレン酸ナトリウム、及び / または約 5000 ~ 50,000 mg / L の範囲のアルブミン (例えば A l b u M A X (登録商標) I) を含む、請求項 279 ~ 298 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

20

【請求項 300】

前記限定培地または無血清培地が、本明細書に提供される表 4 の見出し「1 X における濃度範囲」の下の列に列挙された濃度範囲で 1 つまたは複数の非微量元素部分成分を含む、請求項 279 ~ 299 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

30

【請求項 301】

前記限定培地または無血清培地の前記浸透圧が約 260 ~ 350 m O s m o l である、請求項 279 ~ 300 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 302】

前記限定培地または無血清培地が、約 3.7 g / L、または約 2.2 g / L 重炭酸ナトリウムをさらに含む、請求項 279 ~ 301 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 303】

前記限定培地または無血清培地が、L -グルタミン (約 2 mM の最終濃度)、1 つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸 (N E A A ; 約 100 μ M の最終濃度)、及び / または 2 -メルカプトエタノール (約 100 μ M の最終濃度) をさらに含む、請求項 279 ~ 302 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

40

【請求項 304】

前記第 1 及び / または第 2 のガス透過性容器中の前記限定培地または無血清培地には、ベータ -メルカプトエタノール (B M E または M E ; 2 -メルカプトエタノール、C A S 60 - 24 - 2 としても知られている) が含まれていない、請求項 279 ~ 303 のいずれかに記載の T I L または増殖 T I L 組成物。

【請求項 305】

前記細胞培養培地が、C T S O p T m i z e r T - C e l l E x p a n s i o n S F M、3 % C T S I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t、

50

55 mM BME、及び任意でグルタミンを含む、請求項279～304のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項306】

前記細胞培養培地が、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion Basal Supplement(26mL/L)を補充したCTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion Basal Medium(26mL/L)、及び3%CTS(商標)Immune Cell SR、及び2mM Glutamaxを含み、任意に6,000IU/mLのIL-2をさらに含む、請求項279～305のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項307】

前記細胞培養培地が、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion Basal Supplement(26mL/L)を補充したCTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion Basal Medium(26mL/L)、及び3%CTS(商標)Immune Cell SR、2mM Glutamaxを含み、任意に3,000IU/mLのIL-2をさらに含む、請求項279～305のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項308】

前記TIL集団が、治療用TIL集団である、請求項279～207のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項309】

前記治療用TIL集団が、血清IFN- $\gamma$ の上昇を示し、IFN- $\gamma$ の上昇は200pg/mL超、250pg/mL超、300pg/mL超、350pg/mL超、400pg/mL超、450pg/mL超、500pg/mL超、550pg/mL超、600pg/mL超、650pg/mL超、700pg/mL超、750pg/mL超、800pg/mL超、850pg/mL超、900pg/mL超、950pg/mL超、または1000pg/mL超である、請求項279～308のいずれかに記載のTILまたは増殖TIL組成物。

【請求項310】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることか、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

(b)任意に、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)、を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、前記第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(d)第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、前記第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1～5日間行われ、前記第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

10

20

30

40

50

(e) 前記第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、前記第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、前記第3の増殖は、約4～8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第3の増殖を実施することと、

(f) ステップ(e)から得られた、前記第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

10

(g) ステップ(g)から採取された前記TIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

#### 【請求項311】

治療用の浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物であって、前記TIL組成物は、

(a) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることが、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

20

(b) 任意に、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2及び抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、前記第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

30

(d) 第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、前記第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1～5日間行われ、前記第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

(e) 前記第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、前記第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、前記第3の増殖は、約4～8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第3の増殖を実施することと、

40

(f) ステップ(e)から得られた、前記第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g) ステップ(g)から採取された前記TIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移す

50

ことであって、ステップ（f）から（g）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む方法により産生される、前記 T I L 組成物。

【請求項 3 1 2】

前記 T I L 組成物が凍結保存された組成物であり、前記方法が、（h）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（g）からの採取された前記 T I L 集団を含む前記輸液バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項 3 1 1 に記載の T I L 組成物。

【請求項 3 1 3】

がんに罹患した対象を治療するための方法であって、増殖した腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を投与することを含む前記方法は、

10

（a）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から T I L の最初の集団を得ること、または

患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることと、

（b）任意に、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

（c）第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞（A P C）を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で

20

任意に行われ、ステップ（b）からステップ（c）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

（d）第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

30

（e）前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ（d）からステップ（e）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

（f）ステップ（e）から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ（e）からステップ（f）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

40

（g）ステップ（g）から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ（f）から（g）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、

（h）ステップ（g）の前記輸液バッグから治療有効用量の前記第 3 の T I L 集団を前記対象に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 3 1 4】

前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングが約 6 ~ 8 日間行われる、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 1 5】

50

前記急速な第 2 の増殖が約 2 ~ 4 日間行われる、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 1 6】

前記第 3 の増殖がそれぞれ約 5 ~ 7 日間行われる、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法

【請求項 3 1 7】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングが約 7 日間行われ、前記急速な第 2 の増殖が約 3 日間行われ、前記第 3 の増殖が約 6 日間行われる、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 1 8】

ステップ (c) ~ (e) が約 1 4 ~ 1 8 日間で実施される、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 1 9】

ステップ (c) ~ (e) が約 1 6 日間で実施される、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 0】

ステップ (c) ~ (e) が約 1 8 日間で実施される、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 1】

ステップ (c) ~ (e) が約 1 6 日間で実施される、請求項 3 1 0 ~ 3 1 3 に記載の方法。

20

【請求項 3 2 2】

ステップ (e) が、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む、請求項 3 1 0 ~ 3 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2 3】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 3 1 3 ~ 3 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 2 4】

30

前記がんが、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 5】

前記がんが、黒色腫である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 6】

前記がんが、H N S C C である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 7】

前記がんが、子宮頸癌である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 8】

前記がんが、N S C L C である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 3 2 9】

前記がんが、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 3 0】

前記癌が胃癌である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 3 1】

前記がんが、超異変型癌である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 3 2】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 3 3】

腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を治療用 T I L 集団に増殖するための方法であって、前記

50

方法は、

( a ) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることが、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることと、

( b ) 任意に、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

( c ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( d ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( e ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( d ) からステップ ( e ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

( f ) ステップ ( f ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( e ) からステップ ( f ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( g ) ステップ ( f ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( f ) から ( g ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

#### 【請求項 3 3 4】

治療用の浸潤性リンパ球 ( T I L ) 集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) 組成物であって、前記 T I L 組成物は、

( a ) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることが、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることと、

( b ) 任意に、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

( c ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任

10

20

30

40

50

意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( d ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( e ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( d ) からステップ ( e ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

( f ) ステップ ( f ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( e ) からステップ ( f ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( g ) ステップ ( f ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( f ) から ( g ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む方法により産生される、前記 T I L 組成物。

#### 【請求項 3 3 5】

前記 T I L 組成物が凍結保存された組成物であり、前記方法が、( h ) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ ( g ) からの採取された前記 T I L 集団を含む前記輸液バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項 3 3 4 に記載の T I L 組成物。

#### 【請求項 3 3 6】

がんに罹患した対象を治療するための方法であって、増殖した腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を投与することを含む前記方法は、

( a ) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることか、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって前記患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることと、

( b ) 任意に、前記腫瘍断片または前記腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

( c ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( d ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施するこ

10

20

30

40

50

とと、

( e ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( d ) からステップ ( e ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

( f ) ステップ ( f ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( e ) からステップ ( f ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( g ) ステップ ( f ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( f ) から ( g ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、

( h ) ステップ ( g ) の前記輸液バッグから治療有効用量の前記第 3 の T I L 集団を前記対象に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 3 3 7】

ステップ ( a ) における、前記患者から得られた前記腫瘍サンプルが、( i ) 前記腫瘍サンプルを凍結保存して凍結保存された腫瘍サンプルを産生すること、( i i ) 前記凍結保存された腫瘍サンプルを解凍して、解凍された腫瘍サンプルを産生すること、及び、( i i i ) 前記解凍された腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に断片化すること、によって複数の腫瘍断片に加工される、請求項 3 3 3 ~ 3 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 3 8】

ステップ ( a ) における、前記患者から得られた前記腫瘍サンプルが、( i ) 前記腫瘍サンプルを凍結保存して凍結保存された腫瘍サンプルを産生すること、( i i ) 前記凍結保存された腫瘍サンプルを解凍して、解凍された腫瘍サンプルを産生すること、及び、( i i i ) 前記解凍された腫瘍サンプルを消化して腫瘍消化物を産生すること、によって腫瘍消化物に加工される、請求項 3 3 3 ~ 3 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 3 9】

ステップ ( a ) における、前記患者から得られた前記腫瘍サンプルが、( i ) 前記腫瘍サンプルを凍結保存して凍結保存された腫瘍サンプルを産生すること、( i i ) 前記凍結保存された腫瘍サンプルを解凍して、解凍された腫瘍サンプルを産生すること、( i i i ) 前記解凍された腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に断片化すること、及び、( i v ) 前記複数の腫瘍断片を消化して腫瘍消化物を産生すること、によって腫瘍消化物に加工される、請求項 3 3 3 ~ 3 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 4 0】

ステップ ( e ) が、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む、請求項 3 3 3 ~ 3 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 4 1】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 3 3 6 ~ 3 4 0 に記載の方法。

【請求項 3 4 2】

前記がんが、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 3 4 1 に記載の方法。

【請求項 3 4 3】

前記がんが、黒色腫である、請求項 3 4 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 4 4】

前記がんが、HNSCCである、請求項 3 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 4 5】

前記がんが、子宮頸癌である、請求項 3 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 4 6】

前記がんが、NSCLCである、請求項 3 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 4 7】

前記がんが、神経膠芽腫（GBMを含む）である、請求項 3 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 4 8】

前記がんが、胃腸癌である、請求項 3 4 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3 4 9】

前記がんが、超異変型癌である、請求項 3 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 5 0】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項 3 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 5 1】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

（a）（i）対象から切断され、前記切断後に消化され、前記消化後に凍結保存された腫瘍からの第1のTIL集団を含む凍結保存された腫瘍消化物を解凍すること、及び（ii）IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地で前記第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生すること、によって、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、前記第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

20

（b）第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、前記第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ（a）からステップ（b）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

30

（c）前記第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、前記第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、前記第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ（b）からステップ（c）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第3の増殖を実施することと、

40

（d）ステップ（c）から得られた、前記第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

（e）ステップ（d）から採取された前記TIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ（d）から（e）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む前記方法。

## 【請求項 3 5 2】

治療用の浸潤性リンパ球（TIL）集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）組成物で

50

あって、前記 T I L 組成物は、

( a ) ( i ) 対象から切断され、前記切断後に冷凍保存された腫瘍からの第 1 の T I L 集団を含む凍結保存された腫瘍を解凍すること、及び ( i i ) I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地で前記第 1 の T I L 集団を培養して、第 2 の T I L 集団を産生すること、によって、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、前記第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む方法により産生される、前記 T I L 組成物。

【請求項 3 5 3】

前記 T I L 組成物が凍結保存された組成物であり、前記方法が、( f ) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ ( e ) からの採取された前記 T I L 集団を含む前記輸液バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項 3 5 2 に記載の T I L 組成物。

【請求項 3 5 4】

がんに罹患した対象を治療するための方法であって、増殖した腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を投与することを含む前記方法は、

( a ) ( i ) 対象から切断され、前記切断後に消化され、前記消化後に凍結保存された腫瘍からの第 1 の T I L 集団を含む凍結保存された腫瘍消化物を解凍すること、及び ( i i ) I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地で前記第 1 の T I L 集団を培養して、第 2 の T I L 集団を産生すること、によって、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、前記第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5

10

20

30

40

50

～ 9 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、 I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 5 ～ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( d ) からステップ ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、( f ) ステップ ( e ) の前記輸液バッグから治療有効用量の前記採取された T I L 集団を前記対象に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 3 5 5】

ステップ ( a ) ( i ) が、解凍された腫瘍を産生するために、対象から切除され、前記切除後に凍結保存された腫瘍からの第 1 の T I L 集団を含む凍結保存された腫瘍を解凍すること、及び、前記解凍された腫瘍を複数の腫瘍に断片化することを含み、ステップ ( a ) ( i i ) が、前記第 1 の T I L 集団を含む前記複数の腫瘍断片を培養することを含む、請求項 3 5 1 ～ 3 5 4 に記載の方法。

【請求項 3 5 6】

ステップ ( c ) が、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む、請求項 3 5 1 ～ 3 5 5 に記載の方法。

【請求項 3 5 7】

前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングが約 6 ～ 8 日間行われる、請求項 3 5 1 ～ 3 5 6 に記載の方法。

【請求項 3 5 8】

前記急速な第 2 の増殖が約 6 ～ 8 日間行われる、請求項 3 5 1 ～ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 5 9】

前記第 3 の増殖が約 6 ～ 8 日間行われる、請求項 3 5 1 ～ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6 0】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖は、約 1 8 ～ 2 4 日間で行われる、請求項 3 5 1 ～ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6 1】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖は、約 2 0 ～ 2 2 日間で行われる、請求項 3 5 1 ～ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6 2】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖は、約 2 1 日間で行われる、請求項 3 5 1 ～ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 6 3】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖は、約 2 4 日間以下で行われる、請求項 3 5 1 ~ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 3 6 4】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖は、約 2 2 日間以下で行われる、請求項 3 5 1 ~ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 3 6 5】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖は、約 2 1 日間以下で行われる、請求項 3 5 1 ~ 3 5 6 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 3 6 6】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( NSCLC )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( HNSCC ) を含む )、神経膠芽腫 ( GBM を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 3 5 4 ~ 3 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 3 6 7】

前記がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫 ( GBM を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 3 6 6 に記載の方法。

20

## 【請求項 3 6 8】

前記がんが、黒色腫である、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 6 9】

前記がんが、HNSCCである、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 7 0】

前記がんが、子宮頸癌である、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 7 1】

前記がんが、NSCLCである、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 7 2】

前記がんが、神経膠芽腫 ( GBM を含む ) である、請求項 3 6 6 に記載の方法。

30

## 【請求項 3 7 3】

前記がんが、胃腸癌である、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 7 4】

前記がんが、超異変型癌である、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 7 5】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項 3 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 7 6】

腫瘍浸潤リンパ球 ( TIL ) を治療用 TIL 集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

( a ) 第 2 の TIL 集団を産生するために、IL - 2、及び任意に OKT - 3、及び抗原提示細胞 ( APC ) を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の TIL 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の TIL 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

40

( b ) 第 3 の TIL 集団を産生するために、前記第 2 の TIL 集団の前記細胞培養培地に、追加の IL - 2、任意に OKT - 3、及び APC を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の TIL 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任

50

意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、 I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

10

( d ) ステップ ( c ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

【請求項 377】

治療用の浸潤性リンパ球 ( T I L ) 集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) 組成物であって、前記 T I L 組成物は、

20

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

30

( c ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、 I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

40

( d ) ステップ ( c ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む方法により産生される、前記 T I L 組成物。

【請求項 378】

50

前記 T I L 組成物が凍結保存された組成物であり、前記方法が、( f ) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ ( e ) からの採取された前記 T I L 集団を含む前記輸液バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項 3 7 7 に記載の T I L 組成物。

【請求項 3 7 9】

がん罹患した対象を治療するための方法であって、増殖した腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を投与することを含む前記方法は、

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 前記第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、前記第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) の前記輸液バッグから治療有効用量の前記第 3 の T I L 集団を前記対象に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 3 8 0】

ステップ ( a ) で培養する前に、前記腫瘍サンプルを、前記第 1 の T I L 集団を含む複数の腫瘍断片に断片化させる、請求項 3 7 6 ~ 3 7 9 の方法。

【請求項 3 8 1】

ステップ ( a ) で培養する前に、前記腫瘍サンプルを、消化して前記第 1 の T I L 集団を含む消化腫瘍を産生する、請求項 3 7 6 ~ 3 7 9 の方法。

【請求項 3 8 2】

前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングが約 6 ~ 8 日間行われる、請求項 3 7 6 ~ 3 8 1 に記載の方法。

【請求項 3 8 3】

前記急速な第 2 の増殖が約 2 ~ 4 日間行われる、請求項 3 7 6 ~ 3 8 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8 4】

前記第 3 の増殖がそれぞれ約 5 ~ 7 日間行われる、請求項 3 7 6 ~ 3 8 1 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

## 【請求項 385】

前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングが約7日間行われ、前記急速な第2の増殖が約3日間行われ、前記第3の増殖が約6日間行われる、請求項376～381に記載の方法。

## 【請求項 386】

ステップ(a)～(c)が約14～18日間で行われる、請求項376～381のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 387】

ステップ(a)～(c)が約16日間で行われる、請求項376～381のいずれかに記載の方法。 10

## 【請求項 388】

ステップ(a)～(c)が約18日間で行われる、請求項376～381のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 389】

ステップ(a)～(c)が約16日間以下で行われる、請求項376～381のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 390】

ステップ(c)が、前記第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を、約 $2 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>の播種密度で、第3のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む、請求項376～381に記載の方法。 20

## 【請求項 391】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、神経膠芽腫(GBMを含む)、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項379～390に記載の方法。

## 【請求項 392】

前記がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫(GBMを含む)、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 393】

前記がんが、黒色腫である、請求項391に記載の方法。 30

## 【請求項 394】

前記がんが、HNSCCである、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 395】

前記がんが、子宮頸癌である、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 396】

前記がんが、NSCLCである、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 397】

前記がんが、神経膠芽腫(GBMを含む)である、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 398】

前記がんが、胃腸癌である、請求項391に記載の方法。 40

## 【請求項 399】

前記がんが、超異変型癌である、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 400】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項391に記載の方法。

## 【請求項 401】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖するための方法であって、前記方法は、

(a)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第1のTIL集団を含 50

む腫瘍サンプルを培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、前記第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第1の増殖または前記第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(b) 第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、前記第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(a)からステップ(b)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

(c) 前記第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することによって、前記第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、前記第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第3の増殖を実施することと、

(d) ステップ(f)から得られた、前記第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(e) ステップ(d)から採取された前記TIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことによって、ステップ(d)から(e)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む、前記方法。

#### 【請求項402】

治療用の浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物であって、前記TIL組成物は、

(a) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第1のTIL集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、前記第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第1の増殖または前記第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、前記第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(b) 第3のTIL集団を産生するために、前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、前記第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、前記第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(a)からステップ(b)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第2の増殖を実施することと、

(c) 前記第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することによって、前記第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、前記第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記シ

10

20

30

40

50

システムを開くことなく行われる、前記第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( f ) から得られた、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、を含む方法により産生される、前記 T I L 組成物。

【請求項 4 0 3】

前記 T I L 組成物が凍結保存された組成物であり、前記方法が、( f ) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ ( e ) からの採取された前記 T I L 集団を含む前記輸液バッグを凍結保存することをさらに含む、請求項 4 0 2 に記載の方法。

【請求項 4 0 4】

がんに罹患した対象を治療するための方法であって、増殖した腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を投与することを含む前記方法は、

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、前記第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、前記第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、前記第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( f ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された前記 T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、前記システムを開くことなく行われる、前記輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) の前記輸液バッグから治療有効用量の前記第 3 の T I L 集団を前記対象に投与することと、を含む、前記方法。

【請求項 4 0 5】

ステップ ( a ) で培養する前に、前記腫瘍サンプルを、前記第 1 の T I L 集団を含む複数の腫瘍断片に断片化させる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 4 の方法。

【請求項 4 0 6】

ステップ ( a ) で培養する前に、前記腫瘍サンプルを、消化して前記第 1 の T I L 集団

10

20

30

40

50

を含む消化腫瘍を産生する、請求項 4 0 1 ~ 4 0 4 の方法。

【請求項 4 0 7】

前記第 1 の増殖または前記第 1 の増殖のプライミングが約 6 ~ 8 日間行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0 8】

前記急速な第 2 の増殖が約 6 ~ 8 日間行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 0 9】

前記第 3 の増殖が約 6 ~ 8 日間行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 4 1 0】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖が、約 1 8 ~ 2 4 日間で行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1 1】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖が、約 2 0 ~ 2 2 日間で行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1 2】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖が、約 2 1 日間で行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 4 1 3】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖が、約 2 4 日間以下で行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1 4】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖が、約 2 2 日間以下で行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1 5】

前記第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミング、前記急速な第 2 の増殖、及び前記第 3 の増殖が、約 2 1 日間以下で行われる、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 4 1 6】

ステップ (c) が、前記第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む、請求項 4 0 1 ~ 4 0 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1 7】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される、請求項 4 0 4 ~ 4 1 6 に記載の方法。

40

【請求項 4 1 8】

前記がんが、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 9】

前記がんが、黒色腫である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 0】

前記がんが、H N S C C である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 1】

50

前記がんが、子宮頸癌である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 2】

前記がんが、NSCLCである、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 3】

前記がんが、神経膠芽腫（GBMを含む）である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 4】

前記がんが、胃腸癌である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 5】

前記がんが、超異変型癌である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 6】

前記がんが、小児超異変型癌である、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年5月4日出願の米国仮特許出願第63/019,917号、2020年5月12日出願の米国仮特許出願第63/023,666号、2021年2月5日出願の米国仮特許出願第63/146,405号、2021年3月17日出願の米国仮特許出願第63/162,441号に対する優先権を主張し、その開示内容はすべての目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の養子移入を使用した巨大で難治性のがんの治療は、予後不良の患者に対する強力な治療法である。Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393。免疫療法を成功させるには多数のTILが必要であり、商品化には堅牢で信頼性の高いプロセスが必要である。これは、細胞増殖に関する技術的、物流的、及び規制上の問題のため、達成するのが困難となっている。IL-2ベースのTIL増殖とそれに続く「急速増殖プロセス」（REP）は、その速度と効率から、TIL増殖の推奨される方法となった。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では、14日間でTILを1,000倍に増殖させることができるが、多くの場合、フィーダー細胞として複数のドナーから、大過剰の（例えば、200倍の）照射された同種異系末梢血単核細胞（PBMC、単核細胞（MNC）としても知られる）及び抗CD3抗体（OKT3）、ならびに高用量のIL-2を必要とする。Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。REP手順を受けたTILは、メラノーマ患者の宿主免疫抑制後の効果的な養子細胞療法を生み出した。現在の輸液許容パラメータは、TILの組成の読み取り値（例えば、CD28、CD8、またはCD4陽性）、及びREP産物の増殖倍率及び生存率に依存している。

【0003】

現在のTIL製造プロセスは、長さ、コスト、無菌性の問題、及び本明細書に記載されている他の要因によって制限されている。製造における費用対効果及びスケラビリティが改善され、複数の臨床センターでヒト患者を治療するために作製されたTIL調製のより強力な抗癌表現型を特徴とする、TIL製造プロセスとそのようなプロセスに基づく治療法を提供することが急務である。本発明は、従来のPREP増殖プロセスではなく、増殖のためにTILをプライミングするために、増殖の開始から抗原提示フィーダー細胞を含む新規のTIL増殖プロセスを提供し、増殖プロセスの全体的な時間の短縮を可能す

10

20

30

40

50

ることによってこの必要性を満たす。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、TILを増殖させ、治療用TIL集団を産生するための、改善された及び/または短縮された方法を提供する。

【0005】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(a) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、

(b) 第1のTIL集団を第1のTIL細胞培養物中に培養することによって、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1のTIL細胞培養物は、第1細胞培養培地と、IL-2と、

i) 抗原提示フィーダー細胞(APC)の第1の培養物から得た第1の培養上清であって、OKT-3を含む第1の培養上清、または

ii) APC及びOKT-3のいずれかと、を含み、

第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、第1のTIL細胞培養物を第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で、約1~7または8日間の第1の期間培養することによって行われ、第2のTIL集団は、第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングを実施することと、

(c) 第2のTIL細胞培養物を形成するために、第1のTIL細胞培養物を補充することによる急速な第2の増殖を実施することであって、補充は、追加の第1の細胞培養培地と、IL-2と、

i) 第2のAPCの培養物から得た第2の培養上清であって、OKT-3を含む第2の培養上清、または

ii) APC及びOKT-3、のいずれかと、により、

急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、第2のTIL細胞培養物を約1~11日間の第2の期間培養することによって行われ、第3のTIL集団は、TILの治療用集団であり、第1のTIL細胞培養物は、第1の培養上清及びAPCの両方を含まず、第2のTIL細胞培養物は、第2の培養上清及び補足のAPCの両方を含まず、第1の細胞培養物はAPCを含まないか、及び/または、第1の細胞培養物は補足のAPCを含まないかのいずれかである、急速な第2の増殖を実施することと、

(d) ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、

(e) ステップ(d)から採取したTIL集団を輸液バッグに移すことと、を含む。

【0006】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ(b)の第1の増殖のプライミングにおいて、第1のTIL細胞培養物は第1の培養上清を含み、ステップ(c)の急速な第2の増殖において、第1のTIL細胞培養物はOKT-3及びAPCが補充され、第2のTIL細胞培養物を形成する。

【0007】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ(b)の第1の増殖のプライミングにおいて、第1のTIL細胞培養物はOKT-3及びAPCを含み、ステップ(c)の急速な第2の増殖において、第1のTIL細胞培養物は第2の培養上清が補充され、第2のTIL細胞培養物を形成する。

【0008】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ(b)の第1の増殖のプライミングにおいて、第1のTIL細胞培養物は第1の培養上清を含み、ステップ(c)の急速な第2の増殖において、第1のTIL細胞培養物は第2の培養上清が補充され、第2のTIL細胞培養物を形成する。

【0009】

10

20

30

40

50

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ ( b ) で使用するための第 1 の培養上清を得ることは、

- 1) IL - 2 及び OKT - 3 を含む APC 細胞培養培地を提供することと、
- 2) 1) からの APC 細胞培養培地中で少なくとも約  $5 \times 10^8$  個の APC を約 3 ~ 4 日間培養して、第 1 の培養上清を生成することと、
- 3) 2) の細胞培養物から第 1 の培養上清を収集することと、を含む。

【 0 0 1 0 】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ ( c ) で使用するための第 2 の培養上清を得ることは、

- 1) IL - 2 及び OKT - 3 を含む APC 細胞培養培地を提供することと、
- 2) 1) からの APC 細胞培養培地中で少なくとも約  $1 \times 10^7$  個の APC を約 3 ~ 4 日間培養して、第 2 の培養上清を生成することと、
- 3) 2) の細胞培養物から第 2 の培養上清を収集することと、を含む。

10

【 0 0 1 1 】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ ( c ) の急速な第 2 の増殖は、

- i) ステップ ( c ) における第 2 の期間の開始から約 3 または 4 日後に、第 2 の T I L 細胞培養物に追加の IL - 2 を補充するステップをさらに含む。

【 0 0 1 2 】

本方法のいくつかの実施形態では、APC は対象にとって外因性である。

【 0 0 1 3 】

本方法のいくつかの実施形態では、APC は末梢血単核細胞 ( P B M C ) である。

20

【 0 0 1 4 】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ ( c ) の急速な第 2 の増殖は、

- i) 第 2 の期間の開始後、または約 3 または 4 日後に、第 2 の T I L 細胞培養物を第 1 の容器から複数の第 2 の容器に移して、複数の第 2 の容器のそれぞれにおいて第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を形成するステップと、
- ii) 第 2 の期間の残りの間、複数の第 2 の容器のそれぞれにおいて第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を培養するステップと、をさらに含む。

【 0 0 1 5 】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ i ) において、等量の第 2 の T I L 細胞培養物が複数の第 2 の容器に移される。

30

【 0 0 1 6 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 2 の容器のそれぞれは、第 1 の容器のサイズと等しい。

【 0 0 1 7 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 2 の容器のそれぞれは、第 1 の容器よりも大きい。

【 0 0 1 8 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 2 の容器のサイズが等しい。

【 0 0 1 9 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 2 の容器は、第 1 の容器よりも大きい。

40

【 0 0 2 0 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 2 の容器は、第 1 の容器よりも小さい。

【 0 0 2 1 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 1 の容器は G - R e x 1 0 0 フラスコである。

【 0 0 2 2 】

本方法のいくつかの実施形態では、第 1 の容器は G - R e x 1 0 0 フラスコであり、複数の第 2 の容器のそれぞれは G - R e x 1 0 0 フラスコである。

【 0 0 2 3 】

本方法のいくつかの実施形態では、複数の第 2 の容器は、2、3、4、5、6、7、8

50

、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20個の第2の容器からなる群から選択される。

【0024】

本方法のいくつかの実施形態では、複数の第2の容器は5つの第2の容器である。

【0025】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ i i ) の前に、方法は、第2の T I L 細胞培養物の各継代培養物に追加の I L - 2 を補充するステップをさらに含む。

【0026】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ i i ) の前に、方法は、第2の T I L 細胞培養物の各継代培養物に第2の細胞培養培地及び I L - 2 を補充するステップをさらに含む。

10

【0027】

本方法のいくつかの実施形態では、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地が同じである。

【0028】

本方法のいくつかの実施形態では、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地が異なる。

【0029】

本方法のいくつかの実施形態では、第1の細胞培養培地が D M 1 であり、第2の細胞培養培地が D M 2 である。

20

【0030】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を治療用 T I L 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

( a ) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第1の T I L 集団を得る及び / または受け取ることと、

( b ) 第2の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、任意に O K T - 3、ならびに、任意に抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第1の培養物からの培養上清のいずれかを含有細胞培養培地中に、第1の T I L 集団を培養することによって、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、第2の T I L 集団を得るために約 1 ~ 7 / 8 日の第1の期間実施され、第2の T I L 集団の数は、第1の T I L 集団の数よりも多い、プライミングを実施することと、

30

( c ) 第3の T I L 集団を産生するために、 T I L の第2集団の細胞培養培地に追加の I L - 2、任意に O K T - 3、ならびに、抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第2の培養物のいずれかを培養上清に補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖で添加される A P C の数は、ステップ ( b ) で添加される A P C の数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖は、第3の T I L 集団を得るために約 1 ~ 11 日の第2の期間行われ、第3の T I L 集団は、治療的 T I L 集団であり、急速な第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 T I L 集団を採取することと、

40

( e ) ステップ ( d ) から採取した T I L 集団を輸液バッグに移すことと、を含む。

【0031】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を治療用 T I L 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

( a ) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第1の T I L 集団を得る及び / または受け取ることと、

( b ) 第2の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、任意に O K T - 3、ならびに、任意に抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第1の培養物からの培養上清のいずれかを含有細胞培養培地中に、第1の T I L 集団を培養することによって、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、

50

第2のTIL集団を得るために約1～7/8日の第1の期間実施され、第2のTIL集団の数は、第1にTIL集団の数よりも多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、

(c) 第3のTIL集団を産生するために、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/またはOKT-3を含むAPCの第2の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地と、第2のTIL集団とを接触させることによって、急速な第2の増殖を実施することと、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～11日の第2の期間実施され、第3のTIL集団は、治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、

(d) ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

10

#### 【0032】

いくつかの実施形態では、「得ること」とは、方法及び/またはプロセスで用いられるTILが、方法及び/またはプロセスステップの一部として、サンプル(外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはその他からのサンプルを含む)に直接由来するものであり得ることを示す。いくつかの実施形態では、「受け取ること」とは、方法及び/またはプロセスで用いられるTILが、方法及び/または、プロセスステップの一部として、サンプル(外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはその他からのサンプルを含む)に間接的に由来し、次いで、方法及び/またはプロセスに用いられ得ることを示す(例えば、ステップ(a)が、ステップ(a)には含まれない別個のプロセスによってサンプルに由来するTILを用いて開始される場合、そのようなTILは「受け取られた」と称される)。

20

#### 【0033】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ(b)において、細胞培養培地は抗原提示細胞(APC)をさらに含み、ステップ(c)における培養培地中のAPCの数は、ステップ(b)における培養培地中のAPCの数よりも多い。

#### 【0034】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(a) 第2のTIL集団を産生するために、第1のTIL集団を培養することによって、第1の増殖のプライミングを実施することと、当該第1のTIL集団は、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/またはOKT-3を含むAPCの第1の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中で、対象の腫瘍から切除された腫瘍サンプルを、複数の腫瘍断片にプロセスすることによって得ることが可能であり、第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約1～7/8日の第1の期間実施され、第2のTIL集団の数は、第1にTIL集団の数よりも多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、

30

(b) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団を、追加のIL-2、任意にOKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞(APC)及び/またはOKT-3を含むAPCの第2の培養物からの培養上清のいずれかを含む第2のTIL集団の細胞培養培地と、接触させることによって、急速な第2の増殖を実施することと、急速な第2の増殖中のAPCの数はステップ(a)におけるAPCの少なくとも2倍の数であり、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～11日の第2の期間実施され、第3のTIL集団は、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

40

(c) ステップ(b)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

#### 【0035】

本発明はまた、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(a) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、任意にOKT-3、ならびに、

50

任意に抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第 1 の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、第 1 の T I L 集団を培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することによって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために約 1 ~ 7 / 8 日の第 1 の期間実施され、第 2 の T I L 集団の数は、第 1 に T I L 集団の数よりも多い、第 1 の増殖のプライミングを実施することと

、  
 ( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、任意に O K T - 3、ならびに、任意に抗原提示細胞 ( A P C ) 及び / または O K T - 3 を含む A P C の第 2 の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地と、第 2 の T I L 集団とを接触させることによって、急速な第 2 の増殖を実施することによって、急速な第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために約 1 ~ 11 日の第 2 の期間実施され、第 3 の T I L 集団は、治療用 T I L 集団である、急速な第 2 の増殖を実施することと、

10

( c ) ステップ ( b ) から得られた治療用 T I L 集団を採取することと、を含む。

【 0 0 3 6 】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ ( a ) において、細胞培養培地は抗原提示細胞 ( A P C ) をさらに含み、ステップ ( c ) における培養培地中の A P C の数は、ステップ ( b ) における培養培地中の A P C の数よりも多い。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖中の A P C の数の第 1 の増殖のプライミングの A P C の数に対する比は、約 1 . 5 : 1 ~ 約 20 : 1 の範囲から選択される。

20

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖中の A P C の数の第 1 の増殖のプライミングの A P C の数に対する比は、約 1 . 5 : 1 ~ 約 10 : 1 の範囲にある。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖中の A P C の数の第 1 の増殖のプライミングの A P C の数に対する比は、約 2 : 1 ~ 約 5 : 1 の範囲にある。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖中の A P C の数の第 1 の増殖のプライミングの A P C の数に対する比は、約 2 : 1 ~ 約 3 : 1 の範囲にある。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖中の A P C の数の第 1 の増殖のプライミングの A P C の数に対する比は、約 2 : 1 である。

30

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングにおける A P C の数は、約  $1 . 0 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $4 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における A P C の数は、約  $2 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $7 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  の範囲から選択される。

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングにおける A P C の数は、約  $1 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における A P C の数は、約  $3 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $6 . 0 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  の範囲から選択される。

40

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングにおける A P C の数は、約  $2 . 0 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $3 . 0 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における A P C の数は、約  $4 . 0 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  ~ 約  $5 . 5 \times 10^6$  A P C /  $\text{cm}^2$  の範囲から選択される。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングにおける A P C の数は、約  $1 \times 10^8$  A P C ~ 約  $3 . 5 \times 10^8$  A P C の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における

50

A P C の数は、約  $3.5 \times 10^8$  A P C ~ 約  $1 \times 10^9$  A P C の範囲から選択される。

【0046】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおけるA P C の数は、約  $1.5 \times 10^8$  A P C ~ 約  $3 \times 10^8$  A P C の範囲から選択され、急速な第2の増殖におけるA P C の数は、約  $4 \times 10^8$  A P C ~ 約  $7.5 \times 10^8$  A P C の範囲から選択される。

【0047】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおけるA P C の数は、約  $2 \times 10^8$  A P C ~ 約  $2.5 \times 10^8$  A P C の範囲から選択され、急速な第2の増殖におけるA P C の数は、約  $4.5 \times 10^8$  A P C ~ 約  $5.5 \times 10^8$  A P C の範囲から選択される。

【0048】

いくつかの実施形態では、約  $2.5 \times 10^8$  のA P C を第1の増殖のプライミングに添加し、 $5 \times 10^8$  A P C を急速な第2の増殖に添加する。

【0049】

いくつかの実施形態では、第2のT I L 集団のT I L の数の、第1のT I L 集団のT I L の数に対する比は、約  $1.5 : 1$  ~ 約  $100 : 1$  である。

【0050】

いくつかの実施形態では、第2のT I L 集団のT I L の数の、第1のT I L 集団のT I L の数に対する比は、約  $50 : 1$  である。

【0051】

いくつかの実施形態では、第2のT I L 集団のT I L の数の、第1のT I L 集団のT I L の数に対する比は、約  $25 : 1$  である。

【0052】

いくつかの実施形態では、第2のT I L 集団のT I L の数の、第1のT I L 集団のT I L の数に対する比は、約  $20 : 1$  である。

【0053】

いくつかの実施形態では、第2のT I L 集団のT I L の数の、第1のT I L 集団のT I L の数に対する比は、約  $10 : 1$  である。

【0054】

いくつかの実施形態では、第2のT I L 集団の数は、第1のT I L 集団の数よりも少なくとも50倍多い。

【0055】

いくつかの実施形態では、方法は、治療用T I L 集団を収集するステップの後に、採取した治療用T I L 集団を輸液バッグに移す、追加のステップを含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、複数の腫瘍断片は複数の別々の容器に分配され、それぞれの別々の容器内で、第2のT I L 集団が、第1の増殖のプライミングのステップからの第1のT I L 集団から得られ、第3のT I L 集団が、急速な第2の増殖のステップにおける第2のT I L 集団から得られ、第3のT I L 集団から得られた治療的T I L 集団が、複数の容器のそれぞれから収集され、収集されたT I L 集団を得るために合わされる。

【0057】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、少なくとも2つの別個の容器を含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、少なくとも2 ~ 20個の別個の容器を含む。

【0059】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、少なくとも2 ~ 10個の別個の容器を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、少なくとも2 ~ 5個の別個の容器を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、別個の容器のそれぞれは、第 1 のガス透過性表面積を含む。

## 【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配される。

## 【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、単一の容器は、第 1 のガス透過性表面積を含む。

## 【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップは、細胞培養培地が抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、A P C は、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

10

## 【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、A P C は、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、A P C は、約 2 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップで、A P C は、約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖で、A P C は、約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

20

## 【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖で、A P C は、約 4 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、1 の増殖のプライミングが、第 1 のガス透過性表面積を含む第 1 の容器内で実行され、急速な第 2 の増殖ステップで、急速な第 2 の増殖ステップが、第 2 のガス透過性表面積を含む第 2 の容器内で実行される。

30

## 【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、第 2 の容器は第 1 の容器よりも大きい。

## 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップは、細胞培養培地が抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、A P C は、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、A P C は、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、A P C は、約 2 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積領域上に積層される。

40

## 【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖で、A P C は、約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の平均厚さで第 2 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖で、A P C は、約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の平均厚さで第 2 のガス透過性表面積領域上に積層される。

## 【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップで、A P C は、約 4 細胞層の平均

50

厚さで第 2 のガス透過性表面領域上に積層される。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングが第 1 の T I L 集団に対して行われる容器ごとに、係る第 1 の T I L 集団から生成された第 2 の T I L 集団に対して、急速な第 2 の増殖が同じ容器内で行われる。

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、それぞれの容器が、第 1 のガス透過性表面積を含む。

【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップは、細胞培養培地が抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、A P C は、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面領域上に積層される。

10

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、A P C は、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面領域上に積層される。

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで、A P C は、約 2 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面領域上に積層される。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップで、A P C は、約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面領域上に積層される。

20

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップで、A P C は、約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面領域上に積層される。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップで、A P C は、約 4 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面領域上に積層される。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップにおいて第 1 の増殖プライミングが第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、第 1 の容器は、第 1 の表面積を含み、細胞培養培地は抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、A P C は、第 1 のガス透過性表面領域上に積層され、第 1 の増殖のプライミングステップにおいて積層される A P C の平均層数の、急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 1 ~ 約 1 : 1 0 の範囲から選択される。

30

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 2 ~ 約 1 : 8 の範囲から選択される。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 3 ~ 約 1 : 7 の範囲から選択される。

40

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 4 ~ 約 1 : 6 の範囲から選択される。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップで積層される A P C の平均層数の、急速な第 2 の増殖ステップにおいて積層される A P C の平均層数に対する比は、約 1 : 1 . 5 ~ 約 1 : 5 の範囲から選択される。

【 0 0 9 1 】

50

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップで積層されるAPCの平均層数の、急速な第2の増殖ステップにおいて積層されるAPCの平均層数に対する比は、約1:1.6~約1:4の範囲から選択される。

【0092】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップで積層されるAPCの平均層数の、急速な第2の増殖ステップにおいて積層されるAPCの平均層数に対する比は、約1:1.7~約1:3.5の範囲から選択される。

【0093】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップで積層されるAPCの平均層数の、急速な第2の増殖ステップにおいて積層されるAPCの平均層数に対する比は、約1:1.8~約1:3の範囲から選択される。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップで積層されるAPCの平均層数の、急速な第2の増殖ステップにおいて積層されるAPCの平均層数に対する比は、約1:1.9~約1:2.5の範囲から選択される。

【0095】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップで積層されるAPCの平均層数の、急速な第2の増殖ステップにおいて積層されるAPCの平均層数に対する比は、約1:2である。

【0096】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップで2~3日後、細胞培養培地に追加のIL-2を補充する。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、方法は、治療用TIL集団を収集するステップにおいて、凍結保存プロセスを使用して収集されたTIL集団を凍結保存することをさらに含む。

【0098】

いくつかの実施形態では、方法は、輸液バッグを凍結保存するステップをさらに含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、凍結保存プロセスを、1:1の凍結保存メディアに採取されたTIL集団対凍結保存培地の比率を使用して実行する。

30

【0100】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は末梢血単核細胞(PBMC)である。

【0101】

いくつかの実施形態では、PBMCは照射され、同種異系である。

【0102】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップは、細胞培養培地が末梢血単核細胞(PBMC)を含み、第1の増殖のプライミングステップにおいて細胞培養培地に添加されるPBMCの総数は、約 $2.5 \times 10^8$ である。

【0103】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖ステップは、細胞培養培地中の抗原提示細胞(APC)は末梢血単核細胞(PBMC)であり、急速な第2の増殖ステップにおいて細胞培養培地に添加されるPBMCの総数は約 $5 \times 10^8$ である。

40

【0104】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は人工抗原提示細胞である。

【0105】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団を採取するステップにおける採取は、膜系細胞処理システムを使用して実施される。

【0106】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団を採取するステップにおける採取は、LOVO細胞処理システムを使用して実施される。

50

- 【 0 1 0 7 】  
いくつかの実施形態では、複数の断片は、第 1 の増殖のプライミングステップにおいて、容器当たり約 6 0 個の断片を含み、各断片は約 2 7 m m <sup>3</sup> の体積を有する。
- 【 0 1 0 8 】  
いくつかの実施形態では、複数の断片は、総体積が約 1 3 0 0 m m <sup>3</sup> ~ 約 1 5 0 0 m m <sup>3</sup> の約 3 0 ~ 約 6 0 の断片を含む。
- 【 0 1 0 9 】  
いくつかの実施形態では、複数の断片は、総体積が約 1 3 5 0 m m <sup>3</sup> の約 5 0 個の断片を含む。
- 【 0 1 1 0 】 10  
いくつかの実施形態では、複数の断片は、総質量が約 1 グラム ~ 約 1 . 5 グラムの約 5 0 個の断片を含む。
- 【 0 1 1 1 】  
いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、G 容器及び X u r i セルバッグからなる群から選択される容器で提供される。
- 【 0 1 1 2 】  
いくつかの実施形態では、I L - 2 濃度は約 1 0 , 0 0 0 I U / m L ~ 約 5 , 0 0 0 I U / m L である。
- 【 0 1 1 3 】 20  
いくつかの実施形態では、I L - 2 濃度は約 6 , 0 0 0 I U / m L である。
- 【 0 1 1 4 】  
いくつかの実施形態では、採取された治療用 T I L 集団を輸液バッグに移すステップにおける輸液バッグは、H y p o T h e r m o s o l 含有輸液バッグである。
- 【 0 1 1 5 】  
いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) を含む。
- 【 0 1 1 6 】  
いくつかの実施形態では、凍結保存媒体は、7 % ~ 1 0 % の D M S O を含む。
- 【 0 1 1 7 】 30  
いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップにおける第 1 の期間及び急速な第 2 の増殖ステップにおける第 2 の期間は、それぞれ、5 日、6 日、または 7 日の期間内に個別に実施される。
- 【 0 1 1 8 】  
いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップにおける第 1 の期間は、5 日、6 日、または 7 日の期間内に実施される。
- 【 0 1 1 9 】  
いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップにおける第 2 の期間は、7 日、8 日、または 9 日の期間内に実施される。
- 【 0 1 2 0 】 40  
いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップにおける第 1 の期間及び急速な第 2 の増殖ステップにおける第 2 の期間は、それぞれ、7 日の期間内に個別に実施される。
- 【 0 1 2 1 】  
いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップから治療用 T I L の集団の採取までは、約 1 4 日 ~ 約 1 6 日の期間内に実施される。
- 【 0 1 2 2 】  
いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップから治療用 T I L の集団の採取までは、約 1 5 日 ~ 約 1 6 日の期間内に実施される。
- 【 0 1 2 3 】 50  
いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップから治療用 T I L の集団

の採取までは、約 14 日の期間内に実施される。

【0124】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップから治療用 TIL の集団の採取までは、約 15 日の期間内に実施される。

【0125】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングステップから治療用 TIL の集団の採取までは、約 16 日の期間内に実施される。

【0126】

いくつかの実施形態では、方法は、凍結保存プロセスを使用して、収集された治療用 TIL の集団を凍結保存するステップをさらに含み、第 1 の増殖のプライミングステップから治療用 TIL の集団の収集及び凍結保存は、16 日以内に実施される。

10

【0127】

いくつかの実施形態では、治療用 TIL の集団を採取するステップで採取された治療用 TIL 集団は、TIL の治療上有効な用量に十分な TIL を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、治療上有効な用量に十分な TIL の数は、約  $2.3 \times 10^{10}$  ~ 約  $13.7 \times 10^{10}$  である。

【0129】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップにおける第 3 の TIL 集団は、効力の増大、インターフェロン 産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

20

【0130】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖ステップにおける第 3 の TIL 集団は、18 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 1 倍 ~ 5 倍以上のインターフェロン - ガンマ産生を提供する。

【0131】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増大ステップで第 3 の TIL 集団から得られた、エフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞は、第 1 の増殖のプライミングステップで、第 2 の TIL 集団から得られたエフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞と比較して、増加した CD8 及び CD28 発現を示す。

30

【0132】

いくつかの実施形態では、治療用 TIL 集団を採取するステップからの治療用 TIL 集団は、患者に注入される。

【0133】

本発明はまた、癌を有する対象を治療するための方法を提供し、本方法は、増殖させた腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を投与することを含み、投与することは、

(a) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を得る及び / または受け取ることと、

(b) 第 2 の TIL 集団を産生するために、IL-2、任意に OKT-3、ならびに、任意に抗原提示細胞 (APC) 及び / または OKT-3 を含む APC の第 1 の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、第 1 の TIL 集団を培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の TIL 集団を得るために約 1 ~ 7 / 8 日の期間実施される、プライミングを実施することと

40

(c) 第 3 の TIL 集団を産生するために、TIL の第 2 集団の細胞培養培地に追加の IL-2、OKT-3、ならびに、抗原提示細胞 (APC) 及び / または OKT-3 を含む APC の第 2 の培養物のいずれかを培養上清に補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、急速な第 2 の増殖で添加される APC の数は、ステップ (b) で添加される APC の数の少なくとも 2 倍であり、急速な第 2 の増殖は、第 3 の TIL 集

50

団を得るために約 1 ~ 1 1 日間行われ、第 3 の T I L 集団は、治療的 T I L 集団であり、急速な第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 T I L 集団を採取することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取した T I L 集団を輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) からの T I L の治療有効用量を対象に投与することと、を含む。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、治療有効用量の投与に十分な T I L の数は、約  $2.3 \times 10^{10}$  ~ 約  $13.7 \times 10^{10}$  である。

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞 ( A P C ) は P B M C である。

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( f ) で治療有効用量の T I L 細胞を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが患者に投与されている。

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、シクロホスファミドを  $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  を 2 日間、次いでフルダラピンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  を 5 日間投与するステップを含む。

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では、方法は、ステップ ( f ) における患者への T I L 細胞の投与の翌日から開始される、高用量 I L - 2 レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、高用量 I L - 2 レジメンは、 $600,000$  または  $720,000 \text{ IU} / \text{kg}$ 、寛容になるまで 8 時間ごとに 15 分間の静脈内ボラス注入として投与される。

【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( b ) における第 3 の T I L 集団は、効力の増大、インターフェロン 産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) における第 3 の T I L 集団は、16 日より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍 ~ 5 倍以上のインターフェロン 産生を提供する。

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) で第 3 の T I L 集団から得られた、エフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞は、ステップ ( b ) で、第 2 の集団から得られたエフェクター T 細胞及び / またはセントラルメモリー T 細胞と比較して、増加した C D 8 及び C D 2 8 発現を示す。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。

【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

【 0 1 4 5 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される。

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態では、がんは、HNSCCである。

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施形態では、がんは、NSCLCである。

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫（GBMを含む）である。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

10

【 0 1 5 2 】

いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施形態では、容器は、密閉容器である。

【 0 1 5 5 】

いくつかの実施形態では、容器は、G - 容器である。

【 0 1 5 6 】

いくつかの実施形態では、容器は、GREX - 10である。

20

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施形態では、密閉容器は、GREX - 100を含む。

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態では、密閉容器は、GREX - 500を含む。

【 0 1 5 9 】

本発明はまた、本明細書に開示される方法によって作製された、治療用腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を提供する。

【 0 1 6 0 】

本発明はまた、患者の腫瘍組織から調製された、治療用腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を提供し、治療用TIL集団は、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び/またはポリクロナリティの増加をもたらす。

30

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療用TIL集団は、インターフェロン - ガンマ産生の増加をもたらす。

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療用TIL集団は、ポリクロナリティの増加をもたらす。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される治療用TIL集団は、効力の増大をもたらす。

40

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用TIL集団は、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用TIL集団は、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも2倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 6 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用TIL集団は、16日より長いプロ

50

セスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 6 7 】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の集団を提供し、治療用 T I L 集団は、抗原提示細胞 ( A P C ) を追加せずに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 6 8 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用 T I L 集団は、A P C を追加せずに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

10

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用 T I L 集団は、A P C を追加せずに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 7 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の集団を提供し、治療用 T I L 集団は、抗原提示細胞 O K T 3 を追加せずに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

20

【 0 1 7 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用 T I L 集団は、O K T 3 を追加せずに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用 T I L 集団は、O K T 3 を追加せずに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 7 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の集団を提供し、治療用 T I L 集団は、抗原提示細胞 ( A P C ) の追加及び O K T 3 の追加なしに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

30

【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用 T I L 集団は、抗原提示細胞 ( A P C ) の追加及び O K T 3 の追加なしに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療用 T I L 集団は、抗原提示細胞 ( A P C ) の追加及び O K T 3 の追加なしに T I L の第 1 の増殖を実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である。

40

【 0 1 7 6 】

本発明はまた、本明細書に記載の治療用 T I L 集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物を提供する。

【 0 1 7 7 】

本発明はまた、本明細書に記載される T I L 組成物を含む無菌輸液バッグを提供する。

【 0 1 7 8 】

本発明はまた、本明細書に記載の治療用 T I L 集団の凍結保存調製物を提供する。

50

## 【0179】

本発明はまた、本明細書に記載の治療用 T I L 集団及び凍結保存培地を含む腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物を提供する。

## 【0180】

いくつかの実施形態では、凍結保存培地は D M S O を含む。

## 【0181】

いくつかの実施形態では、凍結保存媒体は、7% ~ 10% の D M S O を含む。

## 【0182】

本発明はまた、本明細書に記載の T I L 組成物の凍結保存調製物を提供する。

## 【0183】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物は、医薬品として使用するためのものである。

## 【0184】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物は、がんの治療に使用するためのものである。

## 【0185】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物は、固形腫瘍癌の治療に使用するためのものである。

## 【0186】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物は、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択されるがんの治療に使用するためのものである。

## 【0187】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物は、黒色腫、H N S C C、子宮頸がん、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択されるがんの治療に使用するためのものである。

## 【0188】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、黒色腫である。

## 【0189】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、H N S C C である。

## 【0190】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、子宮頸癌である。

## 【0191】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、N S C L C である。

## 【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) である。

## 【0193】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、胃腸癌である。

## 【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、超変異型癌である。

## 【0195】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 組成物は、がんの治療に使用するためのものであり、がんは、小児超変異型癌である。

【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) 組成物の、治療有効量の T I L 組成物を対象に投与することを含む、対象における癌を治療する方法における使用を提供する。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、H N S C C である。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。いくつかの実施形態では、がんは、N S C L C である。いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) である。いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

10

【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) 組成物は、治療有効量の T I L 組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法で使用するためのものである。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される。

20

【 0 1 9 8 】

本発明はまた、治療有効用量の本明細書に記載の腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) 組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法を提供する。

30

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍である。

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

【 0 2 0 1 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、H N S C C である。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。いくつかの実施形態では、がんは、N S C L C である。いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) である。いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

40

【 0 2 0 2 】

本発明はまた、T細胞を増殖させる方法を提供し、本方法は、

( a ) 第 1 の T 細胞集団の増殖をもたらし、かつ活性をプライミングするために、第 1 の T 細胞集団を培養することによって、ドナーから得られた第 1 の T 細胞集団の第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

50

(b) ステップ (a) でプライミングされた第 1 の T 細胞集団の活性化が崩壊し始めた後、第 2 の T 細胞集団を得るために、第 1 の T 細胞集団を培養して増殖をもたらし、かつ第 1 の T 細胞集団の活性化を増大させることにより、第 1 の T 細胞集団の急速な第 2 の増殖を実施することと、

(c) 第 2 の T 細胞集団を採取することと、を含む。

【0203】

いくつかの実施形態では、ステップ (a) の第 1 の増殖のプライミングは、最大 7 日間にわたって実施される。

【0204】

いくつかの実施形態では、ステップ (b) の急速な第 2 の増殖は、最大 11 日間にわたって実施される。 10

【0205】

いくつかの実施形態では、ステップ (b) の急速な第 2 の増殖は、最大 9 日間にわたって実施される。

【0206】

いくつかの実施形態では、ステップ (a) の第 1 の増殖のプライミングは 7 日間実施され、ステップ (b) の急速な第 2 の増殖は 9 日間実施される。

【0207】

いくつかの実施形態では、ステップ (a) の第 1 の増殖のプライミングは、最大 8 日間にわたって実施される。 20

【0208】

いくつかの実施形態では、ステップ (b) の急速な第 2 の増殖は、最大 8 日間にわたって実施される。

【0209】

いくつかの実施形態では、ステップ (a) の第 1 の増殖のプライミングは 8 日間実施され、ステップ (b) の急速な第 2 の増殖は 8 日間実施される。

【0210】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ (a) において、第 1 の T 細胞集団は、OKT-3 及び IL-2 を含む第 1 の培養培地で培養される。

【0211】

いくつかの実施形態では、第 1 の培養培地は、OKT-3、IL-2 及び抗原提示細胞 (APC) を含む。 30

【0212】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ (b) において、第 1 の T 細胞の集団は、OKT-3、IL-2、及び抗原提示細胞 (APC) を含む第 2 の培養培地で培養される。

【0213】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ (a) において、第 1 の T 細胞の集団は、第 1 のガス透過性表面を含む容器内の第 1 の培養培地中で培養され、第 1 の培養培地は、任意に OKT-3、IL-2 及び任意で、第 1 の抗原提示細胞 (APC) 集団または OKT-3 を含む第 1 の APC 培養物からの培養上清を含み、第 1 の APC 集団は、第 1 の T 細胞集団にとって外因性であり、第 1 の APC 集団は、第 1 のガス透過性表面上に積層され、ステップ (b) において、第 1 の T 細胞集団は、容器内の第 2 の培養培地中で培養され、第 2 の培養培地は、OKT-3、IL-2 及び第 2 の APC 集団、または OKT-3 を含む第 2 の APC 培養物からの培養上清を含み、第 2 の APC 集団は、第 1 の T 細胞集団のドナーにとって外因性であり、第 2 の APC 集団は、第 1 のガス透過性表面上に積層され、第 2 の APC 集団は、第 1 の APC 集団よりも多い。 40

【0214】

いくつかの実施形態では、第 2 の APC 集団の APC の数の、第 1 の APC 集団の APC の数に対する比は、約 2 : 1 である。 50

## 【0215】

いくつかの実施形態では、第1のAPC集団中のAPCの数は約 $2.5 \times 10^8$ であり、第2のAPC集団中のAPCの数は約 $5 \times 10^8$ である。

## 【0216】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、APCの2層の平均厚さで第1のガス透過性表面上に積層される。

## 【0217】

本方法のいくつかの実施形態では、ステップ(b)において、第2のAPC集団が、APCの4~8層の範囲から選択される平均厚さで第1のガス透過性表面上に積層される。

## 【0218】

いくつかの実施形態では、ステップ(b)で第1のガス透過性表面上に積層されたAPCの層の平均数の、ステップ(a)で第1のガス透過性表面上に積層されたAPCの層の平均数に対する比は、2:1である。

10

## 【0219】

いくつかの実施形態では、APCは末梢血単核細胞(PBMC)である。

## 【0220】

いくつかの実施形態では、APCはPBMCを含み、PBMCは照射され、第1のT細胞集団のドナーにとって外因性である。

## 【0221】

いくつかの実施形態では、T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)である。

20

## 【0222】

いくつかの実施形態では、T細胞は、髄浸潤リンパ球(MIL)である。

## 【0223】

いくつかの実施形態では、T細胞は、末梢血リンパ球(PBL)である。

## 【0224】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、限定培地及び/または無血清培地である。

## 【0225】

いくつかの実施形態では、限定培地は、(任意に組換え)トランスフェリン、(任意に組換え)インスリン、及び(任意に組換え)アルブミンを含む。

## 【0226】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。

30

## 【0227】

いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion SFM、CTS(商標)AIM-V Medium、CTS(商標)AIM-V SFM、LymphoONE(商標)T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)、Minimal Essential Medium(MEM)、Basal Medium Eagle(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium(MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium(G-MEM)、RPMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumが含まれる。

40

## 【0228】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清置換物は、CTS(商標)Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement及びCTS(商標)Immune Cell Serum Replacementからなる群から選択される。

## 【0229】

50

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物を含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1つまたは複数のアミノ酸を含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物を含む。

10

【0233】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の抗生物質、及び1つまたは複数の微量元素を含む。

【0234】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、アルブミンを含む。

【0235】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。

20

【0236】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0237】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%の総血清置換物濃度(体積%)を含む。

30

【0238】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、総細胞培養培地量の約3%、約5%、または約10%の総血清置換物濃度を含む。

【0239】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度のグルタミン(すなわち、Glutamax(登録商標))をさらに含む。

【0240】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約2mMの濃度のグルタミン(すなわち、Glutamax(登録商標))をさらに含む。

40

【0241】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM~約100mM、35mM~約95mM、40mM~約90mM、45mM~約85mMまで、50mM~約80mM、55mM~約75mM、60mM~約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0242】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノール

50

ールをさらに含む。

【0243】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、国際PCT公開番号第WO/1998/030679号に記載される、限定培地を含む。

【0244】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約5~200mg/Lの範囲のグリシン、約5~250mg/Lの範囲のL-ヒスチジン、約5~300mg/Lの範囲のL-イソロイシン、約5~200mg/Lの範囲のL-メチオニン、約5~400mg/Lの範囲のL-フェニルアラニン、約1~1000mg/Lの範囲のL-プロリン、約1~45mg/Lの範囲のL-ヒドロキシプロリン、約1~250mg/Lの範囲のL-セリン、約10~500mg/Lの範囲のL-スレオニン、約2~110mg/Lの範囲のL-トリプトファン、約3~175mg/Lの範囲のL-チロシン、約5~500mg/Lの範囲のL-バリン、約1~20mg/Lの範囲のチアミン、約1~20mg/Lの範囲の還元型グルタチオン、約1~200mg/Lの範囲のL-アスコルビン酸-2-リン酸、約1~50mg/Lの範囲の鉄飽和トランスフェリン、約1~100mg/Lの範囲のインスリン、約0.000001~0.0001mg/Lの範囲の亜セレン酸ナトリウム、及び/または約5000~50,000mg/Lの範囲のアルブミン(例えばAlbuMAX(登録商標)I)を含む。

10

【0245】

いくつかの実施形態では、限定培地中に1つまたは複数の非微量元素部分成分を含む細胞培養培地は、本明細書に提供される表4の見出し「1X培地中の濃度範囲」の下の列に列挙される濃度範囲で存在する。

20

【0246】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地の容量オスモル濃度は、約260~350mOsmolである。

【0247】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3.7g/L、または約2.2g/Lの重炭酸ナトリウムをさらに含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、L-グルタミン(約2mMの最終濃度)、1つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸(NEAA;約100μMの最終濃度)、及び/または2-メルカプトエタノール(最終濃度約100μM)をさらに含む。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、第1及び/または第2のガス透過性容器中の細胞培養培地には、ベータ-メルカプトエタノール(BMEまたはME;2-メルカプトエタノール、CAS60-24-2としても知られている)が含まれていない。

【0250】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、CTS Optimizer T-Cell Expansion SFM、3%CTS Immune Cell Serum Replacement、55mMBME、及び任意でグルタミンを含む。

40

【0251】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion Supplementを補充したCTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium(26mL/L)、及び3%CTS(商標)Immune Cell SR、及び2mM Glutamaxを含み、任意に6,000IU/mLのIL-2をさらに含む。

【0252】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion Supplementを補充したCTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium

50

(26 mL/L)、及び3%CTS(商標)Immune Cell SR、及び2 mM Glutamaxを含み、任意に3,000 IU/mLのIL-2をさらに含む。

【0253】

いくつかの実施形態では、腫瘍サンプルは、対象における腫瘍の1つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検である。

【0254】

本発明はまた、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(i) IL-2を含む第1の細胞培養培地中で約3日間腫瘍サンプルを培養することによって、対象における腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルから第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、 10

(ii) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、OKT-3、ならびに、抗原提示細胞(APC)を含む、第2細胞培養培地中の第1のTIL集団を培養することによって第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面を含む容器中で実施され、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために約7または8日の第1の期間実施され、第2のTIL集団の数は第1のTIL集団の数よりも多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、

(iii) 第3のTIL集団を産生するために、TILの第2集団の第2の細胞培養培地に、追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数は、ステップ(iii)で添加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約11日の第2の期間実施され、第3のTIL集団は、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、急速な第2の増殖を実施することと、 20

(iv) ステップ(iii)から得られた治療用TIL集団を採取することと、

(v) ステップ(iv)から採取したTIL集団を輸液バッグに移すことと、を含む。

【0255】

本発明はまた、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(i) IL-2を含む第1の細胞培養培地中で約3日間腫瘍サンプルを培養することによって、対象における腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルから第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、 30

(ii) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む、第2細胞培養培地中の第1のTIL集団を培養することによって、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために約7または8日の第1の期間実施され、第2のTIL集団の数は第1のTIL集団の数よりも多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、

(iii) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第3の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約11日の第2の期間実施され、第3のTIL集団は、治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、 40

(iv) ステップ(iii)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【0256】

いくつかの実施形態では、第2期間の5日目の後、培養物を2つ以上の継代培養に分割し、各継代培養に追加量の第3培養培地を補充し、約6日間培養する。

【0257】

いくつかの実施形態では、第2期間の5日目に後、培養物を最大5つの継代培養に分割する。

## 【0258】

いくつかの実施形態では、方法のすべてのステップが約22日で完了する。

## 【0259】

本発明はまた、T細胞を増殖させる方法を提供し、本方法は、

(i) 第1のT細胞集団の増殖をもたらし、かつ活性をプライミングするために、ドナーの腫瘍の1つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルからの第1のT細胞集団の第1の増殖のプライミングを実施することと、

(ii) ステップ(a)でプライミングされた第1のT細胞集団の活性化が崩壊し始めた後、第2のT細胞集団を得るために、第1のT細胞集団を培養して増殖をもたらし、かつ第1のT細胞集団の活性を増大させることにより、第1のT細胞集団の急速な第2の増殖を実施することと、

(iv) 第2のT細胞集団を採取することと、を含む。

10

## 【0260】

いくつかの実施形態では、腫瘍サンプルは、複数のコア生検から得られる。

## 【0261】

いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のコア生検からなる群から選択される。

## 【0262】

本発明はまた、増殖させた腫瘍浸潤リンパ球(TIL)組成物を提供し、本組成物は、

i) 治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団、及び

20

ii) 任意に(任意に組換え)トランスフェリン、(任意に組換え)インスリン、及び(任意に組換え)アルブミンを含む、限定培地または無血清培地を含む。

## 【0263】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、(任意に組換え)トランスフェリン、(任意に組換え)インスリン、及び(任意に組換え)アルブミンを含む。

## 【0264】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。

## 【0265】

いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion SFM、CTS(商標)AIM-V Medium、CTS(商標)AIM-V SFM、LymphoONE(商標)T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)、Minimal Essential Medium(MEM)、Basal Medium Eagle(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium(MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium(G-MEM)、RPMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumが含まれるが、これらに限定

30

40

## 【0266】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清置換物は、CTS(商標)Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement及びCTS(商標)Immune Cell Serum Replacementからなる群から選択される。

## 【0267】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物を含む。

## 【0268】

50

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、1つまたは複数のアミノ酸を含む。

【0269】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物を含む。

【0270】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物を含む。

【0271】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の抗生物質、及び1つまたは複数の微量元素を含む。 10

【0272】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、アルブミンを含む。

【0273】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。 20

【0274】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0275】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、細胞培養培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%の総血清置換物濃度(体積%)を含む。 30

【0276】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、総細胞培養培地量の約3%、約5%、または約10%の総血清置換物濃度を含む。

【0277】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、約0.1 mM ~ 約10 mM、0.5 mM ~ 約9 mM、1 mM ~ 約8 mM、2 mM ~ 約7 mM、3 mM ~ 約6 mM、または4 mM ~ 約5 mMの濃度のグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))をさらに含む。

【0278】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、約2 mMの濃度のグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))をさらに含む。 40

【0279】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、約5 mM ~ 約150 mM、10 mM ~ 約140 mM、15 mM ~ 約130 mM、20 mM ~ 約120 mM、25 mM ~ 約110 mM、30 mM ~ 約100 mM、35 mM ~ 約95 mM、40 mM ~ 約90 mM、45 mM ~ 約85 mMまで、50 mM ~ 約80 mM、55 mM ~ 約75 mM、60 mM ~ 約70 mM、または約65 mMの濃度で2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0280】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、約55 mMの濃度で2-メル 50

カプトエタノールをさらに含む。

【0281】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、国際PCT公開番号第WO/1998/030679号に記載される、限定培地を含む。

【0282】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、約5~200mg/Lの範囲のグリシン、約5~250mg/Lの範囲のL-ヒスチジン、約5~300mg/Lの範囲のL-イソロイシン、約5~200mg/Lの範囲のL-メチオニン、約5~400mg/Lの範囲のL-フェニルアラニン、約1~1000mg/Lの範囲のL-プロリン、約1~45mg/Lの範囲のL-ヒドロキシプロリン、約1~250mg/Lの範囲のL-セリン、約10~500mg/Lの範囲のL-スレオニン、約2~110mg/Lの範囲のL-トリプトファン、約3~175mg/Lの範囲のL-チロシン、約5~500mg/Lの範囲のL-バリン、約1~20のmg/L範囲のチアミン、約1~20mg/Lの範囲の還元型グルタチオン、約1~200mg/Lの範囲のL-アスコルビン酸-2-リン酸、約1~50mg/Lの範囲の鉄飽和トランスフェリン、約1~100mg/Lの範囲のインスリン、約0.000001~0.0001mg/Lの範囲の亜セレン酸ナトリウム、及び/または約5000~50,000mg/Lの範囲のアルブミン(例えば、AlbumAX(登録商標)I)を含む。

【0283】

いくつかの実施形態では、限定培地中に1つまたは複数の非微量元素部分成分を含む限定培地または無血清培地は、本明細書に提供される表4の見出し「1X培地中の濃度範囲」の下の列に列挙される濃度範囲で存在する。

【0284】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地の容量オスモル濃度は、約260~350mOsmolである。

【0285】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、約3.7g/L、または約2.2g/Lの重炭酸ナトリウムをさらに含む。

【0286】

いくつかの実施形態では、限定培地または無血清培地は、L-グルタミン(約2mMの最終濃度)、1つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸(NEAA;約100µMの最終濃度)、及び/または2-メルカプトエタノール(最終濃度約100µM)をさらに含む。

【0287】

いくつかの実施形態では、第1及び/または第2のガス透過性容器中の限定培地または無血清培地には、ベータ-メルカプトエタノール(BMEまたはME;2-メルカプトエタノール、CAS60-24-2としても知られている)が含まれていない。

【0288】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、CTS OpTmizer T-Cell Expansion SFM、3% CTS Immune Cell Serum Replacement、55mM BME、及び任意にグルタミンを含む。

【0289】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、CTS(商標)OpTmizer(商標)T-cell Expansion Supplementを補充したCTS(商標)OpTmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium(26mL/L)、及び3%CTS(商標)Immune Cell SR、及び2mM Glutamaxを含み、任意に6,000IU/mLのIL-2をさらに含む。

【0290】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、CTS(商標)OpTmizer(商標)T-cell Expansion Supplementを補充したCTS(商標)OpTmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium

(26 mL/L)、及び3%CTS(商標)Immune Cell SR、及び2 mM Glutamaxを含み、任意に3,000 IU/mLのIL-2をさらに含む。

【0291】

いくつかの実施形態では、TIL集団は、治療用TIL集団である。

【0292】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団は、血清IFN- $\gamma$ の上昇を示し、IFN- $\gamma$ の上昇は200 pg/mL超、250 pg/mL超、300 pg/mL超、350 pg/mL超、400 pg/mL超、450 pg/mL超、500 pg/mL超、550 pg/mL超、600 pg/mL超、650 pg/mL超、700 pg/mL超、750 pg/mL超、800 pg/mL超、850 pg/mL超、900 pg/mL超、950 pg/mL超、または1000 pg/mL超である

【0293】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることが、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

(b)任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(d)第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1~5日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(e)第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4~8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(f)ステップ(e)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g)ステップ(f)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む。

【0294】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物を提供し、TIL組成物は、

(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者

から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることが、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

(b) 任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

10

(d) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1~5日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(e) 第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することによって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4~8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

20

(f) ステップ(e)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g) ステップ(g)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことによって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む、方法により産生される。

30

#### 【0295】

いくつかの実施形態では、TIL組成物は凍結保存された組成物であり、方法は、(h)凍結保存プロセスを使用して、ステップ(g)からの採取されたTIL集団を含む輸液バッグを凍結保存することをさらに含む。

#### 【0296】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんに罹患した対象を治療するための方法を提供し、本方法は、増殖させた腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を投与することを含み、投与することは、

40

(a) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることが、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

(b) 任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、

50

ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( d ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することと、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( e ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することと、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( d ) からステップ ( e ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

( f ) ステップ ( e ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することと、ステップ ( e ) からステップ ( f ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( g ) ステップ ( g ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことと、ステップ ( f ) から ( g ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

( h ) ステップ ( g ) の輸液バッグから治療有効量の第 3 の T I L 集団を対象に投与することと、を含む。

【 0 2 9 7 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、約 6 ~ 8 日間行われる。

【 0 2 9 8 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖は、約 2 ~ 4 日間行われる。

【 0 2 9 9 】

いくつかの実施形態では、第 3 の増殖はそれぞれ約 5 ~ 7 日間実施される。

【 0 3 0 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、約 7 日間行われ、急速な第 2 の増殖は約 3 日間行われ、第 3 の増殖は約 6 日間行われる。

【 0 3 0 1 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) ~ ( e ) は、約 1 4 ~ 1 8 日で実施される。

【 0 3 0 2 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) ~ ( e ) は、約 1 6 日で実施される。

【 0 3 0 3 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) ~ ( e ) は、約 1 8 日以下で実施される。

【 0 3 0 4 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) ~ ( e ) は、約 1 6 日以下で実施される。

【 0 3 0 5 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( e ) は、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む。

【 0 3 0 6 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃

10

20

30

40

50

腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

【0307】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される。

【0308】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

【0309】

いくつかの実施形態では、がんは、HNSCCである。

【0310】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

10

【0311】

いくつかの実施形態では、がんは、NSCLCである。

【0312】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫（GBMを含む）である。

【0313】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

【0314】

いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。

【0315】

いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

20

【0316】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

（a）患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることが、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

（b）任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

（c）第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞（APC）、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ（b）からステップ（c）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

30

（d）第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

40

（e）第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ（d）からステップ（e）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

（f）ステップ（e）から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ（e）からステップ（f）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場

50

合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、  
 (g)ステップ(f)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すこと  
 であって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、  
 システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む。

【0317】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物を提供し、TIL組成物は、

(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって患者から  
 切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることか、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物  
 に処理することによって患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、 10

(b)任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び  
 任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1  
 の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライ  
 ミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1  
 の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、  
 ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、  
 システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施す  
 ることと、

(d)第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加  
 のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を  
 実施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5~9日間行  
 われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ス  
 テップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、シ  
 ステムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、 20

(e)第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増  
 殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し  
 、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することによ  
 り、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5~9日間行われ、任意に、  
 各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)か  
 らステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くこ  
 となく行われる、第3の増殖を実施することと、 30

(f)ステップ(f)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することであ  
 って、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場  
 合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g)ステップ(f)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すこと  
 であって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合  
 、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む方法によって、産  
 生される。

【0318】

いくつかの実施形態では、TIL組成物は凍結保存された組成物であり、方法は、(h)  
 )凍結保存プロセスを使用して、ステップ(g)からの採取されたTIL集団を含む輸液  
 バッグを凍結保存することをさらに含む。

【0319】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法を提供  
 し、本方法は、増殖させた腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を投与することを含み、投与する  
 ことは、

(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって患者から  
 切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることか、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物  
 に処理することによって患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、 40

10

20

30

40

50

(b) 任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c) 第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(d) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(e) 第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することによって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5~9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(f) ステップ(f)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g) ステップ(f)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことによって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

(h) ステップ(g)の輸液バッグから治療有効量の第3のTIL集団を対象に投与することと、を含む。

#### 【0320】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において、患者から得られた腫瘍サンプルは、(i)腫瘍サンプルを凍結保存して凍結保存された腫瘍サンプルを生成すること、(ii)凍結保存された腫瘍サンプルを解凍して、解凍された腫瘍サンプルを産生すること、及び(iii)解凍した腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に断片化すること、によって複数の腫瘍断片に加工される。

#### 【0321】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において、患者から得られた腫瘍サンプルは、(i)腫瘍サンプルを凍結保存して凍結保存された腫瘍サンプルを生成すること、(ii)凍結保存された腫瘍サンプルを解凍して、解凍された腫瘍サンプルを産生すること、及び(iii)解凍した腫瘍サンプルを消化して腫瘍消化物を産生すること、によって腫瘍消化物に加工される。

#### 【0322】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において、患者から得られた腫瘍サンプルは、(i)腫瘍サンプルを凍結保存して凍結保存された腫瘍サンプルを生成すること、(ii)凍結保存された腫瘍サンプルを解凍して、解凍された腫瘍サンプルを産生すること、(iii)解凍した腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に断片化すること、及び(iv)複数の腫瘍断片を消化して腫瘍消化物を産生すること、によって腫瘍消化物に加工される。

#### 【0323】

いくつかの実施形態では、ステップ(e)は、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を

、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む。

【0324】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 (頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) を含む)、神経膠芽腫 (GBM を含む)、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

【0325】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫 (GBM を含む)、及び胃腸癌からなる群から選択される。

10

【0326】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

【0327】

いくつかの実施形態では、がんは、HNSCC である。

【0328】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

【0329】

いくつかの実施形態では、がんは、NSCLC である。

【0330】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫 (GBM を含む) である。

20

【0331】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

【0332】

いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。

【0333】

いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

【0334】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療用 TIL 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

(a) (i) 対象から切断され、切断後に消化され、消化後に冷凍保存された腫瘍からの第 1 の TIL 集団を含む凍結保存された腫瘍消化物を解凍すること、及び (ii) IL-2、抗原提示細胞 (APC)、及び任意に OKT-3 を含む細胞培養培地で第 1 の TIL 集団を培養して、第 2 の TIL 集団を産生することによって、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の TIL 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

30

(b) 第 3 の TIL 集団を産生するために、第 2 の TIL 集団の細胞培養培地に、追加の IL-2、APC、及び任意に OKT-3 を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の TIL 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ (a) からステップ (b) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

40

(c) 第 3 の TIL 集団を、第 1 の複数の TIL 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の TIL 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意に OKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の TIL 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ (b) からステップ (c) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

50

(d) ステップ(c) から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(d) からステップ(e) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(e) ステップ(d) から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ(d) から(e) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む。

#### 【0335】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物を提供し、TIL組成物は、

(a) (i) 対象から切断され、切断後に凍結保存された腫瘍からの第1のTIL集団を含む凍結保存された腫瘍を解凍すること、及び(ii) IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生すること、によって、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(b) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、APC、任意にOKT-3を補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(a) からステップ(b) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(c) 第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することによって第3の増殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5~9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(b) からステップ(c) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(d) ステップ(c) から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ(c) からステップ(d) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(e) ステップ(d) から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ(d) から(e) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む方法によって産生される。

#### 【0336】

いくつかの実施形態では、TIL組成物は凍結保存された組成物であり、方法は、(f) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(e) からの採取されたTIL集団を含む輸液バッグを凍結保存することをさらに含む。

#### 【0337】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法を提供し、本方法は、増殖させた腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を投与することを含み、投与することは、

(a) (i) 対象から切断され、切断後に消化され、消化後に冷凍保存された腫瘍からの第1のTIL集団を含む凍結保存された腫瘍消化物を解凍すること、及び(ii) IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生すること、によって、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖または第1の増殖のプラ

10

20

30

40

50

イミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(b) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(a)からステップ(b)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(c) 第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することによって第3の増殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(d) ステップ(c)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(e) ステップ(d)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ(d)から(e)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

(f) ステップ(g)の輸液バッグから治療有効量の第3のTIL集団を対象に投与することと、を含む。

#### 【0338】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)(i)は、解凍された腫瘍を産生するために、対象から切除され、切除後に凍結保存された腫瘍からの第1のTIL集団を含む凍結保存された腫瘍を解凍すること、及び、解凍された腫瘍を複数の腫瘍に断片化することを含み、(a)(ii)は、第1のTIL集団を含む複数の腫瘍断片を培養することを含む。

#### 【0339】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)は、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を、約 $2 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>の播種密度で、第3のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む。

#### 【0340】

いくつかの実施形態では、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、約6～8日間行われる。

#### 【0341】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、約6～8日間行われる。

#### 【0342】

いくつかの実施形態では、第3の増殖は、約6～8日間行われる。

#### 【0343】

いくつかの実施形態では、第1の増殖またはプライミング第1の増殖、急速な第2の増殖、及び第3の増殖は、約18～24日で実施される。

#### 【0344】

いくつかの実施形態では、第1の増殖またはプライミング第1の増殖、急速な第2の増殖、及び第3の増殖は、約20～22日で実施される。

#### 【0345】

いくつかの実施形態では、第1の増殖またはプライミング第1の増殖、急速な第2の増殖、及び第3の増殖は、約21日で実施される。

#### 【0346】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 2 4 日以下で実施される。

【 0 3 4 7 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 2 2 日以下で実施される。

【 0 3 4 8 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 2 1 日以下で実施される。

【 0 3 4 9 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

【 0 3 5 0 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される。

【 0 3 5 1 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

【 0 3 5 2 】

いくつかの実施形態では、がんは、HNSCCである。

【 0 3 5 3 】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

【 0 3 5 4 】

いくつかの実施形態では、がんは、NSCLCである。

【 0 3 5 5 】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫（GBMを含む）である。

【 0 3 5 6 】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

【 0 3 5 7 】

いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。

【 0 3 5 8 】

いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

【 0 3 5 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

（ a ）第 2 の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、抗原提示細胞（ A P C ）、及び任意に O K T - 3 を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

（ b ）第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ（ a ）からステップ（ b ）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

（ c ）第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し

10

20

30

40

50

、 I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む。

10

#### 【 0 3 6 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、浸潤性リンパ球 ( T I L ) の治療集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) 組成物を提供し、T I L 組成物は、

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、抗原提示細胞 ( A P C )、及び任意に O K T - 3 を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

20

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

30

( d ) ステップ ( c ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む方法によって産生される。

40

#### 【 0 3 6 1 】

いくつかの実施形態では、T I L 組成物は凍結保存された組成物であり、方法は、( f ) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ ( e ) からの採取された T I L 集団を含む輸液バッグを凍結保存することをさらに含む。

#### 【 0 3 6 2 】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法を提供し、本方法は、増殖させた腫瘍浸潤性リンパ球 ( T I L ) を投与することを含み、投与することは、

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、抗原提示細胞 ( A P C )、及び

50

任意に O K T - 3 を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2 、任意に O K T - 3 、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

10

( c ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2 、任意に O K T - 3 、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 4 ~ 8 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

20

( e ) ステップ ( d ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) の輸液バッグから治療有効量の第 3 の T I L 集団を対象に投与することと、を含む。

#### 【 0 3 6 3 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) で培養する前に、腫瘍サンプルは、第 1 の T I L 集団を含む複数の腫瘍断片に断片化している。

30

#### 【 0 3 6 4 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) で培養する前に、腫瘍サンプルを消化して、第 1 の T I L 集団を含む腫瘍消化物を生成する。

#### 【 0 3 6 5 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、約 6 ~ 8 日間行われる。

#### 【 0 3 6 6 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖は、約 2 ~ 4 日間行われる。

#### 【 0 3 6 7 】

いくつかの実施形態では、第 3 の増殖は、それぞれ約 5 ~ 7 日間実施される。

40

#### 【 0 3 6 8 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは約 7 日間行われ、急速な第 2 の増殖は約 3 日間行われ、第 3 の増殖は約 6 日間行われる。

#### 【 0 3 6 9 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) ~ ( c ) は、約 1 4 ~ 1 8 日で実施される。

#### 【 0 3 7 0 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) ~ ( c ) は、約 1 6 日で実施される。

#### 【 0 3 7 1 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) ~ ( c ) は、約 1 8 日以下で実施される。

#### 【 0 3 7 2 】

50

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) ~ ( c ) は、約 16 日以下で実施される。

【 0373 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( c ) は、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を、約  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  の播種密度で、第 3 のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む。

【 0374 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

10

【 0375 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される。

【 0376 】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

【 0377 】

いくつかの実施形態では、がんは、H N S C C である。

【 0378 】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

【 0379 】

いくつかの実施形態では、がんは、N S C L C である。

20

【 0380 】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) である。

【 0381 】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

【 0382 】

いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。

【 0383 】

いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

【 0384 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) を治療用 T I L 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、

30

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、抗原提示細胞 ( A P C )、及び任意に O K T - 3 を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、A P C、及び任意に O K T - 3 を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

40

( c ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b )

50

からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(d)ステップ(f)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(e)ステップ(d)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことによって、ステップ(d)から(e)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む。

#### 【0385】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物を提供し、TIL組成物は、

(a)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第1のTIL集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(b)第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、APC、及び任意にOKT-3を補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(a)からステップ(b)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(c)第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することによって第3の増殖を実施することによって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5~9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(d)ステップ(f)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(e)ステップ(d)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことによって、ステップ(d)から(e)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む方法によって産生される。

#### 【0386】

いくつかの実施形態では、TIL組成物は凍結保存された組成物であり、方法は、(f)凍結保存プロセスを使用して、ステップ(e)からの採取されたTIL集団を含む輸液バッグを凍結保存することをさらに含む。

#### 【0387】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法を提供し、本方法は、増殖させた腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)を投与することを含み、投与することは、

(a)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、及び抗原提示細胞(APC)、及び任意にOKT-3を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第1のTIL集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、

約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、A P C、及び任意に O K T - 3 を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( f ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) の輸液バッグから治療有効量の第 3 の T I L 集団を対象に投与することと、を含む。

【 0 3 8 8 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) で培養する前に、腫瘍サンプルは、第 1 の T I L 集団を含む複数の腫瘍断片に断片化している。

【 0 3 8 9 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) で培養する前に、腫瘍サンプルを消化して、第 1 の T I L 集団を含む腫瘍消化物を生成する。

【 0 3 9 0 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、約 6 ~ 8 日間行われる。

【 0 3 9 1 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖は、約 6 ~ 8 日間行われる。

【 0 3 9 2 】

いくつかの実施形態では、第 3 の増殖は、約 6 ~ 8 日間行われる。

【 0 3 9 3 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 1 8 ~ 2 4 日で実施される。

【 0 3 9 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 2 0 ~ 2 2 日で実施される。

【 0 3 9 5 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 2 1 日で実施される。

【 0 3 9 6 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖またはプライミング第 1 の増殖、急速な第 2 の増殖、及び第 3 の増殖は、約 2 4 日以下で実施される。

【 0 3 9 7 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、第1の増殖またはプライミング第1の増殖、急速な第2の増殖、及び第3の増殖は、約22日以下で実施される。

【0398】

いくつかの実施形態では、第1の増殖またはプライミング第1の増殖、急速な第2の増殖、及び第3の増殖は、約21日以下で実施される。

【0399】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)は、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を、約 $2 \times 10^6$ 細胞/cm<sup>2</sup>の播種密度で、第3のガス透過性表面積を提供する別個の容器に播種することを含む。

【0400】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、神経膠芽腫(GBMを含む)、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。

【0401】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫(GBMを含む)、及び胃腸癌からなる群から選択される。

【0402】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

【0403】

いくつかの実施形態では、がんは、HNSCCである。

【0404】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

【0405】

いくつかの実施形態では、がんは、NSCLCである。

【0406】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽腫(GBMを含む)である。

【0407】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

【0408】

いくつかの実施形態では、がんは、超変異型癌である。

【0409】

いくつかの実施形態では、がんは、小児超変異型癌である。

【図面の簡単な説明】

【0410】

【図1A】2Aプロセス(約22日間のプロセス)とTIL製造のためのGen3プロセスの実施形態(約14日~18日間のプロセス)との比較を示す。

【図1B】)ステップA~F(約14日から18日間のプロセス)の概要を示す例示的なプロセスGen3チャートである。

【図1C】3つのプロセスパリエーションのそれぞれについて、ステップA~F(約14日から18日間のプロセス)の概要を含む3つの例示的なGen3プロセスを提供するチャートである。

【図1D】ステップA~F(約22日間のプロセス)の概要を提供する、例示的な修正されたGen2様プロセスである。

【図1E】ステップA~F(約14日~18日間のプロセス)の概要を提供する、例示的な第2世代プロセスGen3チャートである。

【図1F】ステップA~F(約14日~18日間のプロセス)の概要を提供する、例示的な第2世代プロセスGen3チャートである。

【図1G】ステップA~F(約14日~18日間のプロセス)の概要を提供する、例示的な第2世代プロセスGen3チャートである。

10

20

30

40

50

【図 2】 Gen 2 (プロセス 2 A) と Gen 3 との比較のための実験的なフローチャートを提供する。

【図 3】 様々な Gen 2 (2 A プロセス) と Gen 3 . 1 プロセスの実施形態との比較を示す。

【図 4】 Gen 2、Gen 2 . 1、及び Gen 3 . 0 プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表である。

【図 5】 Gen 3 . 1 と呼ばれる Gen 3 プロセスの実施形態の培地条件の概要である。

【図 6】 Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 7】 Gen 3 プロセスを使用して造血器悪性腫瘍から T I L を増殖させるための例示的な実施形態の概略図である。0 日目に、T 細胞画分 (C D 3 +、C D 4 5 +) を、正または負の選択法、すなわち、T 細胞マーカーを使用して T 細胞を除去する (C D 2、C D 3 など、または T 細胞を残す他の細胞を除去する)、または勾配遠心分離を使用して、リンパ球、全血、または腫瘍消化物 (新鮮または解凍) が濃縮されたアフエレーシス産物から分離させる。

10

【図 8】 Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 9】 Gen 3 . 1 試験 (Gen 3 . 1 最適化) プロセス (16 ~ 17 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 10 A】 Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 10 B】 Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

20

【図 11】 Gen 3 プロセス (16 / 17 日間のプロセス) 調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図である。

【図 12】 Gen 3 プロセス (14 ~ 16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 13 A】 Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 13 B】 Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の例示的な実施形態の概略図である。

【図 14】 Gen 2、Gen 2 . 1、及び Gen 3 プロセス (16 日間のプロセス) の実施形態の比較である。

30

【図 15】 Gen 3 実施形態のフローチャート比較 (Gen 3 . 0、Gen 3 . 1 対照、Gen 3 . 1 試験) である。

【図 16】 Gen 3 プロセス (Gen 3 最適化、16 ~ 17 日間のプロセス) の例示的な実施形態の構成要素を示す。

【図 17】 構造 I - A 及び I - B を提供し、円柱は個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造 I - A 及び I - B は、例えば、4 - 1 B B L または 4 - 1 B B と結合する抗体に由来する 3 つの直線的に連結された T N F R S F 結合ドメインを含み、これらは折り畳まれて三価タンパク質を形成し、次いで I g G 1 - F c を介して第 2 の三価タンパク質に連結され (C H 3 及び C H 2 ドメインを含む)、次いで、ジスルフィド結合 (小さな細長い楕円形) を介して 3 価のタンパク質の 2 つを結合し、構造を安定化し、6 つの受容体の細胞内シグナル伝達ドメインとシグナル伝達タンパク質を結合してシグナル複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円柱として示される T N F R S F 結合ドメインは、例えば親水性残基及び柔軟性のための G l y 及び S e r 配列、ならびに溶解性のための G l u 及び L y s を含み得るリンカーによって連結された V H 及び V L 鎖を含む s c F v ドメインであり得る。

40

【図 18】 生検サンプルを使用した Gen 2 及び Gen 3 プロセスの概要である。

【図 19】 Gen 3 プロセスの例示的な実施形態である。

【図 20】 現在の Gen 3 プロセスの例示的な実施形態である。

【図 21】 例示的な Gen 3 プロセス及び 3 つの例示的な第 2 世代 Gen 3 プロセスにお

50

けるフィーダー提案条件である。

【図 2 2】様々な出発材料を使用する Gen 2 及び Gen 3 プロセスの例示的实施形態である。

【図 2 3】図 1 8 に例示されているプロセスごとの、コアと切除サンプルの CD 3 + CD 4 5 + % の比較である。

【図 2 4】図 1 8 に例示されているプロセスごとの、コアと切除サンプルからの IFN データの比較である。

【図 2 5】図 1 8 に例示されているプロセスごとの総生細胞と製品属性の概要である。

【図 2 6】図 1 8 に例示されているプロセスごとの純度、識別、及び記憶に関連する増殖された表現型特性である。注：3%未満の B 細胞または単球または NK 細胞が検出された。

【図 2 7】図 1 8 に例示されているプロセスの表現型の比較である。

【図 2 8 A】図 1 8 に例示されているプロセスによる分化、活性化、及び枯渇に関連する増殖された表現型の特徴である。

【図 2 8 B】図 1 8 に例示されているプロセスによる分化、活性化、及び枯渇に関連する増殖された表現型の特徴である。

【発明を実施するための形態】

【0 4 1 1】

配列表の簡単な説明

配列番号 1 は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。

【0 4 1 2】

配列番号 2 は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。

【0 4 1 3】

配列番号 3 は、組換えヒト IL - 2 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 4 1 4】

配列番号 4 は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。

【0 4 1 5】

配列番号 5 は、組換えヒト IL - 4 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 4 1 6】

配列番号 6 は、組換えヒト IL - 7 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 4 1 7】

配列番号 7 は、組換えヒト IL - 15 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 4 1 8】

配列番号 8 は、組換えヒト IL - 21 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0 4 1 9】

配列番号 9 は、ヒト 4 - 1 B B のアミノ酸配列である。

【0 4 2 0】

配列番号 10 は、マウス 4 - 1 B B のアミノ酸配列である。

【0 4 2 1】

配列番号 11 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の重鎖である。

【0 4 2 2】

配列番号 12 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の軽鎖である。

【0 4 2 3】

配列番号 13 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の重鎖可変領域 ( V H ) である。

【0 4 2 4】

配列番号 14 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の軽鎖可変領域 ( V L ) である。

## 【 0 4 2 5 】

配列番号 15 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の重鎖 C D R 1 である。

## 【 0 4 2 6 】

配列番号 16 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の重鎖 C D R 2 である。

## 【 0 4 2 7 】

配列番号 17 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の重鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 2 8 】

配列番号 18 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の軽鎖 C D R 1 である。

## 【 0 4 2 9 】

配列番号 19 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の軽鎖 C D R 2 ある。

## 【 0 4 3 0 】

配列番号 20 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウトミルバム ( P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 ) の軽鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 3 1 】

配列番号 21 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の重鎖である。

## 【 0 4 3 2 】

配列番号 22 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の軽鎖である。

## 【 0 4 3 3 】

配列番号 23 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) である。

## 【 0 4 3 4 】

配列番号 24 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) である。

## 【 0 4 3 5 】

配列番号 25 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の重鎖 C D R 1 である。

## 【 0 4 3 6 】

配列番号 26 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の重鎖 C D R 2 である。

## 【 0 4 3 7 】

配列番号 27 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の重鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 3 8 】

配列番号 28 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の軽鎖 C D R 1 である。

## 【 0 4 3 9 】

配列番号 29 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の軽鎖 C D R 2 である。

## 【 0 4 4 0 】

配列番号 30 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ ( B M S - 6 6 3 5 1 3 ) の軽鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 4 1 】

配列番号 31 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質の F c ドメインである。

10

20

30

40

50

- 【 0 4 4 2 】  
配列番号 3 2 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 4 3 】  
配列番号 3 3 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 4 4 】  
配列番号 3 4 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 4 5 】  
配列番号 3 5 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 4 6 】  
配列番号 3 6 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。 10
- 【 0 4 4 7 】  
配列番号 3 7 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 4 8 】  
配列番号 3 8 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 4 9 】  
配列番号 3 9 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 5 0 】  
配列番号 4 0 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 5 1 】  
配列番号 4 1 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。 20
- 【 0 4 5 2 】  
配列番号 4 2 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質の F c ドメインである。
- 【 0 4 5 3 】  
配列番号 4 3 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 5 4 】  
配列番号 4 4 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 5 5 】  
配列番号 4 5 は、 T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 4 5 6 】  
配列番号 4 6 は、 4 - 1 B B リガンド ( 4 - 1 B B L ) アミノ酸配列である。 30
- 【 0 4 5 7 】  
配列番号 4 7 は、 4 - 1 B B L ポリペプチドの水溶性部分である。
- 【 0 4 5 8 】  
配列番号 4 8 は、 4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 1 の重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) である。
- 【 0 4 5 9 】  
配列番号 4 9 は、 4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 1 の軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) である。
- 【 0 4 6 0 】  
配列番号 5 0 は、 4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 2 の重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) である。 40
- 【 0 4 6 1 】  
配列番号 5 1 は、 4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 2 の軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) である。
- 【 0 4 6 2 】  
配列番号 5 2 は、 4 - 1 B B アゴニスト抗体 H 3 9 E 3 - 2 の重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) である。
- 【 0 4 6 3 】  
配列番号 5 3 は、 4 - 1 B B アゴニスト抗体 H 3 9 E 3 - 2 の軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) である。 50

## 【0464】

配列番号54は、ヒトOX40のアミノ酸配列である。

## 【0465】

配列番号55は、マウスOX40のアミノ酸配列である。

## 【0466】

配列番号56は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の重鎖である。

## 【0467】

配列番号57は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の軽鎖である。

10

## 【0468】

配列番号58は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)である。

## 【0469】

配列番号59は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)である。

## 【0470】

配列番号60は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の重鎖CDR1である。

## 【0471】

配列番号61は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の重鎖CDR2である。

20

## 【0472】

配列番号62は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の重鎖CDR3である。

## 【0473】

配列番号63は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の軽鎖CDR1である。

## 【0474】

配列番号64は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の軽鎖CDR2である。

30

## 【0475】

配列番号65は、OX40アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ(MEDI-0562)の軽鎖CDR3である。

## 【0476】

配列番号66は、OX40アゴニストモノクローナル抗体11D4の重鎖である。

## 【0477】

配列番号67は、OX40アゴニストモノクローナル抗体11D4の軽鎖である。

## 【0478】

配列番号68は、OX40アゴニストモノクローナル抗体11D4の重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)である。

40

## 【0479】

配列番号69は、OX40アゴニストモノクローナル抗体11D4の軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)である。

## 【0480】

配列番号70は、OX40アゴニストモノクローナル抗体11D4の重鎖CDR1である。

## 【0481】

配列番号71は、OX40アゴニストモノクローナル抗体11D4の重鎖CDR2である。

50

## 【 0 4 8 2 】

配列番号 7 2 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 8 3 】

配列番号 7 3 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 1 である。

## 【 0 4 8 4 】

配列番号 7 4 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 2 である。

## 【 0 4 8 5 】

配列番号 7 5 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 8 6 】

配列番号 7 6 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖である。

## 【 0 4 8 7 】

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

## 【 0 4 8 8 】

配列番号 7 8 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) である。

## 【 0 4 8 9 】

配列番号 7 9 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) である。

## 【 0 4 9 0 】

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

## 【 0 4 9 1 】

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

## 【 0 4 9 2 】

配列番号 8 2 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 9 3 】

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

## 【 0 4 9 4 】

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

## 【 0 4 9 5 】

配列番号 8 5 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 3 である。

## 【 0 4 9 6 】

配列番号 8 6 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> ) である。

## 【 0 4 9 7 】

配列番号 8 7 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> ) である。

## 【 0 4 9 8 】

配列番号 8 8 は、OX 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 1 である。

## 【 0 4 9 9 】

10

20

30

40

50

- 配列番号 89 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の重鎖 CDR2 である。
- 【0500】
- 配列番号 90 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の重鎖 CDR3 である。
- 【0501】
- 配列番号 91 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の軽鎖 CDR1 である。
- 【0502】
- 配列番号 92 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の軽鎖 CDR2 である。 10
- 【0503】
- 配列番号 93 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の軽鎖 CDR3 である。
- 【0504】
- 配列番号 94 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) である。
- 【0505】
- 配列番号 95 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) である。 20
- 【0506】
- 配列番号 96 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖 CDR1 である。
- 【0507】
- 配列番号 97 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖 CDR2 である。
- 【0508】
- 配列番号 98 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖 CDR3 である。
- 【0509】 30
- 配列番号 99 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖 CDR1 である。
- 【0510】
- 配列番号 100 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖 CDR2 である。
- 【0511】
- 配列番号 101 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖 CDR3 である。
- 【0512】
- 配列番号 102 は、OX40 リガンド (OX40L) アミノ酸配列である。 40
- 【0513】
- 配列番号 103 は、OX40L ポリペプチドの水溶性部分である。
- 【0514】
- 配列番号 104 は、OX40L ポリペプチドの代替水溶性部分である。
- 【0515】
- 配列番号 105 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) である。
- 【0516】
- 配列番号 106 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) である。 50

## 【0517】

配列番号107は、OX40アゴニストモノクローナル抗体011の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0518】

配列番号108は、OX40アゴニストモノクローナル抗体011の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0519】

配列番号109は、OX40アゴニストモノクローナル抗体021の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0520】

配列番号110は、OX40アゴニストモノクローナル抗体021の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0521】

配列番号111は、OX40アゴニストモノクローナル抗体023の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0522】

配列番号112は、OX40アゴニストモノクローナル抗体023の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0523】

配列番号113は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0524】

配列番号114は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0525】

配列番号115は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0526】

配列番号116は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0527】

配列番号117は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0528】

配列番号118は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0529】

配列番号119は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0530】

配列番号120は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）である。

## 【0531】

配列番号121は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0532】

配列番号122は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）である。

## 【0533】

配列番号123は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V

10

20

30

40

50

L)である。

【0534】

配列番号124は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)である。

【0535】

配列番号125は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)である。

【0536】

配列番号126は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)である。

【0537】

配列番号127～462は、現在割り当てられていない。

【0538】

配列番号463は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0539】

配列番号464は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0540】

配列番号465は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。

【0541】

配列番号466は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。

【0542】

配列番号467は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0543】

配列番号468は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0544】

配列番号469は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0545】

配列番号470は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0546】

配列番号471は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0547】

配列番号472は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0548】

配列番号473は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0549】

配列番号474は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0550】

配列番号475は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。

【0551】

配列番号476は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。

【0552】

配列番号477は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0553】

配列番号478は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

- 【0554】  
配列番号479は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0555】  
配列番号480は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0556】  
配列番号481は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0557】  
配列番号482は、PD-1阻害剤ペンブロリズマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。 10
- 【0558】  
配列番号483は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0559】  
配列番号484は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0560】  
配列番号485は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。 20
- 【0561】  
配列番号486は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。 20
- 【0562】  
配列番号487は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0563】  
配列番号488はPD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0564】  
配列番号489は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。 30
- 【0565】  
配列番号490は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0566】  
配列番号491は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0567】  
配列番号492は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。 40
- 【0568】  
配列番号493は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0569】  
配列番号494は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0570】  
配列番号495は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。
- 【0571】  
配列番号496は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。 50

- 【0572】  
配列番号497は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0573】  
配列番号498は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0574】  
配列番号499は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0575】  
配列番号500は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0576】  
配列番号501は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。 10
- 【0577】  
配列番号502は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0578】  
配列番号503は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0579】  
配列番号504は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0580】  
配列番号505は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。 20
- 【0581】  
配列番号506は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。
- 【0582】  
配列番号507は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0583】  
配列番号508は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0584】  
配列番号509は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。 30
- 【0585】  
配列番号510は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0586】  
配列番号511は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0587】  
配列番号512は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。 40
- 【0588】  
配列番号513は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0589】  
配列番号514は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0590】  
配列番号515は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。
- 【0591】  
配列番号516は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。 50

- 【0592】  
配列番号517は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0593】  
配列番号518は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0594】  
配列番号519は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0595】  
配列番号520は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。 10
- 【0596】  
配列番号521は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0597】  
配列番号522は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0598】  
配列番号523は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。 20
- 【0599】  
配列番号524は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0600】  
配列番号525は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域(VH)アミノ酸配列である。
- 【0601】  
配列番号526は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域(VL)アミノ酸配列である。
- 【0602】  
配列番号527は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。 30
- 【0603】  
配列番号528は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0604】  
配列番号529は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0605】  
配列番号530は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。 40
- 【0606】  
配列番号531は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0607】  
配列番号532は、CTLA-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0608】  
配列番号533は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0609】  
配列番号534は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。 50

- 【0610】  
配列番号535は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)アミノ酸配列である。
- 【0611】  
配列番号536は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)アミノ酸配列である。
- 【0612】  
配列番号537は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0613】  
配列番号538は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。 10
- 【0614】  
配列番号539は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0615】  
配列番号540は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0616】  
配列番号541は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。 20
- 【0617】  
配列番号542は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0618】  
配列番号543は、IL-2配列である。
- 【0619】  
配列番号544は、IL-2ムテイン配列である。
- 【0620】  
配列番号545は、IL-2ムテイン配列である。 30
- 【0621】  
配列番号546は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR1\_\_IL-2である。
- 【0622】  
配列番号547は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR2である。
- 【0623】  
配列番号548は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR3である。
- 【0624】  
配列番号549は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR1\_\_IL-2kabataである。
- 【0625】  
配列番号550は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR2kabataである。 40
- 【0626】  
配列番号551は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR3kabataである。
- 【0627】  
配列番号552は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR1\_\_IL-2clothiaである。
- 【0628】  
配列番号553は、IgG・IL2R67A・H1のHC DR2clothiaである。
- 【0629】  
 50

配列番号 554 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 c l o t h i a である。

【0630】

配列番号 555 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 \_ I L - 2 I M G T である。

【0631】

配列番号 556 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 I M G T である。

【0632】

配列番号 557 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 I M G T である。

【0633】

配列番号 558 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の V H 鎖である。

【0634】

配列番号 559 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の重鎖である。

【0635】

配列番号 560 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 k a b a t である。

【0636】

配列番号 561 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 k a b a t である。

【0637】

配列番号 562 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 k a b a t である。

【0638】

配列番号 563 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 c h o t h i a である。

【0639】

配列番号 564 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 c h o t h i a である。

【0640】

配列番号 565 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 c h o t h i a である。

【0641】

配列番号 566 は、V L 鎖である。

【0642】

配列番号 567 は、軽鎖である。

【0643】

配列番号 568 は、軽鎖である。

【0644】

配列番号 569 は、軽鎖である。

【0645】

配列番号 570 は、I L - 2 形態である。

【0646】

配列番号 571 は、I L - 2 形態である。

【0647】

配列番号 572 は、I L - 2 形態である。

【0648】

配列番号 573 は、ムチンドメインポリペプチドである。

【0649】

## I . 定義

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で参照される全ての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0650】

10

20

30

40

50

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【0651】

「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイは、生細胞または死細胞が使用される細胞ベースのアッセイを包含し、無傷の細胞が使用されない無細胞アッセイも包含し得る。

【0652】

「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び/または臓器に対する治療または手順の実施に関与する事象を指す。適切な場合、細胞、組織、及び/または臓器は、手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。

【0653】

「急速な増殖」という用語は、1週間にわたって少なくとも約3倍（または4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、または9倍）、より好ましくは、1週間にわたって少なくとも約10倍（または20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、または90倍）、または最も好ましくは1週間にわたって少なくとも約100倍の抗原特異的TILの数の増加を意味する。いくつかの急速な増殖プロトコルの概要を以下に示す。

【0654】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「TIL」とは、対象の血流を離れて腫瘍内に移動した白血球として最初に得られた細胞の集団を意味する。TILには、CD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞（リンパ球）、Th1及びTh17CD4<sup>+</sup>T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、M1マクロファージが含まれるが、これに限定されない。TILには、一次TIL及び二次TILの両方が含まれる。「一次TIL」は、本明細書に概説されるように患者の組織サンプルから得られるものであり（「新たに得られた」または「新たに単離された」と称され得る）、「二次TIL」は、本明細書で考察される、増殖または増殖された任意のTIL細胞集団であり、バルクTIL及び増殖されたTIL（「REP TIL」または「POST REP TIL」）を含むがこれらに限定されない。TIL細胞集団は、遺伝子改変TILを含み得る。

【0655】

本明細書における「細胞集団」（TILを含む）とは、共通の形質を共有する多数の細胞を意味する。一般に、集団は一般に数が $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ の範囲であり、異なるTIL集団は異なる数で構成される。例えば、IL-2の存在下での一次TILの初期増殖は、およそ $1 \times 10^8$ 細胞のバルクTIL集団をもたらす。REP増殖は一般に、注入用に $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 細胞の集団を提供するために行われる。いくつかの実施形態では、 $2.3 \times 10^{10} \sim 13.7 \times 10^{10}$ の集団を提供するためにREP増殖が行われる。

【0656】

本明細書における「凍結保存されたTIL」とは、一次、バルク、または増殖（REP TIL）のいずれかのTILが処理され、約-150 ~ -60の範囲で保存されることを意味する。凍結保存の一般的な方法も、実施例を含め、本明細書の他の場所に記載されている。明確にするために、「凍結保存されたTIL」は、一次TILのソースとして使用できる凍結組織サンプルと区別することができる。

【0657】

本明細書における「解凍された凍結保存されたTIL」とは、以前に凍結保存され、次いで、細胞培養温度またはTILが患者に投与され得る温度を含むがこれらに限定されない、室温以上に戻るように処理されたTIL集団を意味する。

【0658】

TILは一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に、または腫瘍に浸潤し治療に影響を与える能力によって機能的に定義することができる。TILは一般に、CD4、CD8、TCR、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1、及びCD25のバイオマーカーの1つまたは複数を発現することによって分類することができる。加えて、及び代替として、TILは、患者への再導入時に固形腫瘍

10

20

30

40

50

に浸潤する能力によって機能的に定義することができる。TILは効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン(IFN)の放出が約50pg/mL超、約100pg/mL超、約150pg/mL超、または約200pg/mL超の場合に、TILは効力があると見なされ得る。例えば、インターフェロン(IFN)の放出が約50pg/mL超、約100pg/mL超、約150pg/mL超、または約200pg/mL超、約300pg/mL超、約400pg/mL超、約500pg/mL超、約600pg/mL超、約700pg/mL超、約800pg/mL超、約900pg/mL超、約1000pg/mL超の場合に、TILは効力があると見なされ得る。

#### 【0659】

「凍結保存培地」または「凍結保存媒体」という用語は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。そのような培地は、7%~10%のDMSOを含む。例示的な媒体には、CryoStor CS10、Hyperthermasol、ならびにそれらの組み合わせが挙げられる。「CS10」という用語は、Stemcell TechnologiesまたはBiolife Solutionsから得られる凍結保存培地を指す。CS10培地は、「CryoStor(登録商標)CS10」という商品名で呼ばれることがある。CS10培地は、DMSOを含む無血清、無動物成分培地である。

10

#### 【0660】

「セントラルメモリーT細胞」という用語は、ヒトにおいてCD45R0+であり、CCR7(CCR7<sup>hi</sup>)及びCD62L(CD62<sup>hi</sup>)を構成的に発現するT細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーT細胞の表面表現型には、TCR、CD3、CD127(IL-7R)、及びIL-15Rも含まれる。セントラルメモリーT細胞の転写因子には、BCL-6、BCL-6B、MBD2、及びBMI1が含まれる。セントラルメモリーT細胞は、TCRトリガー後に主にIL-2及びCD40Lをエフェクター分子として分泌する。セントラルメモリーT細胞は、血液中のCD4コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節と扁桃腺に比例して濃縮される。

20

#### 【0661】

「エフェクターメモリーT細胞」という用語は、セントラルメモリーT細胞と同様に、CD45R0+であるが、CCR7の構成的発現を失い(CCR7<sup>lo</sup>)、CD62L発現が不均一または低い(CD62L<sup>lo</sup>)、ヒトまたは哺乳類のT細胞のサブセットを称する。セントラルメモリーT細胞の表面表現型には、TCR、CD3、CD127(IL-7R)、及びIL-15Rも含まれる。セントラルメモリーT細胞の転写因子には、BLIMP1が含まれる。エフェクターメモリーT細胞は、抗原刺激に続いて、インターフェロン- $\gamma$ 、IL-4、IL-5を含む、高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーT細胞は、血液中のCD8コンパートメントで優勢であり、ヒトでは、肺、肝臓、及び腸に比例して濃縮されている。CD8+エフェクターメモリーT細胞は大量のパーフォリンを持っている。

30

#### 【0662】

「閉鎖システム」とは、外部環境に対して閉鎖されたシステムを指す。細胞培養法に適した任意の閉鎖システムを本発明の方法で使用することができる。閉鎖システムには、例えば、閉鎖G-容器が含まれるが、これに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖システムに追加されると、TILが患者に投与される準備が整うまで、システムは外部環境に対して開放されない。

40

#### 【0663】

「断片化する」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍を破壊するためのプロセスを説明するために本明細書で使用される場合、腫瘍組織を破砕、スライス、分割、及び細切するなどの機械的断片化方法、ならびに、腫瘍組織の物理的構造を破壊するための任意の他の方法を含む。

#### 【0664】

「穿刺吸引」またはFNAという用語は、サンプルを採取するが腫瘍を除去または切除しない腫瘍サンプリングを含む、サンプリングまたは診断手順に使用できる生検手順の一

50

種を指す。穿刺吸引では、本明細書に記載のように、中空針、例えば25～18ゲージが腫瘍または腫瘍を含む領域に挿入され、液体及び細胞（組織を含む）をさらなる分析または増殖のために得る。FNAを使用すると、組織細胞の組織学的構造が維持されずに細胞が取り出される。FNAはTILを含むことができる。場合によっては、超音波誘導穿刺吸引生検針を使用して、穿刺吸引細胞診が実施される。FNA針は、Becton Dickinson、Covidienなどから市販されている。

【0665】

「コア生検」または「コア針生検」という用語は、サンプルを採取するが腫瘍を除去または切除しない腫瘍サンプリングを含む、サンプリングまたは診断手順に使用できる生検手順の一種を指す。穿刺吸引では、本明細書に記載のように、中空針、例えば16～11ゲージが腫瘍または腫瘍を含む領域に挿入され、液体及び細胞（組織を含む）をさらなる分析または増殖のために得る。コア生検では、FNAと比較して針のサイズが大きいいため、組織細胞の組織学的構造をある程度保存した状態で細胞を取り出すことができる。コア生検針は、一般に、腫瘍の組織構造の少なくとも一部を保存できるゲージサイズのものである。コア生検は、TILを含み得る。場合によっては、コア針生検は、生検器具、真空支援コア針生検器具、定位誘導コア針生検器具、超音波誘導コア針生検器具、MRI誘導コア針生検器具を使用して実施され、針生検器具は、Bard Medical、Becton Dickinsonなどから市販されている。

10

【0666】

「末梢血単核細胞」及び「PBMC」という用語は、リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）及び単球を含む、丸い核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞（PBMCは抗原提示細胞の一種である）として使用される場合、末梢血単核細胞は、放射線照射された同種異系末梢血単核細胞である。

20

【0667】

「末梢血リンパ球」及び「PBL」という用語は、末梢血から増殖させたT細胞を指す。いくつかの実施形態では、PBLは、ドナーからの全血またはアフエーシス製品から分離される。いくつかの実施形態では、PBLは、CD3+CD45+のT細胞表現型などのT細胞表現型の正または負の選択によって、ドナーからの全血またはアフエーシス生成物から分離される。

【0668】

「抗CD3抗体」という用語は、成熟T細胞のT細胞抗原受容体中のCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラまたはマウス抗体を含む抗体またはそのバリエーション、例えばモノクローナル抗体を指す。抗CD3抗体には、ムロモナブとしても知られるOKT-3が含まれる。抗CD3抗体には、T3及びCD3としても知られるUHC1クローンも含まれる。他の抗CD3抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びピシリズマブが含まれる。

30

【0669】

「OKT-3」（本明細書では「OKT3」とも呼ばれる）という用語は、成熟T細胞のT細胞抗原受容体のCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはバイオシミラーまたはそのバリエーションを指し、OKT-3（30ng/mL、MACS GMP CD3 pure、Miltenyi Biotec, Inc.、San Diego, CA, USA）及びムロモナブまたはそのバリエーション、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、またはそのバイオシミラーを含む、市販の形態のものを含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表1に示す（配列番号1及び配列番号2）。OKT-3を産生できるハイブリドーマは、American Type Culture Collectionに寄託され、ATCC受託番号CRL8001が割り当てられている。OKT-3を産生できるハイブリドーマもEuropean Collection of Authenticated Cell Cultures（ECCACC）に寄託され、カタログ番号86022706が割り当てられている。

40

50

【表 1】

表 1. ムロモナブのアミノ酸配列 (例示的なOKT-3抗体)。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 1 ムロモナブ重鎖	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCRASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYITNY 60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA 120
	KTTAPSVYPL APVCGGTGGS SVTLGCLVKG YFPEVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420
	QQGNVFSCSV MHEALHNYHT QKSLSLSPGK 450
	QIVLTQSPAI MSASPGKEVT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAAH 60
	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFFPPS 120
SEQLTSGGAS VVCFLLNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180	
TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213	

10

【0670】

「IL-2」(本明細書では「IL2」とも称される)という用語は、インターロイキン-2として知られるT細胞増殖因子を指し、ヒト及び哺乳類の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー、及びそのバリエーションを含む、IL-2のすべての形態を含む。IL-2は、例えばNelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88及びMalek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適した組換えヒトIL-2のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号3)。例えば、IL-2という用語は、アルデスロイキン(PROLEUKIN、1回使用バイアル当たり2200万IUで複数の供給業者から市販されている)などのIL-2のヒト組換え形態、ならびにCellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGROGMP)またはProSpec-TanyTechnoGeneltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-209-b)によって商業的に供給される組換えIL-2の形態、及び他のベンダーからのその他の商用同等品を包含する。アルデスロイキン(デス-アラニル-1、セリン-125ヒトIL-2)は、分子量約15kDaの非グリコシル化ヒト組換え型IL-2である。本発明での使用に適したアルデスロイキンのアミノ酸配列を表2に示す(配列番号4)。IL-2という用語はまた、本明細書に記載されるように、Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USAから入手可能な、ペグ化IL-2プロドラッグベンペガルデスロイキン(NKTR-214、平均6リジン残渣が、[(2,7-bis{[メチルポリ(オキシエチレン)]カルバモイル}-9H-フルオレン-9-イル)メトキシ]カルボニルで置換されたN<sup>6</sup>である、配列番号4のペグ化ヒト組換えIL-2)、または、参照により本明細書に組み込まれる、実施例19の国際特許出願公開第WO2018/132496A1号、または実施例1の米国特許出願公開第US2019/0275133A1号に記載される、本分野で既知の方法により調製され得る、IL-2のペグ化型を包含する。本発明での使用に適したベンペガルデスロイキン(NKTR-214)及び他のペグ化IL-2分子は、米国特許出願公開第US2014/032879A1及び国際特許出願公開第WO2012/065086号に記載されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適したコンジュゲートされたIL-2の代替形態は、米国特許第4,766,106号、同第5,206,344号、同第5,089,261号及び同第4,902,502号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に適したIL-2の製剤は、米国特許第6,706,289号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

50

## 【 0 6 7 1 】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に適した I L - 2 形態は、S y n t h o r x , I n c . から入手可能な T H O R - 7 0 7 である。T H O R - 7 0 7 及び本発明での使用に適した I L - 2 のさらなる代替形態の調製及び特性は、米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 1 8 1 2 2 0 A 1 と第 U S 2 0 2 0 / 0 3 3 0 6 0 1 号に記載されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適した I L - 2 形態は、単離及び精製された I L - 2 ポリペプチド；及び、K 3 5、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、K 4 3、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製された I L - 2 ポリペプチドに結合するコンジュゲート部分（アミノ酸残基の番号付けは配列番号 5 に対応する）を含む、インターロイキン 2（I L - 2）コンジュゲートである。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、T 3 7、T 4 1、F 4 2、F 4 4、Y 4 5、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、R 3 8 及び K 6 4 から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、E 6 1、E 6 2、及び E 6 8 から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は E 6 2 である。いくつかの実施形態では、K 3 5、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、K 4 3、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基はシステインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基はリジンに変異する。いくつかの実施形態では、K 3 5、T 3 7、R 3 8、T 4 1、F 4 2、K 4 3、F 4 4、Y 4 5、E 6 1、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 から選択されるアミノ酸残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、N 6 - アジドエトキシ - L - リジン（A z K）、N 6 - プロパルギルエトキシ - L - リジン（P r a K）、B C N - L - リジン、ノルボルネンリジン、T C O - リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、2 - アミノ - 8 - オキソノナン酸、2 - アミノ - 8 - オキソオクタン酸、p - アセチル - L - フェニルアラニン、p - アジドメチル - L - フェニルアラニン（p A M F）、p - ヨード - L - フェニルアラニン、m - アセチルフェニルアラニン、2 - アミノ - 8 - オキソノナン酸、p - プロパルギルオキシフェニルアラニン、p - プロパルギル - フェニルアラニン、3 - メチル - フェニルアラニン、L - ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル - L - フェニルアラニン、p - アジド - L - フェニルアラニン、p - アシル - L - フェニルアラニン、p - ベンゾイル - L - フェニルアラニン、p - プロモフェニルアラニン、p - アミノ - L - フェニルアラニン、イソプロピル - L - フェニルアラニン、O - アリルチロシン、O - メチル - L - チロシン、O - 4 - アリル - L - チロシン、4 - プロピル - L - チロシン、ホスホチロシン、トリ - O - アセチル - G l c N A c p - セリン、L - ホスホセリン、ホスホセリン、L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、2 - アミノ - 3 - ( ( 2 - ( ( 3 - ( ベンジルオキシ ) - 3 - オキソプロピル ) アミノ ) エチル ) セラニル ) プロパン酸、2 - アミノ - 3 - ( フェニルセラニル ) プロパノ i c、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、I L - 2 コンジュゲートは、野生型 I L - 2 ポリペプチドと比較して、I L - 2 受容体（I L - 2 R）サブユニットに対する親和性が低下している。いくつかの実施形態では、低下した親和性は、野生型 I L - 2 ポリペプチドと比較して、約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 9 9 % 超 I L - 2 R に対する結合親和性が低下する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型 I L - 2 ポリペプチドと比較して、約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、3 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、2

10

20

30

40

50

00倍、300倍、500倍、1000倍、またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、IL-2とIL-2Rとの結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加のコンジュゲート部分は水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーのそれぞれは独立して、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)、ポリ(糖)、ポリ(-ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン(POZ)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーのそれぞれは独立してPEGを含む。いくつかの実施形態では、PEGは直鎖PEGまたは分岐PEGである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーのそれぞれは独立してポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸(PSA)、ヒアルロン酸(HA)、アミロース、ヘパリン、ヘパラン硫酸(HS)、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン(HES)を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーのそれぞれは独立してグリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーのそれぞれは独立してポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分はタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加のコンジュゲート部分はタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質のそれぞれは独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質のそれぞれが独立してFc部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質のそれぞれが独立してIgGのFc部分を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分はポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加のコンジュゲート部分はポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、各ポリペプチドは独立して、XTENペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー(HAP)、PASポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド(ELP)、CTPペプチド、またはゼラチン様タンパク質(GLK)ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製されたIL-2ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、単離及び精製されたIL-2ポリペプチドに直接結合される。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、単離及び精製されたIL-2ポリペプチドに間接結合される。いくつかの実施形態において、リンカーは、ホモホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマンツ試薬ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)DSP、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スルホスクシンイミジル)(DTSSP)、スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)、スベリン酸ビス(BS)、酒石酸ジスクシンイミジル(DST)、酒石酸ジスルホスクシンイミジル(スルホDST)、エチレングリコビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、グルタル酸ジスクシンイミジル(DSG)、N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート(DSC)、アジピミジン酸ジメチル(DMA)、ピメリミジン酸ジメチル(DMP)、スベリミジン酸ジメチル(DMS)、ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート(DTBP)、1,4-ジ-(3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド)ブタン(DPDPB)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)、ハロゲン化アリアル含有化合物(DFDNB)、例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンまたは1,3-ジフルオロ-4,6-ジニトロベンゼン、4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン(DFDNPS)、bis-[-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide(BASED)、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o-トルイジン、3,3'-ジメチルベンジジン、ベンジジン、, ' - p - ジアミノジフェニル、ジヨード - p - キシレンスルホン酸酸、N, N' - エチレン - ビス(ヨードアセトアミド)、またはN, N' - ヘキサメチレン - ビス(ヨードア

10

20

30

40

50

セトアミド)を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(sPDP)、長鎖N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(LC-sPDP)、水溶性長鎖N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(スルホ-LC-sPDP)、スクシンイミジロキシカルボニル- -メチル- -(2-ピリジルジチオ)トルエン(sMPT)、スルホスクシンイミジル-6-[ -メチル- -(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート(スルホ-LC-sMPT)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(sMCC)、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-sMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MB)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル(スルホ-MB)、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(sIAB)、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(スルホ-sIAB)、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(sMPB)、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(スルホ-sMPB)、N-( -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステル(GMB)、N-( -マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル(スルホ-GMB)、スクシンイミジル6-( (ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノエート(sIAX)、スクシンイミジル6-[6-( ( (ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノイル)アミノ]ヘキサノエート(sLAXX)、スクシンイミジル4-( ( (ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(sIAC)、スクシンイミジル6-( ( ( (4-ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサン-1-カルボニル)アミノ)ヘキサノエート(sIACX)、ヨード酢酸p-ニトロフェニル(NPIA)、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(MPBH)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシル-ヒドラジド-8(M2C2H)などのカルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド(PDPH)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(NHs-AsA)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(

10

20

30

スルホ-NHs-AsA)、スルホスクシンイミジル-(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート(スルホ-NHs-LC-AsA)、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(sAsD)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(HsAB)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジド安息香酸(スルホ-HsAB)、N-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート(sANPAH)、スルホスクシンイミジル-6-(4'-アジド-2')-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート(スルホ-sANPAH)、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド(AN)B-NOs)、スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)-エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(sAND)、N-スクシンイミジル-4(4-アジドフェニル)1,3'-ジチオプロピオネート(sADP)、N-スルホスクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオネート(スルホ-sADP)、スルホスクシンイミジル4-( -アジドフェニル)ブチレート(スルホ-sAPB)、スルホスクシンイミジル2-(7-アジド-4-メチルクマリン-3)-アセトアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(sAED)、スルホスクシンイミジル7-アジド-4-メチルクメイン-3-アセテート(スルホ-sAMCA)、p-ニトロフェニルジアゾピルベート(pNPDP)、p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3,3,3-トリフルオロプロピオン酸(PNP-DTP)、1-( -アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン(AsIB)、N-[4-( -

40

50

アジドサリシルアミド)ブチル]-3'- (2'-pyridyldithio)プロピオンアミド (APDP)、ベンゾフェノン-4-ヨードアセトアミド、p-アジドベンゾイルヒドラジド (ABH)、4-(p-アジドサリシルアミド)ブチルアミン (AsBA)、またはp-アジドフェニルグリオキサール (APG)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意にジペプチドリンカーを含む、開裂可能リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala、またはVal-Lysを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、非開裂リンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーはマレイミドカプロイル (mc)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート (sMCC)、またはスルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート (スルホ-sMCC)を任意に含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、スペーサーを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、p-アミノベンジルアルコール (PAB)、p-アミノベンジルオキシカルボニル (PABC)、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、IL-2コンジュゲートの血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加のコンジュゲート部分は、IL-2コンジュゲートの血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、本明細書に記載のIL-2形態のいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、米国特許出願公開第US2020/0181220A1号及び米国特許出願公開第US2020/0330601A1号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、ポリエチレングリコール (PEG)を含むコンジュゲート部分に共有結合したN6-アジドエトキシ-L-リジン (AzK)を含むIL-2ポリペプチドを含むIL-2コンジュゲートであり、IL-2ポリペプチドは、配列番号5に少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸を有し、AzKは、配列番号5のアミノ酸位置に参照する、K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69、またはL72の位置にあるアミノ酸に置換する。いくつかの実施形態では、IL-2ポリペプチドは、配列番号5に対して1残基のN末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、IL-2Rアルファ鎖の関与を欠いているが、中間親和性IL-2Rベータ-ガンマシグナル複合体への正常な結合を保持している。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、ポリエチレングリコール (PEG)を含むコンジュゲート部分に共有結合したN6-アジドエトキシ-L-リジン (AzK)を含むIL-2ポリペプチドを含むIL-2コンジュゲートであり、IL-2ポリペプチドは、配列番号5に少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸を有し、AzKは、配列番号5のアミノ酸位置に参照する、K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69、またはL72の位置にあるアミノ酸に置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、ポリエチレングリコール (PEG)を含むコンジュゲート部分に共有結合したN6-アジドエトキシ-L-リジン (AzK)を含むIL-2ポリペプチドを含むIL-2コンジュゲートであり、IL-2ポリペプチドは、配列番号5に少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸を有し、AzKは、配列番号5のアミノ酸位置に参照する、K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69、またはL72の位置にあるアミノ酸に置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、ポリエチレングリコール (PEG)を含むコンジュゲート部分に共有結合したN6-アジドエトキシ-L-リジン (AzK)を含むIL-2ポリペプチドを含むIL-2コンジュゲートであり、IL-2ポリペプチドは、配列番号5に少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸を有し、AzKは、配列番号570のアミノ酸位置に参照する、K35、F42、F44、K43、E62、P65、R38、T41、E68、Y45、V69、またはL72の位置にあるアミノ酸に置換する。

【0672】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、Alkermes, Incから入手可能である、ALKS-4230(配列番号571)としても知られるNemval leukinアルファである。Nemval leukinアルファは、グリコシル化されたチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞で産生される、ペプチジルリンカー( ${}^6{}^0GG{}^6{}^1$ )を介してヒトインターロイキン2フラグメント(62-132)に融合、ペプチジルリンカー( ${}^1{}^3{}^3GS GGGS{}^1{}^3{}^8$ )を介してヒトインターロイキン2受容体鎖断片(139-303)に融合した、ヒトインターロイキン2断片(1-59)、バリエーション(Cys ${}^1{}^2{}^5$ >Ser ${}^5{}^1$ ) ; チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、グリコフォームアルファで産生される、G<sub>2</sub>ペプチドリンカー(60-61)を介してヒトインターロイキン2(IL-2)(4-74)-ペプチド(62-132)に融合、及びGS G<sub>3</sub>Sペプチドリンカー(133-138)を介してヒトインターロイキン2受容体鎖(IL2Rサブユニットアルファ、IL2R、IL2RA)(1-165)-ペプチド(139-303)に融合した、ヒトインターロイキン2((IL-2)(75-133)-ペプチド[Cys ${}^1{}^2{}^5$ (51)>Ser]-mutant(1-59))としても知られる。nemval leukinアルファのアミノ酸配列は、配列番号571に示される。いくつかの実施形態では、nemval leukinアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：位置：31~116、141~285、184~242、269~301、166~197または166~199、168~199または168~197でのジスルフィド架橋(配列番号571の番号付けを使用)、及び配列番号571の番号付けを使用した位置：N187、N206、T212でのグリコシル化。nemval leukinアルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に適したIL-2のさらなる代替形態は、米国特許出願公開第US2021/0038684A1及び米国特許第10,183,979号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、配列番号571に対して、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、配列番号571で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、配列番号572のアミノ酸24~452を含む、融合タンパク質、もしくはそのバリエーション、断片、または誘導体である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、配列番号572のアミノ酸24~452に対して、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、融合タンパク質、もしくはそのバリエーション、断片、または誘導体である。本発明での使用に適した他のIL-2形態は、米国特許第10,183,979号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。場合により、いくつかの実施形態では、本発明での使用に適したIL-2形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第2の融合パートナーに連結された第1の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第1の融合パートナーは、IL-1Rであるか、またはIL-1Rと少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有し、IL-Rの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第2の融合パートナーは、Fc領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインがポリペプチドリンカーは配列番号573、または配列番号573に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、第1の融合パートナーを、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第2の融合パートナーと比較した場合に改善されている。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 3 組換えヒト IL-2(rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSSET TFMCEYADET ATIVEFLNLRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号 5 組換えヒト IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLC TELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREYKSKCSS 130
配列番号 6 組換えヒト IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHCIDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTIIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKRLNDLC FLKRLLEQEI TCWNKILMGT KEH 153
配列番号 7 組換えヒト IL-15 (rhIL-15)	MNWNVISDL KKIIDLQISM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHVQM FINTS 115
配列番号 8 組換えヒト IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMRLQIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERLIINVI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132
配列番号 570 IL-2 形態	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 571 IL-2 形態	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGSETTFM CEYADETATI VEFLNRWITF SQSIISTLTG 60 GSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE 120 LKPLEEVLNL AQGGGGSEL CDDDPPEIPH ATFKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRIKSGSL 180 YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNTTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG 240 HCREPPPWEN EATERIYHFV VGMVYVYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI 300 CTG 303
配列番号 572 IL-2 形態	MDAMKRGICC VLLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG 60 PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKML SCVKSGETR LQLEAVNITD LSENKQDKR 120 FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMVTKFY FQDESGSGG 180 ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPPCPAPELL 240 GGPSVFLFPP KPKDILMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR 360 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTT PVLDLSDGSF FLYSKLTVDK 420 SRWQQGNVFS CSMVHEALHN HYTKSLSLS PGK 453
配列番号 573 ムチンドメイン ポリペプチド	SESSASSDGP HPVITP 16

10

20

30

40

【 0 6 7 3 】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に適した IL - 2 形態は、相補性決定領域 HCDR 1、HCDR 2、HCDR 3 を含む、重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) を含む抗体サイトカイン移植タンパク質と、LCDR 1、LCDR 2、LCDR 3 を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) と、V<sub>H</sub> または V<sub>L</sub> の CDR に移植された IL - 2 分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性 T 細胞よりも Tエフェクター細胞を優先的に増殖させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域 HCDR 1、HCDR 2、HCDR 3 を含む、重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) を含む抗体サイトカイン移植タンパク質と、LCDR 1、LCDR 2、LCDR 3 を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>

50

)と、 $V_H$ または $V_L$ のCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、IL-2分子はムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に増殖させる。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、米国特許出願公開第US2020/0270334号に記載の抗体の投与を含み、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域( $V_H$ )と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域( $V_L$ )と、 $V_H$ または $V_L$ のCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、IL-2分子はムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に増殖させ、抗体はさらに、配列番号569を含むIgGクラス軽鎖及び配列番号568を含むIgGクラス重鎖、配列番号567を含むIgGクラス軽鎖及び配列番号559を含むIgGクラス重鎖、及び配列番号37を含むIgGクラス軽鎖及び配列番号568を含むIgGクラス重鎖からなる群から選択される、IgGクラスの重鎖及びIgGクラスの軽鎖を含む。

10

#### 【0674】

いくつかの実施形態では、IL-2分子またはその断片は、 $V_H$ のHCDR1に移植され、IL-2分子はムテインである。いくつかの実施形態では、IL-2分子またはその断片は、 $V_H$ のHCDR2に移植され、IL-2分子はムテインである。いくつかの実施形態では、IL-2分子またはその断片は、 $V_H$ のHCDR3に移植され、IL-2分子はムテインである。いくつかの実施形態では、IL-2分子またはその断片は、 $V_L$ のLCDR1に移植され、IL-2分子はムテインである。いくつかの実施形態では、IL-2分子またはその断片は、 $V_L$ のLCDR2に移植され、IL-2分子はムテインである。いくつかの実施形態では、IL-2分子またはその断片は、 $V_L$ のLCDR3に移植され、IL-2分子はムテインである。

20

#### 【0675】

IL-2分子の挿入は、CDRのN末端領域またはその近く、CDRの中央領域またはCDRのC末端領域またはその近くであり得る。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、CDRに組み込まれたIL-2分子を含み、IL2配列はCDR配列をフレームシフトしない。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、CDRに組み込まれたIL-2分子を含み、IL2配列はCDR配列の全てまたは一部を入れ替える。IL-2分子による置換は、CDRのN末端領域またはその近く、CDRの中央領域またはCDRのC末端領域またはその近くであり得る。IL-2分子による置換は、CDR配列のわずか1個または2個のアミノ酸であるか、またはCDR配列全体であり得る。

30

#### 【0676】

いくつかの実施形態では、IL-2分子は、ペプチドリンカーなしで、CDR配列とIL-2配列との間に追加のアミノ酸なしで、CDRに直接移植される。いくつかの実施形態では、IL-2分子は、ペプチドリンカーを用い、CDR配列とIL-2配列との間に追加のアミノ酸ありで、CDRに間接的に移植される。

40

#### 【0677】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のIL-2分子はIL-2ムテインである。場合によっては、IL-2ムテインは、R67A置換を含む。いくつかの実施形態では、IL-2ムテインは、アミノ酸配列番号544または配列番号545を含む。いくつかの実施形態では、IL-2ムテインは、米国特許出願公開第US2020/0270334号の表1のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0678】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号546、配列番号549、配列番号552及び配列番号555からなる群から選択されるHCDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号7、配列

50

番号10、配列番号543及び配列番号546からなる群から選択されるHCDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号547、配列番号550、配列番号553及び配列番号556からなる群から選択されるHCDR2からなる群から選択されるHCDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号548、配列番号551、配列番号554及び配列番号557からなる群から選択されるHCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号558のアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号559のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号566のアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号567のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号28のアミノ酸配列を含むV<sub>H</sub>領域と、配列番号566のアミノ酸配列を含むV<sub>L</sub>領域と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号559のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号567のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号559のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号569のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号568のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号567のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号568のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号569のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、米国特許出願公開第2020/0270334A1号のIgG・IL2F71A・H1またはIgG・IL2R67A・H1またはそのパリアント、誘導體、もしくは断片、またはその保存的アミノ酸置換、またはそれに対して少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の配列同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質の抗体成分は、免疫グロブリン配列、フレームワーク配列、またはパリピズマブのCDR配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキンまたは同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型IL-2分子よりも長い血清半減期を有する。

10

20

30

40

50

## 【表 3 - 1】

表 3 : 例示的なパリビズマブ抗体 - I L - 2 移植タンパク質の配列

識別子米国 2020/02703 34	配列番号	配列	
配列番号 2 IL-2	配列番号 543 IL-2	MYRQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN 50 YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL 100 RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS 150 TLT 153	
配列番号 4 IL-2 ムテイン	配列番号 544 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA 50 TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 100 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133	10
配列番号 6 IL-2 ムテイン	配列番号 545 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA 50 TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 100 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133	
IgG.IL2R67 A.H1	IgG.IL2R 67A.H1		20
配列番号 7 HCDR1_IL-2	配列番号 546 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSS TKKTQLQLEH LLLDLQMIIN GINNYKNPKL TAMLTFKFYM 50 PKKATELKH L QCLEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTGMSVG 145	
配列番号 8 HCDR2	配列番号 547 HCDR2	DIWWDDKKDY NPSLKS 16	
配列番号 9 HCDR3	配列番号 548 HCDR3	SMITNWFYFDV 10	30
SEQIDNO: 10 HCDR1_IL-2 kabat	配列番号 549 HCDR1_IL-2 kabat	TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 100 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141	
配列番号 11 HCDR2 kabat	配列番号 550 HCDR2 kabat	DIWWDDKKDY NPSLKS 16	40

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

配列番号 12 HCDR3 kabat	配列番号 551 HCDR3 kabat	SMITNWFYDV 10	
配列番号 13 HCDR1_IL- 2 clothia	配列番号 552 HCDR1_I L-2 clothia	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMI LN GINNYKNPKL TAMLTFK FYM 50 PKKATELKHL QCLEEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142	10
配列番号 14 HCDR2 clothia	配列番号 553 HCDR2 clothia	WWDDK 5	
配列番号 15 HCDR3 clothia	配列番号 554 HCDR3 clothia	SMITNWFYDV 10	20
配列番号 16 HCDR1_IL- 2IMGT	配列番号 555 HCDR1_I L-2IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMI LN GINNYKNPKL TAMLTFK FYM 50 PKKATELKHL QCLEEEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINVIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143	
配列番号 17 HCDR2IM GT	配列番号 556 HCDR2I MGT	IWWDDK 7	
配列番号 18 HCDR3IM GT	配列番号 557 HCDR3I MGT	ARSMITNWFY DV 12	30

【表 3 - 3】

配列番号 19 VH	配列番号 558 VH	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL 50 QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWDD KKDYNSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT 250 VSS 253	
配列番号 21 重鎖	配列番号 559 重鎖	QMILNGINNY KNPKLTAMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWDD KKDYNSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWYF DVWGAGTTVT 250 VSSASTGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 350 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV 400 AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL 450 NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS 500 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK 550 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK 583	10
配列番号 26 LCDR1 kabat	配列番号 560 LCDR1 kabat	KAQLSVGYMH 10	
配列番号 27 LCDR2 kabat	配列番号 561 LCDR2 kabat	DTSKLAS 7	20
配列番号 28 LCDR3 kabat	配列番号 562 LCDR3 kabat	FQSGYPFT 9	
配列番号 29 LCDR1 chothia	配列番号 563 LCDR1 chothia	QLSVGY 6	30
配列番号 30 LCDR2 chothia	配列番号 564 LCDR2 chothia	DTS 3	

【表 3 - 4】

配列番号 31 LCDR3 chothia	配列番号 565 LCDR3 chothia	GSGYPF 6	
配列番号 35 VL	配列番号 566 VL	DIQMTQSPST LSASVGDVRT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIK 106	
配列番号 37 軽鎖	配列番号 567 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDVRT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213	10
配列番号 53 軽鎖	配列番号 568 軽鎖	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL 50 QMILNGINNY KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWDD KKDYNP SLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWFY DVWAGATTVT 250 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 350 VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV 400 AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTIVLHQDWL 450 NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS 500 LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PVLDSDSGSF FLYSKLTVDK 550 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLSL PGK 583	20
配列番号 69 軽鎖	配列番号 569 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGDVRT ITCKAQLSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213	

【0679】

「IL-4」(本明細書では「IL4」とも称される)という用語は、インターロイキン4として知られるサイトカインを指し、Th2T細胞によって、ならびに好酸球、好塩基球、及びマスト細胞によって産生される。IL-4はナイーブヘルパーT細胞(Th0細胞)からTh2T細胞への分化を調節する。Steinke and Borish, Respir. Res 2001, 2, 66-70。IL-4によって活性化されると、Th2T細胞は続いて正のフィードバックループで追加のIL-4を産生する。IL-4はまた、B細胞の増殖とクラスII MHCの発現を刺激し、B細胞からのIgE及びIgG<sub>1</sub>の発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に適した組換えヒトIL-4は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-211)及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-15組換えタンパク質、Cat. No. Gibco CTP0043)を含む複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に適した組換えヒトIL-4のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号5)。

30

40

【0680】

「IL-7」(本明細書では「IL7」とも称される)という用語は、インターロイキン7として知られるグリコシル化された組織由来のサイトカインを指し、間質細胞及び上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。IL-7はT細胞の発生を刺激することができる。IL-7は、IL-7受容体アルファ及び共通ガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるIL-7受容体に結合し、これは胸腺内でのT細胞の発生と末梢内での生存に

50

重要な一連のシグナルである。本発明での使用に適した組換えヒトIL-7は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-254) 及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-15組換えタンパク質、Cat. No. GibcoPHC0071) を含む複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に適した組換えヒトIL-7のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号6)。

【0681】

「IL-15」(本明細書では「IL15」とも称される)という用語は、インターロイキン-15として知られるT細胞増殖因子を指し、ヒト及び哺乳類の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー、及びそのバリエーションを含む、IL-2のすべての形態を含む。IL-15は、例えば、Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-15は、及びシグナル受容体サブユニットをIL-2と共有している。組換えヒトIL-15は、分子量12.8kDaの、114のアミノ酸(及びN末端メチオニン)を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトIL-15は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. 組換えヒトIL-15) 及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-15組換えタンパク質、Cat. No. 34-8159-82) を含む複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に適した組換えヒトIL-15のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号7)。

【0682】

「IL-21」(本明細書では「IL21」とも称される)という用語は、インターロイキン-21として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳類の形態、保存的アミノ酸置換、グリコフォーム、バイオシミラー、及びそのバリエーションを含む、IL-21のすべての形態を含む。IL-21は、例えば、Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-21は、主にナチュラルキラーT細胞及び活性化されたヒトCD4<sup>+</sup>T細胞によって産生される。組換えヒトIL-21は、分子量15.4kDaの、132のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトIL-21は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-408-b) 及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (ヒトIL-21組換えタンパク質、Cat. No. 14-8219-80) を含む複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に適した組換えヒトIL-21のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号8)。

【0683】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍抑制有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、医師が個人の年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染または転移の程度、及び患者(対象)の状態の違いを考慮して決定することができる。一般に、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球(例えば、二次TILまたは遺伝子改変細胞障害性リンパ球)を含む医薬組成物は、 $10^4 \sim 10^{11}$ 細胞/kg体重(例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^5 \sim 10^{10}$ 、 $10^5 \sim 10^{11}$ 、 $10^6 \sim 10^{10}$ 、 $10^6 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{10}$ 、 $10^8 \sim 10^{11}$ 、 $10^8 \sim 10^{10}$ 、 $10^9 \sim 10^{11}$ 、または $10^9 \sim 10^{10}$ 細胞/kg体重)の用量で投与され得、これらの範囲内のすべての整数値を含むと言うことができる。腫瘍浸潤リンパ球(場合によっては、遺伝子改変された細胞障害性リンパ球を含む)組成物も、これらの投与量で複数回投与することができる。腫瘍浸潤リンパ球(場合によっては、遺伝子改変された細胞障害性リンパ球を含む)は、免疫療法で一般的に知られている注入技術を使用して投与することができる(例えば

、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照のこと)。特定の患者に対する最適な用量及び治療レジメンは、疾患の徴候について患者を監視し、適宜に治療を調整することによって、医学の当業者が容易に決定することができる。

【0684】

「血液悪性腫瘍 (hematological malignancy)」、「血液悪性腫瘍 (hematologic malignancy)」という用語、または関連する意味の用語は、血液、骨髄、リンパ節、及びリンパ系の組織を含むがこれらに限定されない、哺乳動物のがん及び造血組織及びリンパ組織の腫瘍を指す。血液悪性腫瘍は、「液性腫瘍」とも称される。血液悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ球性リンパ腫 (CLL)、小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性単球性白血病 (AMoL)、ホジキンリンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。「B細胞血液悪性腫瘍」という用語は、B細胞に影響を及ぼす血液悪性腫瘍を指す。

10

【0685】

「固形腫瘍」という用語は、通常嚢胞または液状領域を含まない組織の異常な塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、または癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺、乳房、前立腺、結腸、直腸、及び膀胱のがんなどの肉腫、癌腫、及びリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。固形腫瘍の組織構造には、実質 (がん細胞) と、がん細胞が分散し、支持微小環境を提供する支持間質細胞とを含む、相互依存性の組織コンパートメントが含まれる。

20

【0686】

「液性腫瘍」という用語は、本質的に液体である細胞の異常な塊を指す。液性腫瘍癌には、白血病、骨髄腫、及びリンパ腫、ならびに他の血液悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。液性腫瘍から得られたTILはまた、本明細書において骨髄浸潤リンパ球 (MIL) と称され得る。末梢血中を循環する液性腫瘍を含む液性腫瘍から得られるTILは、本明細書ではPBLとも称され得る。MIL、TIL、及びPBLという用語は、本明細書では交換可能に使用され、細胞が由来する組織タイプに基づいてのみ異なる。

【0687】

本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形または血液腫瘍の微小環境、または微小環境内の細胞の個々のサブセットを指し得る。本明細書で使用される腫瘍微小環境とは、Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473に記載されているように、「腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍の増殖と浸潤をサポートし、宿主免疫から腫瘍を保護し、治療抵抗性を促進する細胞、水溶性因子、シグナル伝達分子、細胞外マトリックス、及び機械的合図」の複雑な混合物を指す。腫瘍はT細胞によって認識されるべき抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍クリアランスはまれである。

30

【0688】

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるTILの注入前に、非骨髄破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、TIL集団が提供され得、患者は、本発明によるTILの注入前に非骨髄破壊的化学療法で前処置される。いくつかの実施形態では、非骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日を2日間 (TIL注入前の27及び26日目) 及びフルダラビン25mg/m<sup>2</sup>/日を5日間 (TIL注入の27~23日目) である。いくつかの実施形態では、非骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日を2日間 (TIL注入前の27及び26日目) 及びフルダラビン25mg/m<sup>2</sup>/日を3日間 (TIL注入の27~25日目) である。いくつかの実施形態では、非骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日を2日間 (TIL注入前の27及び26日目) 及びフルダラビン25mg/m<sup>2</sup>/日を3日間 (TIL注入の25~23日目) である。いくつかの実施形態では、本発明による非骨髄破壊的化学療法及びTIL注

40

50

入の後（0日目）、患者は、720,000 IU/kgで生理学的許容範囲まで8時間ごとに静脈内にIL-2の静脈内注入を受ける。

【0689】

実験結果は、腫瘍特異的Tリンパ球の養子移入前のリンパ枯渇が、制御性T細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することにより、治療効果を高める上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のrTILを導入する前に、患者に対してリンパ枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」とも称される）を利用する。

【0690】

本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与する」、「組み合わせて投与される」、「組み合わせて投与する」、「同時（simultaneous）」、及び「同時（concurrent）」という用語は、2つ以上の活性医薬品成分（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のTILと組み合わせた少なくとも1つのカリウムチャンネルアゴニスト）の対象への投与を包含し、そのため活性医薬品成分及び/またはそれらの代謝物が同時に対象に存在する。同時投与は、別々の組成物での同時の投与、別々の組成物の異なる時点での投与、または2つ以上の活性医薬品成分が存在する一組成物での投与を含む。別々の組成物での同時の投与、及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。

10

【0691】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患治療を含むがこれに限定されない意図された適用を達成するのに十分な量の、本明細書に記載の化合物または化合物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図する適用（インビトロまたはインビボ）、または治療される対象及び疾患の状態（例えば、対象の体重、年齢及び性別）、疾患状態の重症度、または投与方法に応じて異なり得る。この用語は、標的細胞に特定の応答を誘発する用量にも適用される（例えば、血小板接着及び/または細胞移動の減少）。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投薬計画、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、投与される組織、及び化合物が運ばれる物理的送達システムに応じて変化し得る。

20

【0692】

本明細書で使用される「治療」、「治療すること」、「治療する」等の用語は、所望の薬理的及び/または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に防止するという観点において予防的であり、及び/または疾患及び/またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治癒という観点において治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を包含し、（a）その疾患にかかりやすいか、その疾患にかかる危険性を有し得るが、まだそれを有すると診断されていない対象における発病を予防すること、（b）その疾患を阻害すること、すなわち、その発現または進行を阻止すること、及び（c）その疾患を軽減すること、すなわち、その疾患の退行及び/または軽減させることを含む。「治療」はまた、疾患または状態がなくても、薬理的効果を提供するための薬剤の送達を包含することを意味する。例えば、「治療」は、例えばワクチンの場合に、疾患状態の非存在下で免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

30

40

【0693】

核酸またはタンパク質の一部に関して使用される場合、「異種」という用語は、その核酸またはタンパク質が、性質上お互いに同じ関係では見出されない2つ以上の配列または部分配列を含むことを示す。例えば、典型的には、核酸は、新しい機能的核酸を作製するように配置された無関係の遺伝子由来の2つ以上の配列、例えば、一方のソース由来のプロモータ及び他方のソース由来のコード領域、または異なるソースからのコード領域を有するよう組換え生産される。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、天然では互いに同じ関係で見出されない2つ以上の部分配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

50

## 【0694】

2つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「パーセント同一性」、及び「配列パーセント同一性」（またはその同義語、例えば「99%同一」という用語は、配列同一性の一部として保存的アミノ酸置換を考慮せずに、最大的一致を得るために比較及び整列（必要に応じてギャップを導入）した場合に、同一であるか、明示されたパーセンテージの同じヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。パーセント同一性は、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用できる様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当技術分野で知られている。パーセント配列同一性を決定するための適切なプログラムには、例えば、米国政府の国立バイオテクノロジー情報センターBLASTウェブサイトから入手可能なプログラムのBLASTスイートが含まれる。2つの配列間の比較は、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを使用して行うことができる。BLASTNは核酸配列の比較に使用され、BLASTPはアミノ酸配列の比較に使用される。DNASTARから入手可能なALIGN、ALIGN-2 (Genentech、South San Francisco、California) またはMegAlignは、配列を整列させるために使用できる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者は、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

10

20

## 【0695】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、参照抗体、タンパク質、または融合タンパク質のアミノ酸配列内または隣接するある特定の位置での、1つまたは複数の置換、削除及び/または付加による参照タンパク質、抗体または融合タンパク質のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含むタンパク質、抗体または融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。バリエーションは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に1つまたは複数の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電したまたは荷電していないアミノ酸の置換を含み得る。バリエーションは、参照抗体、タンパク質、または融合タンパク質の抗原に特異的に結合する能力を保持する。バリエーションという用語には、ペグ化抗体またはタンパク質も含まれる。

30

## 【0696】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「TIL」とは、対象の血流を離れて腫瘍内に移動した白血球として最初に得られた細胞の集団を意味する。TILにはCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞（リンパ球）、Th1及びTh17CD4<sup>+</sup>T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、M1マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。TILには、一次TIL及び二次TILの両方が含まれる。「一次TIL」は、本明細書に概説されるように患者の組織サンプルから得られるものであり（「新たに得られた」または「新たに単離された」と称され得る）、「二次TIL」は、本明細書で考察されるように、増殖または増殖された任意のTIL細胞集団であり、本明細書で考察されるように、バルクTIL及び増殖されたTIL（「REP TIL」）、ならびに「reREP TIL」を含むがこれらに限定されない。reREP TILは、例えば、第2の増殖TILまたは第2の追加増殖TIL（例えば、reREP TILと称されるTILを含む、図1のステップDで説明したものなど）を含むことができる。

40

## 【0697】

TILは一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に、または腫瘍に浸潤し治療に影響を与える能力によって機能的に定義することができる。TILは一般に、CD4、CD8、TCR、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1、及びCD25のバイオマーカーの1つまたは複数を発現することによって分類することができる。加えて、または代替として、TILは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力によって機能的に定義することができる。TILは効力によってさらに

50

特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（IFN）の放出が約50 pg/mL超、約100 pg/mL超、約150 pg/mL超、または約200 pg/mL超の場合に、TILは効力があると見なされ得る。例えば、インターフェロン（IFN）の放出が約50 pg/mL、約100 pg/mL超、約150 pg/mL超、または約200 pg/mL超、約300 pg/mL超、約400 pg/mL超、約500 pg/mL超、約600 pg/mL超、約700 pg/mL超、約800 pg/mL超、約900 pg/mL超、約1000 pg/mL超の場合に、TILは効力があるとみなされ得る。

【0698】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むことが意図される。このような薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤を活性医薬品成分に使用することは、当技術分野で周知である。従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が活性医薬品成分と不適合である場合を除いて、本発明の治療組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の活性医薬品成分も、記載の組成物及び方法に組み込むことができる。

10

【0699】

「約」及び「およそ」という用語は、統計的に意味のある範囲内の値を意味する。そのような範囲は、所与の値または範囲の一桁以内、好ましくは50%以内、より好ましくは20%以内、より好ましくは10%以内、さらにより好ましくは5%以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容変動は、試験中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解され得る。さらに、本明細書で使用される「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、処方、パラメータ、形状、及び他の量及び特性が正確ではなく、かつ正確である必要もなく、必要に応じて、公差、換算係数、丸め、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、近似及び/またはより大きくまたはより小さくあってよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、処方、パラメータ、形状、またはその他の量または特性は、そのように明示的に述べられているかどうかに関わらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が、記載された構成を採用し得ることに留意されたい。

20

【0700】

「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行句は、元の形式及び修正された形式で、添付の特許請求の範囲で使用される場合、何の記載されていない追加の請求項要素またはステップが特許請求の範囲から除外されるのか否かに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的または非限定的あることを意図しており、いかなる追加の記載されていない要素、方法、ステップ、または材料も除外するものではない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で特定されたもの以外の要素、ステップ、または材料を除外し、後者の場合、指定された材料に通常関連する不純物を除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定された要素、ステップ、または材料（複数可）ならびに請求される発明の基本的及び新規な特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないものに限定する。本発明を具現化する本明細書に記載のすべての組成物、方法、及びキットは、代替の実施形態において、「含む」、「本質的になる」、「及び「からなる」のいずれかの移行句によってより具体的に定義することができる。

30

40

【0701】

II. TIL製造プロセス（Gen3プロセスの実施形態、任意に限定培地を含む）

本明細書に記載された方法に加えて、国際出願第PCT/US2019/059718号がすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いかなる特定の理論にも限定されるものではないが、本発明の方法に記載されるように、T細胞の活性化をプライミングする第1の増殖のプライミングと、それに続くT細胞の活性化を促進する急速な第2の増殖が、「より若い」表現型を保持する、増殖させたT細胞の調製を可能にすると考えられており、したがって、本発明の増殖されたT細胞は、他の方法によって増殖されたT細胞よりも癌細胞に対してより大きな細胞毒性を示すことが期待される。特

50

に、抗CD3抗体（例えば、OKT-3）、IL-2及び任意に抗原提示細胞（APC）  
 、またはIL-2及び抗CD3抗体（例えば、OKT-3）を補充したAPCの第1の培  
 養により得た、第1の培養上清への暴露によりプライミングされ、その後、追加の抗CD  
 -3抗体（例えば：OKT-3）、IL-2及びAPCに、または追加のIL-2及び抗  
 CD3抗体（例えば、OKT-3）を補充したAPCの第2の培養より得た、第2の培養  
 上清への後続の暴露によりブーストされるT細胞の活性化は、本発明の方法によって教示  
 されるように、培養中のT細胞の成熟を制限または回避し、成熟度の低い表現型を有する  
 T細胞の集団を生じ、このT細胞は、培養中の増殖による消耗が少なく、がん細胞に対し  
 てより大きな細胞毒性を示すと考えられている。いくつかの実施形態では、迅速な第2の  
 増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアップを達成  
 する：（a）第1の容器、例えば、G-REX100MCS容器中の小規模培養物のT細胞を、約3～4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで（b）  
 小規模培養物中のT細胞の、第1の容器よりも大きな第2の容器、例えば、G-REX5  
 00MCS容器への移動をもたらし、第2の容器中の大規模培養物中の小規模培養からT  
 細胞を、約4～7日間、培養する。いくつかの実施形態では、急速増殖のステップは複数  
 のステップに分割され、以下によって培養物のスケールアウトを達成する：（a）第1の  
 容器、例えば、G-REX100MCS容器中の、第1の小規模培養物のT細胞を、約3  
 ～4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで（b）T細胞の第  
 1の小規模培養物から第1の容器とサイズが一緒である少なくとも2、3、4、5、6、  
 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または2  
 0の第2の容器中への移動及び割り当てをもたらし、各第2の容器中で、係る第2の容器  
 に移動された第1の小規模培養物からのT細胞の一部が、約4～7日間、第2の小規模培  
 養物中で培養される。いくつかの実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに  
 分割され、以下によって培養物のスケールアウトを達成する：（a）第1の容器、例えば  
 、G-REX100MCS容器中の、小規模培養物のT細胞を、約3～4日間、培養する  
 ことによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで（b）T細胞の第1の小規模培養物か  
 ら第1の容器よりもサイズが大きい、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10  
 、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20の第2の容器中  
 、例えば、G-REX500MCS容器、への移動及び割り当てをもたらし、各第2の容  
 器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からのT細胞の一部が、約4～7日間  
 、規模の大きい培養物中で培養される。いくつかの実施形態では、急速増殖のステップ  
 は複数のステップに分割され、以下によって培養物のスケールアウトを達成する：（a）  
 第1の容器、例えば、G-REX100MCS容器中の、小規模培養物のT細胞を、4日  
 間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで（b）T細胞の第1の小  
 規模培養物から第1の容器よりもサイズが大きい、2、3、または4の第2の容器中、例  
 えば、G-REX500MCS容器、への移動及び割り当てをもたらし、各第2の容器中  
 で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からのT細胞の一部が、約5日間、規模の  
 大きい培養物中で培養される。

【0702】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングによっても  
 たらされたT細胞の活性化が減少、減退、減衰または鎮静し始めた後に行われる。

【0703】

いくつかの実施形態において、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングによっ  
 てもたらされたT細胞の活性が、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、1  
 2、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25  
 、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、  
 39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、5  
 2、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65  
 、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、  
 79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、9

2、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100%、または、およそその%減少した後に実施される。

【0704】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングによってもたらされたT細胞の活性が、約1%~100%、または、およそその%減少した後に実施される。

【0705】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングによってもたらされたT細胞の活性が、約1%~10%、10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、もしくは90%~100%、または、およそその%の範囲で減少した後に実施される。

10

【0706】

いくつかの実施形態において、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングによってもたらされたT細胞の活性が、少なくともまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、もしくは99%、または、およそその%減少した後に実施される。

20

【0707】

いくつかの実施形態において、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングによって影響を受けたT細胞の活性が、最大約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100%、または、最大およそその%減少した後に実施される。

30

【0708】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングによってもたらされたT細胞の活性の減少は、抗原による刺激に应答してT細胞によって放出されるインターフェロンガンマの量の減少によって決定される。

【0709】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、最大7日または8日、または最大およそその日数の期間にわたって実施される。

40

【0710】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、最大1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日または最大およそその日数の期間にわたって実施される。

【0711】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日間にわたって実施される。

【0712】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の増殖は、最大11日間または最大およ

50

そその期間にわたって実施される。

【0713】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の増殖は、最大1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日もしくは11日間、または最大およそその期間にわたって実施される。

【0714】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の増殖は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日または11日間にわたって実施される。

【0715】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、1日～7日間またはおよそその期間にわたって実施され、T細胞の急速な第2の増殖は、1日～11日間、またはおよそその期間にわたって実施される。 10

【0716】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、最大1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日または最大およそその日数の期間にわたって行われ、T細胞の急速な第2の増殖は、最大1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、もしくは11日間、またはおよそその日数の期間にわたって実施される。

【0717】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、1日～8日間またはおよそその期間にわたって実施され、T細胞の急速な第2の増殖は、1日～9日間、またはおよそその期間にわたって実施される。 20

【0718】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは8日間実施され、T細胞の急速な第2の増殖は9日間実施される。

【0719】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは、1日～約7日間またはおよそその期間にわたって実施され、T細胞の急速な第2の増殖は、1日～約9日間、またはおよそその期間にわたって実施される。

【0720】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の増殖のプライミングは7日間実施され、T細胞の急速な第2の増殖は9日間実施される。 30

【0721】

いくつかの実施形態では、T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)である。

【0722】

いくつかの実施形態では、T細胞は、髄浸潤リンパ球(MIL)である。

【0723】

いくつかの実施形態では、T細胞は、末梢血リンパ球(PBL)である。

【0724】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん罹患しているドナーから得られる。 40

【0725】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん罹患している患者から切除された腫瘍から得られるTILである。

【0726】

いくつかの実施形態では、T細胞は、血液悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から得られたMILである。

【0727】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナーからの末梢血単核細胞(PBMC)から得られるPBLである。いくつかの実施形態では、ドナーはがん罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、大腸癌、子宮頸癌、 50

非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液性腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは血液悪性腫瘍に罹患している。

【0728】

本公開のある特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、Ficoll分離などの当業者に既知の任意の数の技法を使用して対象から収集される血液単位から得られ得る。ある好ましい実施形態では、個体の循環血液由来の細胞は、アフレーシスによって得られる。アフレーシス産物は、典型的には、T細胞を含むリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球細胞、赤血球細胞、及び血小板を含有する。一態様では、アフレーシスによって収集された細胞を、洗浄して血漿画分を除去する、任意に、細胞をその後の処理ステップに適切な緩衝液または培地中に置くことができる。一実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。代替的な実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得、または全てではないが多くの二価陽イオンを欠き得る。一態様では、T細胞は、赤血球細胞を溶解し、例えば、Percoll勾配による遠心分離または向流遠心分離水簸によって単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から単離される。

【0729】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナーからの全血またはリンパ球が濃縮されたアフレーシス産物から分離したPBLである。いくつかの実施形態では、ドナーはがん罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、大腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液性腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは血液悪性腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、T細胞表現型の場合、正のまたは負の選択法を使用することによって、すなわち、マーカー、例えば、CD3+CD45+を使用して、全血またはリンパ球が濃縮されたアフレーシス産物からPBLを単離する、または非T細胞表現型細胞を除去してPBLを残す。他の実施形態では、PBLを勾配遠心分離によって単離する。ドナー組織からPBLが単離されると、PBLの第1の増殖のプライミングを、本明細書に記載の方法のいずれかの第1の増殖のプライミングステップに従って、第1の増殖のプライミング培養物中に、好適な数の単離したPBL（いくつかの実施形態では、およそ $1 \times 10^7$  PBL）を播種することによって開始することができる。

【0730】

これらの特徴のいくつかを含むプロセス3（本明細書ではGEN3またはGen3とも称される）として知られる例示的なTILプロセスを、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に示し、プロセス2Aに対する本発明のこの実施形態の利点のいくつかを、図1及び2（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に記載する。プロセス3の2つの実施形態を、図1及び30（特に、例えば、図1B

10

20

30

40

50

及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示す。プロセス 2 A または Gen 2 は、米国特許公報第 2 0 1 8 / 0 2 8 0 4 3 6 号及び同第 2 0 1 9 / 0 2 3 1 8 2 0 号に記載されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 7 3 1 】

本明細書で論じ、概説するように、T I L は、患者サンプルから採取され、本明細書に記載され、Gen 3 と称される T I L 増殖プロセスを使用して、患者に移植する前にその数を増加させるように操作される。いくつかの実施形態では、T I L は以下で説明するように任意に操作される。いくつかの実施形態では、T I L は、増殖の前または後に凍結保存され得る。いったん解凍したら、患者に注入する前に再刺激して代謝を高めることもできる。

10

【 0 7 3 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミング (本明細書において、プレ急速増殖 ( P r e - R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ B として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) が、1 ~ 8 日に短縮され、急速な第 2 の増殖 (本明細書において、急速増殖プロトコル ( R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ D として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) が、1 ~ 9 日に短縮され、これらは以下ならびに実施例及び図において詳述される。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミング (本明細書において、(本明細書において、プレ急速増殖 ( P r e - R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ B として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) が、1 ~ 8 日間に短縮され、急速な第 2 の増殖 (本明細書において、急速増殖プロトコル ( R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ D として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) が、1 ~ 8 日間に短縮され、これらは以下ならびに実施例及び図において詳述される。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミング (本明細書において、プレ急速増殖 ( P r e - R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ B として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) が、1 ~ 7 日間に短縮され、急速な第 2 の増殖 (本明細書において、急速増殖プロトコル ( R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ D として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) が、1 ~ 9 日間に短縮され、これらは以下ならびに実施例及び図において詳述される。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミング (本明細書において、プレ急速増殖 ( P r e - R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ B として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) は、1 ~ 7 日間であり、急速な第 2 の増殖 (本明細書において、急速増殖プロトコル ( R E P ) と称されるプロセス、ならびに、ステップ D として、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に示されるプロセスを含む) は、1 ~ 1 0 日間であり、これらは以下ならびに実施例及び図において詳述される。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミング (例えば、図 1 のステップ B (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に記述される増殖) は 8 日間に短縮され、急速な第 2 の増殖 (例えば、図 1 のステップ D (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に記述される増殖) は 7 ~ 9 日間である。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミング (例えば、図 1 のステップ B (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G ) に記述される増殖

20

30

40

50

)は8日間であり、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は8~9日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7日間に短縮され、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7~8日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は8日間に短縮され、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は8日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は8日間であり、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は9日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は8日間であり、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は10日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7日間であり、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7~10日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7日間であり、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は8~10日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7日間であり、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は9~10日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング(例えば、図1のステップB(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7日間に短縮され、急速な第2の増殖(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)は7~9日間である。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングと急速な第2の増殖(例えば、図1のステップB及びステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記述される増殖)の組み合わせは14~16日間であり、これらは以下ならびに実施例及び図において詳述される。特に、本発明のある特定の実施形態は、IL-2の存在下での抗CD3抗体、例えばOKT-3、への曝露、または少なくともIL-2及び抗CD3抗体、例えばOKT3、の存在下での抗原への曝露によってTILが活性化される、第1の増殖のプライミングステップを含む。ある特定の実施形態では、上記の第1の増殖のプライミングステップで活性化されるTILは、第1のTILの集団、すなわち、一次細胞集団である。

10

20

30

40

50

## 【0733】

以下の「ステップ」指定 A、B、Cなどは、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）の非限定的な例を参照、及び、本明細書に記載のある特定の非限定的な実施形態を参照する。以下及び図1のステップの順序（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）は例示的であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び/またはステップの省略が、本出願及び本明細書で開示される方法によって企図される。

## 【0734】

A. ステップA：患者の腫瘍サンプルを得る

一般に、TILは、患者の腫瘍サンプル（「一次TIL」）から、またはTIL様の特徴を有する末梢血リンパ球を含む末梢血リンパ球などの循環リンパ球から最初に得られ、その後、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きな集団に増殖され、任意に凍結保存され、任意にTILの健康状態の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

## 【0735】

患者の腫瘍サンプルは、当技術分野で周知の方法、一般に外科的切除、針生検、または腫瘍とTIL細胞の混合物を含むサンプルを得るための他の手段を介して得ることができる。一般に、腫瘍サンプルは、原発性腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍サンプルはまた、血液悪性腫瘍から得られる腫瘍などの液性腫瘍であってもよい。固形腫瘍は、乳房、膵臓、前立腺、大腸、肺、脳、腎臓、胃、及び皮膚（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むがこれらに限定されない）を含む任意のがんタイプであり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBM）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態において、特に高レベルのTILを有することが報告されていることから、有用なTILは、悪性黒色腫腫瘍から得られる。

## 【0736】

一旦得られると、腫瘍サンプルは一般に鋭利な細切を用いて1～約8mm<sup>3</sup>の小片に断片化され、約2～3mm<sup>3</sup>が特に有用である。TILは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。このような腫瘍消化物は、酵素培地中（例えば、Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640緩衝液、2mMのグルタミン酸、10mcg/mLのゲンタマイシン、30単位/mLのDNase及び1.0のmg/mLコラゲナーゼ）でのインキュベーション、続く、機械的解離（例えば、組織解離機器を使用）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、およそ1分間機械的に腫瘍を解離させた後、5%CO<sub>2</sub>中で、37で30分間インキュベートし、続いて、機械的解離及びインキュベーションのサイクルを前述の条件下で、小さな組織片のみが存在するまで繰り返すことによって産生され得る。このプロセスの終わりに、細胞懸濁液に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合は、FICOLL分岐親水性多糖を使用した密度勾配分離を実行して、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第2012/0244133 A1号に記載されている方法など、当技術分野で知られている別の方法を使用することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。前述の方法のいずれも、TILを増殖させる方法またはがんを治療する方法についての本明細書に記載の実施形態のいずれにおいても使用することができる。

## 【0737】

腫瘍解離酵素混合物は、コラゲナーゼ（コラゲナーゼの任意のブレンドまたはタイプを含む）、Accutase（商標）、Accumax（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パイン、XIV型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼI（DNase）、トリプシン阻害剤、その他の解離酵素またはタンパク質分

10

20

30

40

50

解酵素、及びそれらの任意の組み合わせ、などであるがこれらに限定されない、1つまたは複数の解離（消化）酵素を含むことができる。

【0738】

いくつかの実施形態では、解離酵素を凍結乾燥酵素から再構成する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素をHBSSなどの無菌緩衝液のある量で再構成する。

【0739】

場合によっては、コラゲナーゼ（アニマルフリータイプ1コラゲナーゼなど）を、10 mlの無菌HBSSまたは他の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、2892 PZ U /バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態において、コラゲナーゼを、5 ml ~ 15 mlの緩衝液中で再構成する。いくつかの実施形態では、再構成後、コラゲナーゼストックは、約100 PZ U / ml ~ 約400 PZ U / ml、例えば、約100 PZ U / ml ~ 約400 PZ U / ml、約100 PZ U / ml ~ 約350 PZ U / ml、約100 PZ U / ml ~ 約300 PZ U / ml、約150 PZ U / ml ~ 約400 PZ U / ml、約100 PZ U / ml、約150 PZ U / ml、約200 PZ U / ml、約210 PZ U / ml、約220 PZ U / ml、約230 PZ U / ml、約240 PZ U / ml、約250 PZ U / ml、約260 PZ U / ml、約270 PZ U / ml、約280 PZ U / ml、約289.2 PZ U / ml、約300 PZ U / ml、約350 PZ U / ml、または約400 PZ U / mlの範囲である。

【0740】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼを、1 mlの無菌HBSSまたは他の緩衝液中で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、175 DMCU /バイアルの濃度であり得る。凍結乾燥ストック酵素の濃度は175 DMCU / mlであり得る。いくつかの実施形態では、再構成後、中性プロテアーゼストックは、約100 DMCU / ml ~ 約400 DMCU / ml、例えば、約100 DMCU / ml ~ 約400 DMCU / ml、約100 DMCU / ml ~ 約350 DMCU / ml、約100 DMCU / ml ~ 約300 DMCU / ml、約150 DMCU / ml ~ 約400 DMCU / ml、約100 DMCU / ml、約110 DMCU / ml、約120 DMCU / ml、約130 DMCU / ml、約140 DMCU / ml、約150 DMCU / ml、約160 DMCU / ml、約170 DMCU / ml、約175 DMCU / ml、約180 DMCU / ml、約190 DMCU / ml、約200 DMCU / ml、約250 DMCU / ml、約300 DMCU / ml、約350 DMCU / ml、または約400 DMCU / mlの範囲である。

【0741】

いくつかの実施形態では、DNase Iを、1 mlの無菌HBSSまたは他の緩衝液中で再構成する。凍結乾燥ストック酵素の濃度は4 KU /バイアルであった。いくつかの実施形態では、再構成後、DNase Iストックは約1 KU / ml ~ 10 KU / ml、例えば、約1 KU / ml、約2 KU / ml、約3 KU / ml、約4 KU / ml、約5 KU / ml、約6 KU / ml、約7 KU / ml、約8 KU / ml、約9 KU / ml、または約10 KU / mlの範囲である。

【0742】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があり、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに添加する酵素の最終量を修正する。

【0743】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、中性プロテアーゼ、DNase、及びコラゲナーゼを含む。

【0744】

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

【0745】

10

20

30

40

50

上記のように、いくつかの実施形態では、T I Lは固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されていない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されておらず、腫瘍全体として酵素消化を受ける。いくつかの実施形態では、腫瘍を、コラゲナーゼ、D N a s e、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を、コラゲナーゼ、D N a s e、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で、1～2時間消化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を、コラゲナーゼ、D N a s e、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で、5% C O<sub>2</sub>中37℃で1～2時間消化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を、コラゲナーゼ、D N a s e、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で、5% C O<sub>2</sub>中37℃で1～2時間、回転させて消化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を一定の回転で一晩消化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を5% C O<sub>2</sub>中37℃で一定の回転で一晩消化する。いくつかの実施形態では、腫瘍全体を酵素と組み合わせて、腫瘍消化反応混合物を形成する。

10

## 【0746】

いくつかの実施形態では、腫瘍を、無菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成する。いくつかの実施形態では、緩衝液は滅菌H B S Sである。

## 【0747】

いくつかの実施形態では、酵素混合物はコラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼはコラゲナーゼI Vである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼのワーキングストックは100mg/ml 10xのワーキングストックである。

## 【0748】

いくつかの実施形態では、酵素混合物はD N A s eを含む。いくつかの実施形態では、D N A s eのワーキングストックは10,000IU/ml 10xのワーキングストックである。

20

## 【0749】

いくつかの実施形態では、酵素混合物はヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼのワーキングストックは、10mg/ml 10xのワーキングストックである。

## 【0750】

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

30

## 【0751】

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

## 【0752】

一般に、腫瘍から得られた細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに得られた」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに得られたT I Lの細胞集団を、抗原提示細胞、I L - 12及びO K T - 3を含む細胞培養培地に曝露する。

## 【0753】

いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、細切及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態において、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は細切である。いくつかの実施形態において、断片化は、消化である。いくつかの実施形態では、T I Lは、患者から得た酵素的腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養することができる。いくつかの実施形態では、T I Lは、患者から得た酵素的腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養することができる。

40

## 【0754】

いくつかの実施形態では、腫瘍が固形腫瘍である場合、腫瘍は、例えば、ステップA(図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gに提供される))で腫瘍サンプルを得た後に、物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は凍結保存の前に起こる。いくつかの実施形態では、断

50

片化は凍結保存の後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後、凍結保存なしで起こる。いくつかの実施形態では、断片化のステップは、インビトロまたはエキスピボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍を断片化し、10個、20個、30個、40個、またはそれ以上の断片または小片を、第1の増殖のプライミングのために各容器に入れる。いくつかの実施形態では、腫瘍を断片化し、30個または40個の断片または小片を、第1の増殖のプライミングのために各容器に入れる。いくつかの実施形態では、腫瘍を断片化し、40個の断片または小片を、第1の増殖のプライミングのために各容器に入れる。いくつかの実施形態では、複数の断片は約4個～約50個の断片を含み、各断片は約 $27\text{ mm}^3$ の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、総体積が約 $1300\text{ mm}^3$ ～約 $1500\text{ mm}^3$ の、約30個～約60個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、総体積が約 $1350\text{ mm}^3$ の、約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、総質量が約1グラム～約1.5グラムの、約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4個の断片を含む。

10

#### 【0755】

いくつかの実施形態では、TILを腫瘍断片から得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片を鋭利な切開によって得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3$ ～ $10\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3$ ～ $8\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $2\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $3\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $4\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $5\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $6\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $7\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $8\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $9\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $10\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1\sim 4\text{ mm} \times 1\sim 4\text{ mm} \times 1\sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ である。

20

#### 【0756】

いくつかの実施形態では、腫瘍を、各部分の出血、壊死及び/または脂肪組織の量を最小限に抑えるために断片化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を、各部分の出血組織の量を最小限に抑えるために断片化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を、各部分の壊死組織の量を最小限に抑えるために断片化する。いくつかの実施形態では、腫瘍を、各部分の脂肪組織の量を最小限に抑えるために断片化する。ある特定の実施形態では、腫瘍の断片化のステップは、インビトロまたはエキスピボの方法である。

30

#### 【0757】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化を、腫瘍の内部構造を維持するために行う。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化を、外科用メスで切断動作を実行することなく実行する。いくつかの実施形態では、TILを腫瘍消化物から得る。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物を、酵素培地、例えば、限定されないが、RPMI 1640、2 mMのGlutaMAX、10 mg/mLのゲンタマイシン、30 U/mLのDNase、及び1.0 mg/mLのコラゲナーゼ中でのインキュベーション、それに続く機械的解離(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)によって生成する。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍をおよそ1分間機械的に解離させることができる。その後、溶液を5% CO<sub>2</sub>中、37 °Cで30分間インキュベートし、次いでおよそ1分間再び機械的に破砕することができる。5% CO<sub>2</sub>中、37 °Cで30分間再度インキュベートした後、腫瘍を3回目におよそ1分間機械的に破砕することができる。いくつかの実施形態では、3回目の機械的破砕後、大きい組織片が存在する場合、5% CO<sub>2</sub>中、37 °Cでさらに30分のインキュベーションを伴ってまたは伴わず、1回または2回の更な

40

50

る機械的分離をサンプルに適用し得る。いくつかの実施形態では、最終インキュベーションの終わりに細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含有する場合、これらの細胞を除去するために Ficoll を用いた密度勾配分離を行うことができる。

【0758】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングステップ前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに得られた」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。

【0759】

いくつかの実施形態では、細胞は、サンプル単離後（例えば、腫瘍サンプルを得た後及び/または腫瘍サンプルから細胞懸濁液を得た後）に任意に冷凍し、ステップBに記載の増殖に入る前に冷凍で保存することができ、これは以下の詳細に記述され、かつ図1（特に、例えば、図B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に例示される。

10

【0760】

1. コア/小生検由来の TIL

いくつかの実施形態では、TILを、コア生検または同様の手順によって患者の腫瘍サンプル（「一次TIL」）から最初に得て、その後、本明細書に記載のさらなる操作のためにより大きな集団に増殖させ、任意に凍結保存し、任意に表現型及び代謝パラメータについて評価する。

【0761】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍サンプルを、当技術分野で知られている方法を使用して、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍とTIL細胞の混合物を含むサンプルを得るための他の手段を介して得ることができる。一般に、腫瘍サンプルは、原発性腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍サンプルはまた、血液悪性腫瘍から得られる腫瘍などの液性腫瘍であってもよい。いくつかの実施形態では、サンプルは、複数の小さな腫瘍サンプルまたは生検由来であり得る。いくつかの実施形態では、サンプルは、同じ患者からの単一の腫瘍由来の複数の腫瘍サンプルを含むことができる。いくつかの実施形態では、サンプルは、同じ患者からの1つ、2つ、3つ、または4つの腫瘍由来の複数の腫瘍サンプルを含むことができる。いくつかの実施形態では、サンプルは、同じ患者からの複数の腫瘍由来の複数の腫瘍サンプルを含むことができる。固形腫瘍は、乳房、膵臓、前立腺、結腸直腸、肺、脳、腎臓、胃、及び皮膚（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むがこれらに限定されない）を含む任意のがんタイプであり得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBM）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌（NSCLC）から選択される。いくつかの実施形態において、特に高レベルのTILを有することが報告されていることから、有用なTILは、悪性黒色腫腫瘍から得られる。

20

30

【0762】

一般に、腫瘍コアまたは断片から得られた細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに得られた」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに得られたTILの細胞集団を、抗原提示細胞、IL-12及びOKT-3を含む細胞培養培地に曝露する。

40

【0763】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、原発病変が過去に効果的に治療/除去されている場合は、転移性病変のうちの一つを除去することが必要となり得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、可能であれば、皮膚病変、または頸部または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変を除去する、またはその小生検を除去する。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検を除去する。いくつかの実施形態では、肺または肝臓の転移病変、または腹腔内または胸部リンパ節ならびにその小生検を使用することができる。

50

## 【0764】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小生検は、ほくろまたはその一部を含む。

## 【0765】

いくつかの実施形態では、小生検はパンチ生検である。いくつかの実施形態では、パンチ生検を、円形の刃を皮膚に押し付けて得る。いくつかの実施形態では、パンチ生検を、円形の刃を皮膚、疑わしいほくろに押し付けて得る。いくつかの実施形態では、パンチ生検を、円形の刃を皮膚に押し付けることにより得て、丸い皮膚片を除去する。いくつかの実施形態では、小生検はパンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が除去される。

## 【0766】

いくつかの実施形態では、小生検は切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は切除生検であり、全ほくろまたは成長物が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は切除生検であり、正常に見える皮膚の小さな境界と共にほくろ全体または成長物が除去される。

## 【0767】

いくつかの実施形態では、小生検は切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は切開生検であり、ほくろまたは成長物の最も変則的な部分のみが採取される。いくつかの実施形態では、小生検は切開生検であり、切開生検は、疑わしいほくろが非常に大きい場合など、他の技術で完了できない場合に使用される。

## 【0768】

いくつかの実施形態では、小生検は肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検を気管支鏡によって得る。一般に、気管支鏡では、患者を麻酔にかけ、小さな器具を鼻または口から喉を通して気管支の通路に通し、そこで小さな器具を使用して組織を除去する。いくつかの実施形態では、気管支鏡によって腫瘍または成長物に到達することができない場合、経胸腔針生検法を使用することができる。一般に、経胸腔針生検でも、患者を麻酔にかけ、針を、皮膚を通して疑わしい箇所 directly 挿入し、小さな組織のサンプルを除去する。いくつかの実施形態では、経胸腔針生検は介入放射線学（例えば、針を誘導するための X 線または CT スキャンの使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検を針生検によって得る。いくつかの実施形態では、小生検を超音波内視鏡で得る（例えば、ライトを備えた内視鏡を口から食道に入れる）。いくつかの実施形態では、小生検を外科的に得る。

## 【0769】

いくつかの実施形態では、小生検は頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は切開生検であり、組織の小片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常領域に容易にアクセスできる場合、入院せずにサンプルを採取することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または咽喉の奥深くにある場合、生検は全身麻酔下で、手術室で行う必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は領域全体が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は細針吸引（FNA）である。いくつかの実施形態では、小生検は細針吸引（FNA）であり、注射器に取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍またはしこりから細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検はパンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検はパンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して疑わしい領域の一部を除去する。

## 【0770】

いくつかの実施形態では、小生検は子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検をコルポスコピーによって得る。一般に、コルポスコピー法では、拡大双眼鏡（コルポスコプ）に取り付けられた照明付きの増殖器具を使用して、子宮頸部の表面の小さな部分を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は円錐切除 / 錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は円錐切除 / 錐体生検であり、子宮頸部からより大きな組織片を除去するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検

10

20

30

40

50

は診断を確認するのに役立つことに加えて、錐体生検は初期治療として役立つ。

【0771】

「固形腫瘍」という用語は、通常嚢胞または液状領域を含まない組織の異常な塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、または癌性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺、トリプルネガティブ乳癌、前立腺、結腸、直腸、及び膀胱のがんなどの肉腫、癌腫、及びリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）と、がん細胞が分散し、支持微小環境を提供する支持間質細胞とを含む、相互依存性の組織コンパートメントが含まれる。

10

【0772】

いくつかの実施形態では、腫瘍からのサンプルを、細針吸引物（FNA）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として得る。いくつかの実施形態では、サンプルを最初にG - R e x 1 0に入れる。いくつかの実施形態では、1つまたは2つのコア生検及び/または小生検サンプルがある場合、サンプルを最初にG - R e x 1 0に入れる。いくつかの実施形態では、3、4、5、6、8、9、または10個、またはそれ以上のコア生検及び/または小生検サンプルがある場合、サンプルを最初にG - R e x 1 0 0に入れる。いくつかの実施形態では、3、4、5、6、8、9、または10個、またはそれ以上のコア生検及び/または小生検サンプルがある場合、サンプルを最初にG - R e x 5 0 0に入れる。

20

【0773】

FNAは、肺、黒色腫、頭頸部、頸部、卵巣、膵臓、神経膠芽腫、大腸、及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、FNAを、非小細胞肺癌（NSCLC）に罹患した患者からの肺腫瘍などの肺腫瘍から得る。場合によっては、NSCLC患者は以前に外科的治療を受けている。

【0774】

本明細書に記載のTILは、FNAサンプルから得ることができる。場合によっては、FNAサンプルを、18ゲージ針～25ゲージ針までのファインゲージの針を使用して、患者から得る、または単離する。ファインゲージの針は、18ゲージ、19ゲージ、20ゲージ、21ゲージ、22ゲージ、23ゲージ、24ゲージ、または25ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者からのFNAサンプルは、少なくとも400,000 TIL、例えば、400,000 TIL、450,000 TIL、500,000 TIL、550,000 TIL、600,000 TIL、650,000 TIL、700,000 TIL、750,000 TIL、800,000 TIL、900,000 TIL、950,000 TIL、またはそれ以上を含むことができる。

30

【0775】

場合によっては、本明細書に記載のTILをコア生検サンプルから得る。場合によっては、コア生検サンプルを、11ゲージ針～16ゲージ針までの範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得る、または分離する。針は、11ゲージ、12ゲージ、13ゲージ、14ゲージ、15ゲージ、または16ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者からのコア生検サンプルは、少なくとも400,000 TIL、例えば、400,000 TIL、450,000 TIL、500,000 TIL、550,000 TIL、600,000 TIL、650,000 TIL、700,000 TIL、750,000 TIL、800,000 TIL、900,000 TIL、950,000 TIL、またはそれ以上を含むことができる。

40

【0776】

一般に、採取された細胞懸濁液は「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【0777】

いくつかの実施形態では、TILを腫瘍消化物から得ることはない。いくつかの実施形

50

態では、固形腫瘍を断片化しない。

【0778】

いくつかの実施形態では、TILを腫瘍消化物から得る。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物を、酵素培地、例えば、限定されないが、RPMI 1640、2 mMのGlutaMAX、10 mg/mLのゲンタマイシン、30 U/mLのDNase、及び1.0 mg/mLのコラゲナーゼ(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)中でのインキュベーションによって生成する。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍をおよそ1分間機械的に解離させることができる。その後、溶液を5% CO<sub>2</sub>中、37°Cで30分間インキュベートし、次いでおよそ1分間再び機械的に破砕することができる。5% CO<sub>2</sub>中、37°Cで30分間再度インキュベートした後、腫瘍を3回目におよそ1分間機械的に破砕することができる。いくつかの実施形態では、3回目の機械的破砕後、大きい組織片が存在する場合、5% CO<sub>2</sub>中、37°Cでさらに30分のインキュベーションを伴ってまたは伴わず、1回または2回の更なる機械的解離をサンプルに適用し得る。いくつかの実施形態では、最終インキュベーションの終わりに細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含有する場合、これらの細胞を除去するためにFicollを用いた密度勾配分離を行うことができる。

10

【0779】

いくつかの実施形態では、第1のTIL集団を得ることは、多病変サンプリング法を含む。

【0780】

腫瘍解離酵素混合物は、コラゲナーゼ(コラゲナーゼの任意のブレンドまたはタイプを含む)、Accutase(商標)、Accumax(商標)、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ(ディスパーゼ)、キモトリプシン、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パイン、XIV型プロテアーゼ(プロナーゼ)、デオキシリボヌクレアーゼI(DNase)、トリプシン阻害剤、その他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせ、などであるがこれらに限定されない、1つまたは複数の解離(消化)酵素を含むことができる。

20

【0781】

いくつかの実施形態では、解離酵素を凍結乾燥酵素から再構成する。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素を、HBSSなどの無菌緩衝液の、ある量で再構成する。

30

【0782】

場合によっては、コラゲナーゼ(アニマルフリータイプ1コラゲナーゼなど)を、10 mLの無菌HBSSまたは他の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、2892 PZ U/バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態において、コラゲナーゼを、5 mL~15 mLの緩衝液中で再構成する。いくつかの実施形態では、再構成後、コラゲナーゼストックは、約100 PZ U/mL~約400 PZ U/mL、例えば、約100 PZ U/mL~約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL~約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL~約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL~約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL、または約400 PZ U/mLの範囲である。

40

【0783】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼを、1 mLの無菌HBSSまたは他の緩衝液中で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、175 DMCU/バイアルの濃度であり得る。凍結乾燥ストック酵素の濃度は175 DMCU/mLであり得る。いくつかの実施形態では、再構成後、中性プロテアーゼストックは、約100 DMCU/mL~約400 DMCU/mL、例えば、約100 DMCU/mL~約400 DMCU/mL、約100 DMCU/mL

50

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

【0784】

いくつかの実施形態では、DNase Iを、1 mlの無菌HBSSまたは他の緩衝液中で再構成する。凍結乾燥ストック酵素の濃度は4 KU/バイアルであった。いくつかの実施形態では、再構成後、DNase Iストックは約1 KU/ml～10 KU/ml、例えば、約1 KU/ml、約2 KU/ml、約3 KU/ml、約4 KU/ml、約5 KU/ml、約6 KU/ml、約7 KU/ml、約8 KU/ml、約9 KU/ml、または約10 KU/mlの範囲である。

10

【0785】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があり、凍結乾燥ストックの濃度を確認し、それに応じて消化カクテルに添加する酵素の最終量を修正する。

【0786】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、中性プロテアーゼ、コラゲナーゼ、及びDNaseを含む。

20

【0787】

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

【0788】

2. 胸水TIL

いくつかの実施形態では、サンプルは、胸水サンプルである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる増殖のためのTILの供給源は、胸膜液サンプルである。いくつかの実施形態では、サンプルは、胸水由来サンプルである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる増殖のためのTILの供給源は、胸水由来サンプルである。例えば、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第US 2014/0295426号に記載されている方法を確認されたい。

30

【0789】

いくつかの実施形態では、疑われる及び/またはTILを含む任意の胸膜液または胸水を使用し得る。このようなサンプルは、NSCLCまたはSCLCなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、サンプルは、別の器官、例えば、乳房、卵巣、結腸または前立腺に由来する二次転移癌細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の増殖方法での使用のためのサンプルは胸膜滲出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の増殖方法での使用のためのサンプルは胸膜濾出液である。他の生物学的サンプルは、例えば、腹部からの腹水液または脾嚢胞液を含む、TILを含有する他の漿液を含み得る。腹水液及び胸膜液は非常によく似た化学系を含んでおり、腹部と肺の両方が、悪性腫瘍と同じように、胸膜腔と腹部腔に中皮線と流体形態を有し、いくつかの実施形態では、そのような流体はTILを含む。本開示が胸膜液を例示するいくつかの実施形態では、TILを含む腹水液または他の嚢胞液を使用して同様の結果を有する同じ方法で実行され得る。

40

【0790】

いくつかの実施形態では、胸膜液は、患者から直接取り出されたままの未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸膜液を、接触ステップの前に、EDTAまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れる。いくつかの実施形態において、未処理の胸膜液を、接触ステップの前に、標準的なCell Save(登録商標)チューブ(

50

Veridex)に入れる。いくつかの実施形態では、サンプルを、生存可能なTILの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にCellSaveチューブに入れる。生存可能なTILの数は、未処理の胸膜液に放置すると、4でも24時間以内に大幅に減少してしまう。いくつかの実施形態では、サンプルを、患者から切除した後、1時間、5時間、10時間、15時間、または最大24時間以内に適切な収集管に入れる。いくつかの実施形態では、サンプルを、患者から切除した後、4で、1時間、5時間、10時間、15時間、または最大24時間以内に適切な収集管に入れる。

#### 【0791】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸膜液サンプルを希釈し得る。一実施形態では、希釈は1:10の胸膜液対希釈液である。他の実施形態では、希釈は1:9の胸膜液対希釈液である。他の実施形態では、希釈は1:8の胸膜液対希釈液である。他の実施形態では、希釈は1:5の胸膜液対希釈液である。他の実施形態では、希釈は1:2の胸膜液対希釈液である。他の実施形態では、希釈は1:1の胸膜液対希釈液である。いくつかの実施形態では、希釈液には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、他の緩衝液、または生理学的に許容される希釈液が含まれる。いくつかの実施形態では、サンプルを、生存可能なTILの減少を回避するために、患者から採取及び希釈した直後にCellSaveチューブに入れる。この減少は、4でも、未処理の胸膜液に残された場合、24~48時間以内にかんがりの程度で発生し得る。いくつかの実施形態では、胸膜液サンプルを、患者から採取及び希釈した後、1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な採取管に入れる。いくつかの実施形態では、胸膜液サンプルを、患者から採取及び希釈した後、4で、1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な採取管に入れる。

#### 【0792】

いくつかの実施形態では、胸膜液サンプルを、さらなる処理ステップの前に従来の手段によって濃縮する。いくつかの実施形態では、この胸膜液の前処理は、方法を実施する実験室への輸送のため、またはその後の分析(例えば、採取後24~48時間後)のために胸膜液を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸膜液サンプルを、胸膜液サンプルを対象から採取した後に遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液に再懸濁することによって調製する。いくつかの実施形態では、胸膜液サンプルを、輸送または後の分析及び/または処理のために凍結保存する前に、複数回の遠心分離及び再懸濁に供する。

#### 【0793】

いくつかの実施形態では、胸膜液サンプルを、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮させる。いくつかの実施形態では、接触ステップで使用する胸膜液サンプルを、膜に通胸膜液を通過させるが腫瘍細胞は保持する、既知で本質的に均一な孔径を有するフィルターを通して流体を濾過することによって調製する。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも4µMであり得る。他の実施形態では、細孔直径は5µM以上、他の実施形態では、6、7、8、9、または10µMのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたTILを含む細胞を膜から洗い流し、適切な生理学的に許容される緩衝液に入れることができる。このように濃縮されたTILを含む細胞は、方法の接触ステップで後に使用することができる。

#### 【0794】

いくつかの実施形態では、胸膜液サンプル(例えば、未処理の胸膜液を含む)、希釈胸膜液、または再懸濁細胞ペレットを、サンプル中に存在する無核赤血球を差別的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸膜液がかなりの数のRBCを含む状況で、さらなる処理ステップの前に実行する。適切な溶解試薬には、単一溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または、溶解試薬、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。適切な溶解系は市販されており、BD Pharm Lyse(商標)系(Becton Dickinson)が含まれる。他の溶解系には、Versa Lyse(商標)系、FACS Lyse(商標)系(Becton Dickinson)

、Immunoprep (商標)系またはErythrolyse II系(Beckman Coulter, Inc.)、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態において、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸膜液中のTIL及びTILの表現型特性の保存である主要な要件によって異なり得る。溶解のために単一の試薬を使用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解系は、第2の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えば、Stabilysse (商標)試薬(ベックマン・コールター社)を含むことができる。溶解試薬の選択または好ましい方法の実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

【0795】

いくつかの実施形態では、本明細書で上述されるように未処理、希釈、または多重遠心分離または処理された胸膜液サンプルを、本明細書で提供されるようにさらに処理及び/または展開する前に、約 - 140 の温度で凍結保存する。

【0796】

3. 末梢血から末梢血リンパ球(PBL)を増殖させる方法

PBL方法1. 本発明のいくつかの実施形態では、PBLを、本明細書に記載のプロセスを使用して増殖させる。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、全血からPBMCサンプルを得ることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非CD19+画分の負の選択を使用してPBMCから純粋なT細胞を単離することによってT細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非CD19+画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用してPBMCから純粋なT細胞を単離することによってT細胞を濃縮することを含む。

【0797】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL法1を以下のように実施する。0日目に、凍結保存されたPBMCサンプルを解凍し、PBMCを計数する。T細胞を、ヒト汎T細胞分離キット及びLSカラム(Miltenyi Biotec)を使用して分離する。

【0798】

PBL方法2. 本発明のいくつかの実施形態では、PBLを、全血からPBMCサンプルを得ることを含むPBL方法2を使用して増殖させる。PBMCからのT細胞を、PBMCを37 で少なくとも3時間インキュベートし、非接着細胞を単離することによって濃縮する。

【0799】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL方法2を以下のように実施する。0日目に、凍結保存されたPBMCサンプルを解凍し、PBMC細胞を1ウェルあたり600万個の細胞を6つのウェルプレートに、CM-2培地中に播種し、摂氏37度で3時間インキュベートする。3時間後、PBLである非接着細胞を除去し、計数する。

【0800】

PBL方法3. 本発明のいくつかの実施形態では、PBLを、末梢血からPBMCサンプルを得ることを含むPBL方法3を使用して増殖させる。B細胞をCD19+選択を用いて単離し、T細胞をPBMCサンプルの非CD19+画分の負の選択を用いて選択する。

【0801】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL方法3を以下のように実施する。0日目に、末梢血由来の凍結保存されたPBMCを解凍し、計数する。CD19+B細胞を、CD19 Multisort Kit, Human (Miltenyi Biotec)を使用して選別する。非CD19+細胞画分のうち、T細胞を、Human Pan T-cell Isolation Kit及びLS Columns (Miltenyi Biotec)を使用して精製する。

【0802】

いくつかの実施形態では、PBMCを全血サンプルから単離する。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、P B M C サンプルを、P B L を増殖させるための出発物質として使用する。いくつかの実施形態では、サンプルを、増殖プロセスの前に凍結保存する。他の実施形態では、新鮮なサンプルを出発材料として使用して、P B L を増殖させる。本発明のいくつかの実施形態では、T 細胞を、当技術分野で知られている方法を使用して P B M C から単離する。いくつかの実施形態では、T 細胞を、Human Pan T - Cell Isolation Kit 及び L S columns を使用して単離する。本発明のいくつかの実施形態では、T 細胞を、当技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、C D 1 9 の負の選択を使用して P B M C から単離する。

**【0803】**

本発明のいくつかの実施形態において、P B M C サンプルを、非接着細胞を特定するのに有効な所望の温度で一定期間インキュベートする。本発明のいくつかの実施形態では、インキュベーション時間は約3時間である。本発明のいくつかの実施形態では、温度は摂氏約37°である。次に、非接着細胞を、上記のプロセスを使用して増殖させる。

**【0804】**

いくつかの実施形態では、P B M C サンプルは、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで任意に前治療された対象または患者からのものである。いくつかの実施形態では、腫瘍サンプルは、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者からのものである。いくつかの実施形態では、P B M C サンプルは、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで前治療され、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも5か月、少なくとも6か月、または1年、またはそれ以上治療を受けた対象または患者からのものである。他の実施形態では、P B M C は、現在イブルチニブなどの I T K 阻害剤レジメンを受けている患者に由来する。

**【0805】**

いくつかの実施形態では、P B M C サンプルは、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで前治療され、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどの I T K 阻害剤による治療に抵抗性の対象または患者からのものである。

**【0806】**

いくつかの実施形態では、P B M C サンプルは、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで前治療されているが、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤による治療をもはや受けていない対象または患者からのものである。いくつかの実施形態では、P B M C サンプルは、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤を含むレジメンで前治療されているが、キナーゼ阻害剤または I T K 阻害剤による治療をもはや受けておらず、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも5か月、少なくとも6か月、または1年以上治療を受けていない対象または患者からのものである。他の実施形態では、P B M C は、以前に I T K 阻害剤へ曝露されているが、少なくとも3か月、少なくとも6か月、少なくとも9か月、または少なくとも1年間治療されていない患者に由来する。

**【0807】**

本発明の一実施形態では、0日目に細胞を C D 1 9 + について選択し、それに応じて選別する。本発明のいくつかの実施形態では、選択を、抗体結合ビーズを使用して行う。本発明のいくつかの実施形態において、純粋な T 細胞を、0日目に P B M C から単離する。

**【0808】**

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他の I T K 阻害剤で前治療されていない患者の場合、10 ~ 15 ml のパフィーコートが約  $5 \times 10^9$  P B M C を産生し、これは次に約  $5.5 \times 10^7$  P B L を産生する。

**【0809】**

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他の I T K 阻害剤で前治療された患者の場合、増殖プロセスは、約  $20 \times 10^9$  P B L をもたらす。本発明のいくつかの実施形態では、 $40.3 \times 10^6$  の P B M C が約  $4.7 \times 10^5$  の P B L をもたらす。

## 【0810】

前述の実施形態のいずれにおいても、P B M Cは、アフエーシスによる全血サンプル、パフィーコート、またはP B M Cを得るための当技術分野で公知の任意の他の方法に由来し得る。

## 【0811】

## 4. 骨髄由来P B M Cから骨髄浸潤リンパ球(M I L)を増殖させる方法

M I L方法3. 本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からP B M Cを得ることを含む。0日目に、C D 3 + / C D 3 3 + / C D 2 0 + / C D 1 4 +についてP B M Cを選択し、選別し、非C D 3 + / C D 3 3 + / C D 2 0 + / C D 1 4 +細胞画分を超音波処理し、超音波処理した細胞画分の一部を選択した細胞画分に加えて戻す。

10

## 【0812】

本発明のいくつかの実施形態では、M I L方法3を以下のように実施する。0日目に、凍結保存されたP B M Cのサンプルを解凍し、P B M Cを計数する。細胞をC D 3、C D 3 3、C D 2 0、及びC D 1 4抗体で染色し、S 3 e細胞選別(B i o - R a d)を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分(またはM I L画分)(C D 3 + C D 3 3 + C D 2 0 + C D 1 4 +)と、A M L芽細胞画分(非C D 3 + C D 3 3 + C D 2 0 + C D 1 4 +)との2つの画分に選別する。

## 【0813】

本発明のいくつかの実施形態では、P B M Cを骨髄から得る。いくつかの実施形態では、P B M Cを、アフエーシス、吸引、針生検、または当技術分野で知られている他の同様の手段によって骨髄から得る。いくつかの実施形態では、P B M Cは新鮮である。他の実施形態では、P B M Cを凍結保存される。

20

## 【0814】

本発明のいくつかの実施形態では、M I Lを、10 ~ 50 m lの骨髄吸引液から増殖させる。本発明のいくつかの実施形態では、10 m lの骨髄吸引物を患者から得る。他の実施形態では、20 m lの骨髄吸引物を患者から得る。他の実施形態では、30 m lの骨髄吸引物を患者から得る。他の実施形態では、40 m lの骨髄吸引物を患者から得る。他の実施形態では、50 m lの骨髄吸引物を患者から得る。

## 【0815】

本発明のいくつかの実施形態では、約10 ~ 50 m lの骨髄吸引液からもたらされるP B M Cの数は、約 $5 \times 10^7$  ~ 約 $10 \times 10^7$  P B M Cである。他の実施形態では、もたらされるP B M Cの数は、約 $7 \times 10^7$ 個のP B M Cである。

30

## 【0816】

本発明のいくつかの実施形態では、約 $5 \times 10^7$  ~ 約 $10 \times 10^7$ のP B M Cが、約 $0.5 \times 10^6$  ~ 約 $1.5 \times 10^6$  M I Lをもたらす。本発明のいくつかの実施形態では、約 $1 \times 10^6$  M I Lをもたらす。

## 【0817】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髄吸引物に由来する $12 \times 10^6$ のP B M Cは、約 $1.4 \times 10^5$  M I Lをもたらす。

## 【0818】

前述の実施形態のいずれにおいても、P B M Cは、の全血サンプル由来、アフエーシスによる骨髄由来、パフィーコート由来、またはP B M Cを得るための当技術分野で公知の任意の他の方法に由来し得る。

40

## 【0819】

## B. ステップB: 第1の増殖のプライミング

いくつかの実施形態では、本方法は、より古いT I L(すなわち、対象/患者に投与する前により多くの複製ラウンドを経たT I L)よりも追加の治療効果を提供し得る、より若いT I Lを提供する。若いT I Lの特徴は文献、例えば、D o n i a , e t a l . , S c a n d i n a v i a n J o u r n a l o f I m m u n o l o g y , 7 5 : 1 5 7 ~ 1 6 7 ( 2 0 1 2 ) , D u d l e y e t a l . , C l i n C a n c e r R e s , 1 6 :

50

6122 - 6131 (2010)、Huang et al., J Immunother, 28 (3) : 258 ~ 267 (2005)、Besser et al., Clin Cancer Res, 19 (17) : OF1 - OF9 (2013)、Besser et al., J Immunother 32 : 415 ~ 423 (2009)、Robbins, et al., J Immunol 2004 ; 173 : 7125 - 7130、Shen et al., J Immunother, 30 : 123 ~ 129 (2007)、Zhou, et al., J Immunother, 28 : 53 ~ 62 (2005)、及び Tran, et al., J Immunother, 31 : 742 ~ 751 (2008) に記載されており、それらのすべては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0820】

腫瘍断片及び/または、例えば、図1のステップAに記載されているような腫瘍断片(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)の細切または消化後、得られた細胞を、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞(例えば、抗原提示フィーダー細胞)及び/またはOKT-3を含むAPCの第1の培養物由来の培養上清を含む血清で、腫瘍及び他の細胞よりもTILの増殖に有利な条件下で、培養する。いくつかの実施形態では、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞を、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片と共に培養開始時に添加する(例えば、0日目)。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を、容器当たり最大60個の断片を含む容器内でインキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を、容器当たり最大80個の断片を含む容器内でインキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を、容器当たり最大100個の断片を含む容器内でインキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を、容器あたり最大60個の断片及び6000IU/mLのIL-2を含む容器内でインキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を、容器当たり最大80個の断片及び6000IU/mLのIL-2を含む容器内でインキュベートする。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を、容器当たり最大100個の断片及び6000IU/mLのIL-2を含む容器内でインキュベートする。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団を数日間、一般に1~8日間培養し、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、この期間を活性化Iと称する。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団を、ある日数の期間、一般に1~7日間培養し、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、1~8日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、1~7日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、1~3日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、1~4日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、1~5日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、1~6日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、5~8日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、5~7日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約6~8日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約6~7日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約7~8日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の

10

20

30

40

50

増殖のプライミングを、約7日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約8日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約6~11日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約7~11日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約8~11日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約9~11日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約10~11日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約9日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約10日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、約11日間行い、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。

10

#### 【0821】

いくつかの実施形態では、TILの増殖を、以下及び本明細書に記載の、第1の増殖のプライミングステップ（例えば、図1のステップB（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に記述され、PREPまたはプライミングREPと称されるプロセスを含むことができ、0日目及び/または培養開始からのフィーダー細胞またはフィーダー細胞培養上清を含む）を使用して実行し、その後、以下のステップD及び本明細書に記載の、急速な第2の増殖（ステップD、急速増殖プロトコル（REP）ステップと称されるプロセスを含む）、その後、任意の凍結保存、及びその後以下及び本明細書に記載の第2のステップD（再刺激REPステップと称されるプロセスを含む）が続く。このプロセスから得たTILを、本明細書に記載の表現型特性及び代謝パラメータについて任意に特徴付けることができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1 \text{ mm}^3 \sim 10 \text{ mm}^3$ である。

20

#### 【0822】

いくつかの実施形態では、第1の増殖培養培地を、培養培地（culture media）の略語である「CM」と称する。いくつかの実施形態では、ステップBのCMは、10%ヒトAB血清、25mMのHepes、及び10mg/mLのゲンタマイシンを補充したGlutaMAXを含むRPMI 1640からなる。

30

#### 【0823】

いくつかの実施形態では、240個以下の腫瘍断片がある。いくつかの実施形態では、4個以下の容器に入れられた240個以下の腫瘍断片がある。いくつかの実施形態では、容器はGREX100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、60個以下の腫瘍断片を1つの容器に入れる。いくつかの実施形態では、200個以下の腫瘍断片がある。いくつかの実施形態では、5個以下の容器に入れられた200個以下の腫瘍断片がある。いくつかの実施形態では、50個以下の腫瘍断片を1つの容器に入れる。いくつかの実施形態では、各容器は、容器当たり500mL以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地はIL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は6000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は容器あたり $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地はOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、培地は容器あたり30ng/mLのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器はGREX100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は6000IU/mLのIL-2、30ngのOKT-3、及び $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は

40

50

6000 IU/mLのIL-2、30 ng/mLのOKT-3、及び $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【0824】

腫瘍断片の調製後、得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）を、IL-2、抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む培地で、腫瘍及び他の細胞よりもTILの増殖に有利な条件下で培養し、これにより、0日目の培養開始からのTILプライミング及び増殖の加速が可能になる。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び/または腫瘍断片を6000 IU/mLのIL-2、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びOKT-3でインキュベートする。この一次細胞集団を数日間、一般に1~8日間培養し、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング中の増殖培地は、IL-2またはそのバリエーション、及び抗原提示フィーダー細胞及びOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団を数日間、一般に1~7日間培養し、バルクTIL集団、一般に約 $1 \times 10^8$ 個のバルクTIL細胞を得る。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング中の増殖培地は、IL-2またはそのバリエーション、及び抗原提示フィーダー細胞及びOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、IL-2は組換えヒトIL-2（rhIL-2）である。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルの場合 $20 \sim 30 \times 10^6$  IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルの場合 $20 \times 10^6$  IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルの場合 $25 \times 10^6$  IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルの場合 $30 \times 10^6$  IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $4 \sim 8 \times 10^6$  IU/mgのIL-2最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $5 \sim 7 \times 10^6$  IU/mgのIL-2最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $6 \times 10^6$  IU/mgのIL-2最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液を、実施例Cに記載のように調製する。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング培養培地は、約10,000 IU/mLのIL-2、約9,000 IU/mLのIL-2、約8,000 IU/mLのIL-2、約7,000 IU/mLのIL-2、約6000 IU/mLのIL-2または約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング培養培地は、約9,000 IU/mLのIL-2~約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング培養培地は、約8,000 IU/mLのIL-2~約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング培養培地は、約7,000 IU/mLのIL-2~約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング培養培地は、約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖プライミング細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、1000~2000 IU/mL、2000~3000 IU/mL、3000~4000 IU/mL、4000~5000 IU/mL、5000~6000 IU/mL、6000~7000 IU/mL、7000~8000 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 8 2 5 】

いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mLのIL-15、約180 IU/mLのIL-15、約160 IU/mLのIL-15、約140 IU/mLのIL-15、約120 IU/mLのIL-15、または約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約500 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約400 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約300 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約200 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。

## 【 0 8 2 6 】

いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

## 【 0 8 2 7 】

いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 µg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1 ng/mL～1 ng/mL、1 ng/mL～5 ng/mL、5 ng/mL～10 ng/mL、10 ng/mL～20 ng/mL、20 ng/mL～30 ng/mL、30 ng/mL～40 ng/mL、40 ng/mL～50 ng/mL、50 ng/mL～100 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、15 ng/mL～30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培

地は、30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体はムロモナブである。上記の表1を参照されたい。

【0828】

いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つまたは複数のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルバム、EU-101、融合タンパク質、ならびにその断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストを、細胞培養培地中で0.1 µg/mL ~ 100 µg/mLの濃度を実現するのに十分な濃度で添加する。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストを、細胞培養培地中で20 µg/mL ~ 40 µg/mLの濃度を実現するのに十分な濃度で添加する。

10

【0829】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のTNFRSFアゴニストに加えて、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、IL-2を約3000 IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3抗体を約30 ng/mLの初期濃度で含み、1つまたは複数のTNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のTNFRSFアゴニストに加えて、第1のプライミング増殖細胞培養培地は、IL-2を約6000 IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3抗体を約30 ng/mLの初期濃度で含み、1つまたは複数のTNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。

20

【0830】

いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地を、培養培地(culture media)の略語である「CM」と称する。いくつかの実施形態では、CM1(培養培地1)と称する。いくつかの実施形態では、CMは、10%ヒトAB血清、25 mMのHepes、及び10 mg/mLゲンタマイシンを補充したGlutaMAXを含むRPMI 1640からなる。いくつかの実施形態では、CMは、実施例に記載のCM1であり、実施例Aを参照されたい。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地で行う。いくつかの実施形態では、第1のプライミング増殖培養培地または初期細胞培養培地または第1細胞培養培地は、IL-2、OKT-3及び抗原提示フィーダー細胞(本明細書ではフィーダー細胞とも称される)を含む。

30

【0831】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される増殖プロセスで使用される培養培地は、無血清培地または限定培地である。いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。いくつかの実施形態において、無血清または限定培地が、血清含有培地のロット間の変動の一部起因する実験的変動を予防及び/または減少させるために使用される。

【0832】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion SFM、CTS(商標)AIM-V Medium、CTS(商標)AIM-V SFM、LymphoONE(商標)T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)、Minimal Essential Medium(MEM)、Basal Medium Eagle(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium(MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium(G-MEM)、R

40

50

PMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumが含まれる。

【0833】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清置換物は、CTS(商標)Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化物、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の抗生物質、及び1つまたは複数の微量元素を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分 $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$ 及び $Zr^{4+}$ を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0834】

いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Immune Cell Serum Replacementを、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion SFM、CTS(商標)AIM-V Medium、CTS(商標)AIM-V SFM、LymphoONE(商標)T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)、Minimal Essential Medium(MEM)、Basal Medium Eagle(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium(MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium(G-MEM)、RPMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumが含まれるが、これらに限定されない、従来増殖培地と一緒に使用する。

【0835】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地中の総血清置換物濃度(体積%)は、総無血清または限定培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約10%である。

【0836】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion SFM(ThermoFisher Scientific)である。任意のCTS(商標)Optmizer(商標)の製剤が、本発明において有用である。CTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion SFMは、1LのCTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Mediumと26mLのCTS(商標)Op

Tmizer (商標) T - Cell Expansion Supplement を組み合わせたもので、使用前に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が、55 mM で 2 -メルカプトエタノールと一緒に補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充され、培地中の 2 -メルカプトエタノールの最終濃度が 55  $\mu$ M である。

【0837】

いくつかの実施形態では、限定培地は、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。任意の CTS (商標) Optmizer (商標) の製剤が、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、1 L の CTS (商標) Optmizer (商標) T - cell Expansion Basal Medium と 26 mL の CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion Supplement を組み合わせたもので、使用前に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が、55 mM で 2 -メルカプトエタノールと一緒に補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充され、さらに約 3000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充され、さらに約 6000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び 55 mM の 2 -メルカプトエタノールが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T - Cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (The

ermoFisher Scientific)、及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充され、さらに約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-Cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement(SR)(ThermoFisher Scientific)、及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充され、さらに約1000IU/mL~約6000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-Cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement(SR)(ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約1000IU/mL~約8000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-Cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement(SR)(ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約6000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-Cell Expansion SFMは、約3%CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement(SR)(ThermoFisher Scientific)が補充され、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は55µMである。

10

20

## 【0838】

いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度のグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))が補充される。いくつかの実施形態において、無血清培地または限定培地は、約2mMの濃度でグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))が補充される。

## 【0839】

いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM~約100mM、35mM~約95mM、40mM~約90mM、45mM~約85mMまで、50mM~約80mM、55mM~約75mM、60mM~約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充される。いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充される。いくつかの実施形態では、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は55µMである。

30

## 【0840】

いくつかの実施形態では、国際PCT公開第WO/1998/030679号に記載され、参照により本明細書に組み込まれる、限定培地が、本発明において有用である。その公開では、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地は、無血清培養における細胞の増殖を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地を含む。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化物質、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つまたは複数の成分を含むか、または組み合わせることによって得られる。いくつかの実施形態では、限定培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数の

40

50

インスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、及び1つまたは複数の微量元素からなる群から選択される1つまたは複数の成分とを含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基本細胞培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI 増殖用培地、及び Iscove's Modified Dulbecco's Medium からなる群から選択される。

10

## 【0841】

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

20

30

## 【0842】

いくつかの実施形態では、限定培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1X培地の濃度範囲」という見出しの下の列に列挙された濃度範囲で存在する。他の実施形態では、限定培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1X培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙された最終濃度で存在する。他の実施形態では、限定培地は、無血清培地を含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のいくつかでは、無血清サプリメントは、表4の「サプリメントにおける好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙されたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

40

50

【表 4】

表 4：非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメントにおける好ましい実施形態 (mg/L) (約)	1×培地の濃度範囲 (mg/L) (約)	1×培地の好ましい実施形態(mg/L) (約)
グリシン	150	5~200	53
L-ヒスチジン	940	5~250	183
L-イソロイシン	3400	5~300	615
L-メチオニン	90	5~200	44
L-フェニルアラニン	1800	5~400	336
L-プロリン	4000	1~1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1~45	15
L-セリン	800	1~250	162
L-トレオニン	2200	10~500	425
L-トリプトファン	440	2~110	82
L-チロシン	77	3~175	84
L-バリン	2400	5~500	454
チアミン	33	1~20	9
還元型グルタチオン	10	1~20	1.5
アスコルビン酸-2-PO <sub>4</sub> (Mg 塩)	330	1~200	50
トランスフェリン (鉄飽和)	55	1~50	8
インスリン	100	1~100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001~0.0001	0.00001
AlbuMAX (登録商標)I	83,000	5000~50,000	12,500

10

20

30

## 【0843】

いくつかの実施形態では、限定培地の容量オスモル濃度は、約 260 ~ 350 mOsmol である。いくつかの実施形態では、容量オスモル濃度は約 280 ~ 310 mOsmol である。いくつかの実施形態では、限定培地は、最大約 3.7 g/L、または約 2.2 g/L 重炭酸ナトリウムで補充される。限定培地はさらに、L-グルタミン (約 2 mM の最終濃度)、1つまたは複数の抗生物質、非必須アミノ酸 (NEAA; 約 100 μM の最終濃度)、2-メルカプトエタノール (約 100 μM の最終濃度) で補充され得る。

40

## 【0844】

いくつかの実施形態では、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) に記述される限定培地が、本発明において有用である。簡単に説明すると、RPMI ま

50

たは C T S ( 商 標 ) O p T m i z e r ( 商 標 ) は 基 礎 細 胞 培 地 と し て 使 用 さ れ 、 0 、 2 % 、 5 % 、 ま た は 1 0 % の い ず れ か の C T S ( 商 標 ) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t で 補 充 さ れ た 。

【 0 8 4 5 】

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 及 び / ま た は 第 2 の ガ ス 透 過 性 容 器 中 の 細 胞 培 地 は 濾 過 さ れ て い な い 。 濾 過 さ れ て い な い 細 胞 培 地 の 使 用 は 、 細 胞 数 を 拡 大 す る た め に 必 要 な 手 順 を 簡 素 化 し 得 る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 及 び / ま た は 第 2 の ガ ス 透 過 性 容 器 中 の 細 胞 培 地 に は 、 ベ ー タ - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル ( B M E ま た は M E ; 2 - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル 、 C A S 6 0 - 2 4 - 2 と し て も 知 ら れ て い る ) が 含 ま れ て い な い 。

【 0 8 4 6 】

い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 実 施 例 及 び 図 で 考 察 さ れ る よ う に 、 1 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 2 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 3 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 実 施 例 及 び 図 で 議 論 さ れ る よ う に 、 4 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 2 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 3 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 2 ~ 7 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 3 ~ 7 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ て い る 、 プ レ R E P ま た は プ ラ イ ミ ン グ R E P と 呼 ば れ る こ と も あ る プ ロ セ ス を 含 む ) プ ロ セ ス は 、 4 ~ 8 日 間 で あ る 。 い く つ か の 実 施 形 態 で は 、 第 1 の 増 殖 の プ ラ イ ミ ン グ ( 例 え ば 、 図 1 ( 特 に 、 例 え ば 、 図 1 B 及 び / ま た は 図 1 C 及 び / ま た は 図 1 E 及 び / ま た は 図 1 F 及 び / ま た は 図 1 G ) の ス テ ッ プ B な ど に 記 載 さ れ

10

20

30

40

50



プライミングステップの開始時から、6日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖のプライミングを、断片化の発生時、及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から、6日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖のプライミングを、断片化の発生時、及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から、7日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖のプライミングは、断片化の発生時、及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から、8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖のプライミングは、断片化の発生時、及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から、7日間進行することができる。

【0848】

10

いくつかの実施形態では、T I Lの第1の増殖のプライミングは、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、1日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、1日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、2日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、2日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、3日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、3日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、4日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、4日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、5日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、5日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、6日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、6日～7日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、7日～8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、8日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のT I L増殖は、7日間進行することができる。

20

【0849】

いくつかの実施形態では、I L - 2、I L - 7、I L - 15、及び/またはI L - 21の組み合わせを、第1の増殖のプライミングの組み合わせとして用いる。いくつかの実施形態では、I L - 2、I L - 7、I L - 15、及び/またはI L - 21、ならびに、その任意の組み合わせを、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）による、ならびに本明細書の記載のステップBのプロセス中を含む、第1の増殖のプライミング中に含むことができる。いくつかの実施形態では、I L - 2、I L - 15、及びI L - 21の組み合わせを、第1の増殖のプライミング中に組み合わせとして用いる。いくつかの実施形態では、I L - 2、I L - 15、及びI L - 21、ならびに、その任意の組み合わせを、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）による、及び本明細書に記載されるステップBのプロセス中に含むことができる。

30

【0850】

40

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング、例えば、図1によるステップB（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）を、閉鎖システムバイオリクター内で実行する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖システムをT I L増殖のために用いる。いくつかの実施形態では、閉鎖システムバイオリクターを用いる。いくつかの実施形態では、バイオリクターを容器として用いる。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターは、例えばG - R E X - 10またはG - R E X - 100である。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターはG - R E X - 100である。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターはG - R E X - 10である。

【0851】

50

## 1. フィーダー細胞と抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の4日～8日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の4日～7日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の5日～8日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の5日～7日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の6日～8日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の6日～7日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプライミングREPと称されるもの）では、TIL増殖の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ第1の増殖のプライミング中の7日目または8日目の任意の時に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップB、及びプレREPまたはプ

10

20

30

40

50

イミング R E P と称されるもの)では、T I L 増殖の開始時にフィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を必要とせず、むしろ第 1 の増殖のプライミング中の 8 日目の任意の時に追加される。

【0852】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第 1 の増殖のプライミング手順(例えば、図 1 のステップ B (特に、例えば、図 1 B 及び/または図 1 C 及び/または図 1 E 及び/または図 1 F 及び/または図 1 G)、及びプレ R E P またはプライミング R E P と称されるもの)は、フィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を、T I L 増殖の開始時及び第 1 の増殖のプライミング中に必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な血液ドナーからの標準全血単位から得られる末梢血単核細胞(P B M C)である。P B M C を、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準的な方法を使用して得る。いくつかの実施形態では、 $2.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、 $1 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、 $1.25 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、 $2.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 容器あたり  $1 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 容器あたり  $1.25 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 G R E X - 10 あたり  $2.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 G R E X - 10 あたり  $1 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 G R E X - 10 あたり  $1.25 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 G R E X - 100 あたり  $2.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、1 G R E X - 100 あたり  $1 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。いくつかの実施形態では、G R E X - 100 あたり  $1.25 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、第 1 の増殖のプライミング中に使用する。

【0853】

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

【0854】

いくつかの実施形態では、P B M C は、14 日目の生存細胞の総数が、第 1 の増殖のプライミングの 0 日目に培養液に入れられた最初の生存細胞数よりも少ない場合、複製不能であり、本明細書に記載の T I L 増殖手順での使用に許容可能であるとみなされる。

【0855】

いくつかの実施形態では、P B M C は、O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された、7 日目の生存細胞の総数が、第 1 の増殖のプライミングの 0 日目に培養液に入れられた最初の生存細胞数から増加していない場合、複製不能であり、本明細書に記載の T I L 増殖手順での使用に許容可能であるとみなされる。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $3000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $6000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。

【0856】

いくつかの実施形態では、P B M C は、O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された、7 日目の生存細胞の総数が、第 1 の増殖のプライミングの 0 日目に培養液に入れられた最初の生存細胞数から増加していない場合、複製不能であり、本明細書に記載の T I L 増殖手順での使用に許容可能であるとみなされる。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $5 \sim 60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $1000 \sim 6000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下

10

20

30

40

50

で培養する。いくつかの実施形態では、P B M Cを、10 ~ 50 ng / mlのO K T 3抗体及び2000 ~ 5000 I U / mlのI L - 2の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M Cを、20 ~ 40 ng / mlのO K T 3抗体及び2000 ~ 4000 I U / mlのI L - 2の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M Cを、25 ~ 35 ng / mlのO K T 3抗体及び2500 ~ 3500 I U / mlのI L - 2の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M Cを、30 ng / mlのO K T 3抗体及び6000 I U / mlのI L - 2の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M Cを、15 ng / mlのO K T 3抗体及び3000 I U / mlのI L - 2の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M Cを、15 ng / mlのO K T 3抗体及び6000 I U / mlのI L - 2の存在下で培養する。

10

## 【0857】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞はP B M Cである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第2の増殖におけるT I L対抗原提示フィーダー細胞の比率は、約1対25、約1対50、約1対100、約1対125、約1対150、約1対175、約1対200、約1対225、約1対250、約1対275、1対300、1対325、1対350、1対375、1対400、1対500である。いくつかの実施形態では、第2の増殖におけるT I L対抗原提示フィーダー細胞の比率は、1対50 ~ 1対300である。いくつかの実施形態では、第2の増殖におけるT I L対抗原提示フィーダー細胞の比率は、1対100 ~ 1対200である。

20

## 【0858】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順は、約 $2.5 \times 10^8$ 個のフィーダー細胞対約 $100 \times 10^6$ 個のT I Lの比率を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順は、約 $2.5 \times 10^8$ 個のフィーダー細胞対約 $50 \times 10^6$ 個のT I Lの比率を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順は、約 $2.5 \times 10^8$ 個のフィーダー細胞対約 $25 \times 10^6$ 個のT I Lの比率を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順は、約 $2.5 \times 10^8$ 個のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、第1の増殖のプライミングは、急速な第2の増殖で使用されるフィーダー細胞の数の4分の1、3分の1、12分の5、または2分の1

30

## 【0859】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおける培地は、I L - 2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおける培地は、6000 I U / mlのI L - 2を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおける培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおける培地は、1容器あたり $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおける培地は、O K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり30 ng / mlのO K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、容器はG R E X 100 M C Sフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は6000 I U / mlのI L - 2、30 ng / mlのO K T - 3、及び $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり6000 I U / mlのI L - 2、30 ng / mlのO K T - 3、及び $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり500 mlの培養培地及び $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞あたり15  $\mu$ gのO K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり500 mlの培養培地及び15  $\mu$ gのO K T - 3を含む。いくつかの実施形態では、容器はG R E X 100 M C Sフラスコである。いくつかの実施形態では、培地は500 mlの培養培地及び6000 I U / mlのI L - 2、30 ng / mlのO K T - 3、ならびに $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり500 ml

40

50

の培養培地及び6000 IU/mLのIL-2、15 µgのOKT-3、ならびに $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり500 mLの培養培地及び $2.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞あたり15 µgのOKT-3を含む。

【0860】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミング手順は、第2の増殖中にTILよりも過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な血液ドナーからの標準全血単位から得られる末梢血単核細胞(PBMC)である。PBMCを、Ficoll-Paque勾配分離などの標準的な方法を使用して得る。いくつかの実施形態では、PBMCの代わりに人工抗原提示(aAPC)細胞を使用する。

10

【0861】

一般に、同種異系PBMCは、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載の例示の手順を含む、本明細書に記載のTIL増殖手順で使用される。

【0862】

いくつかの実施形態において、人工抗原提示細胞は、PBMCの代わりとして、またはPBMCと組み合わせて、第1の増殖のプライミングにおいて使用される。

【0863】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖の手順、ならびにPREPまたはプライミングREPと称されるものは、フィーダー細胞(本明細書では「抗原提示細胞」とも称される)を必要とせず、むしろOKT-3を含む抗原提示フィーダー細胞の培養物から得られる培養上清を必要とする。いくつかの実施形態では、培養上清を、IL-2及びOKT-3を補充した培養培地中のPBMCの培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清を、IL-2及びOKT-3を補充した培養培地中で約3日または4日間培養した後のPBMCの培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清を、培養中のPBMCの増殖速度が低下し始めた後、IL-2及びOKT-3を補充した培養培地で培養したPBMCの培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清を、培養中のPBMCの増殖速度が、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上低下した後、IL-2及びOKT-3を補充した培養培地で培養されたPBMCの培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清は、培養培地が枯渇または消費された後に、IL-2及びOKT-3を補充した培養培地で培養されたPBMCの培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清は、培養培地が約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上枯渇または消費された後に、IL-2及びOKT-3を補充した培養培地で培養されたPBMCの培養物から得る。

20

30

【0864】

2. サイトカイン

本明細書に記載の増殖方法は、一般に、当技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にIL-2を含む培養培地を使用する。

40

【0865】

代替的に、第1のTILの増殖のプライミングのために、IL-2、IL-15及びIL-21のうち2つ以上を組み合わせた、サイトカインの組み合わせを使用することは、国際公開番号WO2015/189356号及び同第WO2015/189357号に一般的に概説されており、その全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる。したがって、可能な組み合わせは、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2、IL-15及びIL-21を含み、後者は多くの実施形態での特定の使用が見出されている。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特に明細書に記載のT細胞の産生に特に好都合である。

50

【表 5】

表 4. インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 3 組換えヒト IL-2(rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKG ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
配列番号 5 組換えヒト IL-4(rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKI 120 MREKYSKCSS 130
配列番号 6 組換えヒト IL-7(rhIL-7)	MDCDIEGKDG KYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKLLNDLC FLKRLLEQEK TCWNKILMGT KEH 153
配列番号 7 組換えヒト IL-15(rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LOSFVHVIVQM FINTS 115
配列番号 8 組換えヒト IL-21(rhIL-21)	MQDRHMIRMRL QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLIQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

10

20

【 0 8 6 6 】

C. ステップ C : 第 1 の増殖のプライミングから急速な第 2 の増殖への移行

場合によっては、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示されるステップ B から得た T I L 集団を含む、第 1 の増殖のプライミング ( プレ R E P と称されることもある増殖を含み得る ) から得たバルク T I L 集団を、急速な第 2 の増殖 ( 急速増殖プロトコル ( R E P ) と称されることもある増殖を含み得る ) に供し、次いで、以下で説明するように凍結保存することができる。同様に、遺伝子改変された T I L が治療に使用される場合、第 1 の増殖のプライミングからの増殖させた T I L 集団または急速な第 2 の増殖からの増殖 T I L 集団を、増殖ステップの前または第 1 の増殖のプライミングの後かつ急速な第 2 の増殖の前に、適切な治療のために遺伝子改変に供することができる。

30

【 0 8 6 7 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングから ( 例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示されるステップ B から ) 得た T I L を、選択のために表現型を決定するまで保存する。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングから ( 例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示されるステップ B から ) 得た T I L を保存せず、急速な第 2 の増殖に直接進む。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングから得られた T I L を、第 1 の増殖のプライミング後及び急速な第 2 の増殖の前に凍結保存しない。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングから第 2 の増殖への移行は、腫瘍の断片化の発生時及び / または第 1 の増殖のプライミングステップの開始時から約 2 日目、3 日目、4 日目、5 日目、6 日目、7 日目、または 8 日目に行われる。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖

40

50



殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行は、断片化の発生時及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から6日目～7日目に行われる。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行は、断片化の発生時及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から6日目～8日目に行われる。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行は、断片化の発生時及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から7日目～8日目に行われる。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行は、断片化の発生時及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から7日目に行われる。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行は、断片化の発生時及び/または第1の増殖のプライミングステップの開始時から8日目に行われる。

10

## 【0869】

いくつかの実施形態では、TILを、一次第1の増殖の後及び急速な第2の増殖の前に保存せず、TILを、急速な第2の増殖に直接進める(例えば、いくつかの実施形態では、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に示されるステップBからステップDへの移行中の保存がない)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、移行を閉鎖システムで行う。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングからのTIL、第2のTILの集団を、移行期間なしに急速な第2の増殖に直接進める。

## 【0870】

20

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングからの急速な第2の増殖への移行、例えば、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)によるステップCを、閉鎖システムバイオリクター内で実行する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖システムをTIL増殖のために用いる。いくつかの実施形態では、単一バイオリクターを用いる。いくつかの実施形態では、用いる単一バイオリクターは、例えばGREX-10またはGREX-100である。いくつかの実施形態では、閉鎖システムバイオリクターは単一バイオリクターである。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングを、急速な第2の増殖よりも小さい容器で実施する。いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングをGREX-100で実施し、急速な第2の増殖をGREX-500で実施する。

30

## 【0871】

## D. ステップD: 急速な第2の増殖

いくつかの実施形態では、腫瘍の採取及び断片化及び第1の増殖のプライミング後、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に示されるステップA及びステップB、ならびにステップCとして称される移行の後、TIL細胞集団の数をさらに増殖させる。このさらなる増殖は、本明細書では急速な第2の増殖と称され、これは、当技術分野で一般に急速増殖プロセス(急速増殖プロトコルまたはREP、ならびに図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)のステップDに示すプロセス)と称される増殖プロセスを含むことができる。急速な第2の増殖は、一般に、ガス透過性容器内で、フィーダー細胞及び/またはフィーダー細胞培養上清、サイトカイン源、及び抗CD3抗体を含む多くの成分を含む培養培地を使用して達成される。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖の開始から1日、2日、3日、または4日後(すなわち、Gen3プロセス全体の8、9、10、または11日目)に、TILは、より大容量の容器に移される。いくつかの実施形態では、この急速な第2の増殖は、活性化IIと称される。

40

## 【0872】

いくつかの実施形態では、TILの急速な第2の増殖(REPと称されることもある増

50

殖、ならびに図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G) に示されるステップ D) は、当業者に周知の任意の T I L フラスコまたは容器を使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、または 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 1 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 1 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 2 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 2 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 3 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 3 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 4 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 4 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 5 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 5 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 6 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 6 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 7 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 7 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 8 日 ~ 約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 8 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 9 日 ~ 約 10 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 1 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 2 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 3 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 4 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 5 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 6 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 7 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 8 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 9 日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第 2 の T I L の増殖は、急速な第 2 の増殖の開始後、約 10 日間進行することができる。

### 【 0 8 7 3 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖は、本開示の方法 ( R E P と称されることもある増殖、ならびに図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G) に示されるステップ D) を使用して、ガス透過性容器内で実施することができる。いくつかの実施形態では、T I L を、I L - 2、O K T - 3、及びフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) の存在下で急速な第 2 の増殖において増殖させる。いくつかの実施形態では、T I L を、I L - 2、O K T - 3、及びフィーダー細胞の存在下で急速な第 2 の増殖において増殖させ、フィ

ーダー細胞を、第1の増殖のプライミングに存在するフィーダー細胞の濃度の2倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍、または4倍である最終濃度まで添加する。例えば、TILは、インターロイキン2 (IL-2) またはインターロイキン-15 (IL-15) の存在下で非特異的なT細胞受容体刺激を使用して急速に増殖させることができる。非特異的T細胞受容体刺激は、例えば、抗CD3抗体、例えば約30 ng/mlのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体 (Ortho-McNeil、Raritan、NJ または Miltenyi Biotech、Auburn、CA から市販される) または UHCT-1 (BioLegend、San Diego、CA、USA から市販される) を含むことができる。TILは、ヒト白血球抗原A2 (HLA-A2) 結合ペプチド、例えば、0.3 μMのMART-1:26-35 (27L) または gp100:209-217 (210M) など、任意に300 IU/ml IL-2 または IL-15 などのT細胞増殖因子の存在下で、任意にベクターから発現させることができる、がんのエピトープなどのその抗原性部分を含めて、第2の増殖中に1つまたは複数の抗原を含めることによって、インビトロでTILのさらなる刺激を誘導するために増殖させることができる。他の適切な抗原には、例えば、NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼ癌抗原、MAGE-A3、SSX-2、及びVEGFR2、またはそれらの抗原部分が含まれ得る。TILは、HLA-A2発現抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原による再刺激によっても急速に増殖させ得る。あるいは、TILは、例えば、例えば照射された、自己由来リンパ球、または照射HLA-A2 + 同種異系リンパ球及びIL-2でさらに再刺激することができる。いくつかの実施形態では、再刺激を、第2の増殖の一部として行う。いくつかの実施形態では、第2の増殖を、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたHLA-A2 + 同種異系リンパ球及びIL-2と共に進行。

#### 【0874】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000 IU/mlのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1000 IU/ml、約1500 IU/ml、約2000 IU/ml、約2500 IU/ml、約3000 IU/ml、約3500 IU/ml、約4000 IU/ml、約4500 IU/ml、約5000 IU/ml、約5500 IU/ml、約6000 IU/ml、約6500 IU/ml、約7000 IU/ml、約7500 IU/ml、または約8000 IU/mlのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1000 ~ 2000 IU/ml、2000 ~ 3000 IU/ml、3000 ~ 4000 IU/ml、4000 ~ 5000 IU/ml、5000 ~ 6000 IU/ml、6000 ~ 7000 IU/ml、7000 ~ 8000 IU/ml、または8000 IU/mlの間のIL-2を含む。

#### 【0875】

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

## 【 0 8 7 6 】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地はIL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は6000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、1容器あたり $7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地はOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖の培地は、1容器あたり500 mLの培養培地及び30 µgのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器はGREX100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖の培地は、6000 IU/mLのIL-2、60 ng/mLのOKT-3、及び $7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり500 mLの培養培地及び6000 IU/mLのIL-2、30 µgのOKT-3、ならびに $7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

## 【 0 8 7 7 】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地はIL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は6000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は1容器あたり $5 \times 10^8$ 個~ $7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地はOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖の培地は、1容器あたり500 mLの培養培地及び30 µgのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器はGREX100 MCSフラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、6000 IU/mLのIL-2、60 ng/mLのOKT-3、及び $5 \times 10^8$ 個~ $7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、1容器あたり500 mLの培養培地及び6000 IU/mLのIL-2、30 µgのOKT-3、ならびに $5 \times 10^8$ 個~ $7.5 \times 10^8$ 個の抗原提示フィーダー細胞を含む。

## 【 0 8 7 8 】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つまたは複数のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルバム、EU-101、融合タンパク質、ならびにその断片、誘導體、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストを、細胞培養培地中で0.1 µg/mL~100 µg/mLの濃度を実現するのに十分な濃度で添加する。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストを、細胞培養培地中で20 µg/mL~40 µg/mLの濃度を実現するのに十分な濃度で添加する。

## 【 0 8 7 9 】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数のTNFRSFアゴニストに加えて、細胞培養培地は、IL-2を約3000 IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3抗体を約30 ng/mLの初期濃度で含み、1つまたは複数のTNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。

## 【 0 8 8 0 】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及びIL-21の組み合わせを、第2の増殖中に組み合わせとして用いる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び/またはIL-21、ならびに、その任意の組み合わせを、例えば、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)による、ならびに、本明細書に記載のステップDのプロセス中を含む、第2の増殖中に含むことができる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21の組み合わせを、第2の増殖中に組み合わせとして用いる。いく

つかの実施形態では、IL - 2、IL - 15、及びIL - 21、ならびに、その任意の組み合わせを、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）による、ならびに本明細書に記載されるステップDのプロセス中に含むことができる。

【0881】

いくつかの実施形態では、第2の増殖は、IL - 2、OKT - 3、抗原提示フィーダー細胞、及び任意にTNFRSFアゴニストを含む補足細胞培養培地で行うことができる。いくつかの実施形態では、第2の増殖を、補充された細胞培養培地で行う。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、IL - 2、OKT - 3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第2の細胞培養培地は、IL - 2、OKT - 3、及び抗原提示細胞（APC；抗原提示フィーダー細胞とも称される）及び/またはOKT - 3を含むAPCの培養物からの培養上清を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖を、IL - 2、OKT - 3、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地で行う。

10

【0882】

いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約500IU/mLのIL - 15、約400IU/mLのIL - 15、約300IU/mLのIL - 15、約200IU/mLのIL - 15、約180IU/mLのIL - 15、約160IU/mLのIL - 15、約140IU/mLのIL - 15、約120IU/mLのIL - 15、または約100IU/mLのIL - 15を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約500IU/mLのIL - 15～約100IU/mLのIL - 15を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約400IU/mLのIL - 15～約100IU/mLのIL - 15を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約300IU/mLのIL - 15～約100IU/mLのIL - 15を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約200IU/mLのIL - 15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180IU/mLのIL - 15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL - 15をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180IU/mLのIL - 15を含む。

20

【0883】

いくつかの実施形態では、第2の増殖細胞培養培地は、約20IU/mLのIL - 21、約15IU/mLのIL - 21、約12IU/mLのIL - 21、約10IU/mLのIL - 21、約5IU/mLのIL - 21、約4IU/mLのIL - 21、約3IU/mLのIL - 21、約2IU/mLのIL - 21、約1IU/mLのIL - 21、または約0.5IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約20IU/mLのIL - 21～約0.5IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約15IU/mLのIL - 21～約0.5IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約12IU/mLのIL - 21～約0.5IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約10IU/mLのIL - 21～約0.5IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約5IU/mLのIL - 21～約1IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約2IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5IU/mLのIL - 21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL - 21をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1IU/mLのIL - 21を含む。

30

40

【0884】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（APC）はPBMCである。いくつかの実施形態では、急速な増殖及びまたは第2の増殖における、TILのPBMC及び/または抗原提示細胞に対する比率は、約1対10、約1対15、約1対20、約1対25、約1対

50

30、約1対35、約1対40、約1対45、約1対50、約1対75、約1対100、約1対125、約1対150、約1対175、約1対200、約1対225、約1対250、約1対275、約1対300、約1対325、約1対350、約1対375、1対400、約1対500である。いくつかの実施形態では、急速な増殖及び/または第2の増殖における、TIL対PBMCの比率は、1対50～1対300である。いくつかの実施形態では、急速な増殖及び/または第2の増殖における、TIL対PBMCの比率は、1対100～1対200である。

#### 【0885】

いくつかの実施形態では、REP及び/または急速な第2の増殖を、バルクTILが100倍または200倍過剰の不活化フィーダー細胞と混合された状態でフラスコ内にて実施し、フィーダー細胞濃度は、30ng/mLのOKT3抗CD3抗体及び6000IU/mLのIL-2を150mLの培地、第1の増殖のプライミングにおけるフィーダー細胞濃度の、少なくとも1.1倍(1.1x)、1.2x、1.3x、1.4x、1.5x、1.6x、1.7x、1.8x、1.8x、2x、2.1x、2.2x、2.3x、2.4x、2.5x、2.6x、2.7x、2.8x、2.9x、3.0x、3.1x、3.2x、3.3x、3.4x、3.5x、3.6x、3.7x、3.8x、3.9xまたは4.0xである。培地の交換(一般に、2/3の使用済み培地を吸引し、同量の新鮮な培地と交換することを介した2/3の培地交換)を細胞が代替成長チャンバーに移されるまで行う。代替成長チャンバーは、GREXフラスコ及びガス透過性容器を含み、以下でより詳しく説明する。

10

20

#### 【0886】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖(REPプロセスと称されるプロセスを含み得る)は、実施例及び図で論じられるように、7～9日間である。いくつかの実施形態では、第2の増殖は7日間である。いくつかの実施形態では、第2の増殖は8日間である。いくつかの実施形態では、第2の増殖は9日間である。

#### 【0887】

いくつかの実施形態では、第2の増殖(これは、REPと称される増殖、ならびに図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)のステップDで言及するものを含み得る)は、100cmのガス透過性シリコン底を備えた500mL容量のガス透過性フラスコ(G-Rex100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation、New Brighton、MN、USAから市販)中で実施され得、 $5 \times 10^6$ または $10 \times 10^6$ のTILが、5%ヒトAB血清、1mLあたり3000IUのIL-2及び1mLあたり30ngの抗CD3(OKT3)が補充された、400mLの50/50培地中でPBMCと一緒に培養され得る。G-Rex100フラスコを、5%のCO<sub>2</sub>中、37℃でインキュベートし得る。5日目に、250mLの上清を取り出して遠心分離ボトルに入れ、1500rpm(491xg)で10分間遠心分離する。TILペレットを、5%ヒトAB血清、1mLあたり6000IUのIL-2を含む150mLの新鮮な培地で再懸濁し、元のGREX-100フラスコに戻し入れる。TILをGREX-100フラスコで連続的に増殖させる場合、10日目または11日目にTILをGREX-500などのより大きなフラスコに移すことができる。細胞は、培養14日目に採取することができる。細胞は、培養15日目に採取することができる。細胞は、培養16日目に採取することができる。いくつかの実施形態では、細胞が代替成長チャンバーに移されるまで、培地交換を行う。いくつかの実施形態では、使用済み培地を吸引し同量の新鮮な培地交換することによって2/3の培地を交換する。いくつかの実施形態では、代替成長チャンバーは、GREXフラスコ及びガス透過性容器を含み、以下でより詳しく説明する。

30

40

#### 【0888】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、1つまたは複数の新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアウト及び/またはスケールアップさせる。

50

## 【0889】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、急速増殖が開始された元の培養容器とサイズが等しい複数の新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアウトさせる。いくつかの実施形態では、新しい培養容器のそれぞれはG - r e x 10M培養容器であり、元の培養容器はG - r e x 10M培養容器である。いくつかの実施形態では、新しい培養容器のそれぞれはG - r e x 100M培養容器であり、元の培養容器はG - r e x 100M培養容器である。

## 【0890】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、急速増殖が開始された元の培養容器よりもサイズが大きい新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアップさせる。

10

## 【0891】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、急速増殖が開始された元の培養容器よりもサイズが大きい複数の新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアウトさせる。

## 【0892】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、急速増殖が開始された元の培養容器とサイズが等しい、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアウトさせる。

20

## 【0893】

いくつかの実施形態では、元の培養容器内の培養物は、新しい培養容器に均等に分配される。

## 【0894】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、急速増殖が開始された元の培養容器とサイズが等しい5つの新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアウトさせる。いくつかの実施形態では、元の培養容器内の培養物は、5つの新しい培養容器に均等に分配される。

## 【0895】

いくつかの実施形態では、急速増殖の10日目または11日目に、IL - 2を補充した新鮮な培養培地を含有する、1つまたは複数の新しい培養容器に培養物を移すことにより、培養をスケールアウト及び/またはスケールアップさせる。いくつかの実施形態では、新しい培養容器のそれぞれは、急速な増殖が開始された元の培養容器の培養培地と同じかまたは異なる新鮮な培養培地を含む。いくつかの実施形態では、新しい培養容器のそれぞれは、元の培養容器内の培養培地とは異なる新鮮な培養培地を含む。いくつかの実施形態では、新しい培養容器のそれぞれが新鮮なDM2培養培地を含み、元の培養容器はDM1培養培地を含む。

30

## 【0896】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される増殖プロセスで使用される培養培地は、無血清培地または限定培地である。いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、血清含有培地のロット間の変動に一部起因する実験的変動を予防及び/または減少させるために使用される。

40

## 【0897】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS(商標)OpTmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium、CTS(商標)OpTmizer(商標)T-Cell Expansion SFM、CTS(商標)AIM-V Medium、CTS(商標)AIM-V SFM、LymphoONE(商標)T-Cell Expansion Xeno

50

- Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumが含まれる。

【0898】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清置換物は、CTS (商標) Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化物、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の抗生物質、及び1つまたは複数の微量元素を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

【0899】

いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Immune Cell Serum Replacementを、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium、CTS (商標) Optmizer (商標) T-Cell Expansion SFM、CTS (商標) AIM-V Medium、CTS (商標) AIM-V SFM、LymphoONE (商標) T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumが含まれるが、これらに限定されない、従来増殖培地と一緒に使用する。

【0900】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地中の総血清置換物濃度(体積%)は、総無血清または限定培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約10%である。

【0901】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、CTS (商標) Optmizer

(商標) T - Cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。任意の CTS (商標) OpTmizer (商標) の製剤が、本発明において有用である。CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、1 L の CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion Basal Medium と 26 mL の CTS (商標) OpTmizer (商標) T - Cell Expansion Supplement を組み合わせたもので、使用前に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が、55 mM で 2 -メルカプトエタノールと一緒に補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充され、培地中の 2 -メルカプトエタノールの最終濃度が 55  $\mu$ M である。

10

【0902】

いくつかの実施形態では、限定培地は、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。任意の CTS (商標) OpTmizer (商標) の製剤が、本発明において有用である。CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、1 L の CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion Basal Medium と 26 mL の CTS (商標) OpTmizer (商標) T - Cell Expansion Supplement を組み合わせたもので、使用前に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が、55 mM で 2 -メルカプトエタノールと一緒に補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充され、さらに約 3000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L - グルタミンが補充され、さらに約 6000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T - cell Expansion SFM は、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum

20

30

40

50

Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充され、さらに約1000IU/mL~約8000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充され、さらに約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充され、さらに約1000IU/mL~約6000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約1000IU/mL~約8000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約6000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)が補充され、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は55µMである。

#### 【0903】

いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度のグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))が補充される。いくつかの実施形態において、無血清培地または限定培地は、約2mMの濃度でグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))が補充される。

#### 【0904】

いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM~約100mM、35mM~約95mM、40mM~約90mM、45mM~約85mMまで、50mM~約80mM、55mM~約75mM、60mM~約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充される。いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充される。

#### 【0905】

いくつかの実施形態では、国際PCT公開第WO/1998/030679号に記載され、参照により本明細書に組み込まれる、限定培地が、本発明において有用である。その公開では、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地は、無血清培養における細胞の増殖を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地を含む。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化物質

、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つまたは複数の成分を含むか、または組み合わせることによって得られる。いくつかの実施形態では、限定培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/またはベータ-メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、及び1つまたは複数の微量元素からなる群から選択される、1つまたは複数の成分とを含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基本細胞培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI 増殖用培地、及び Iscove's Modified Dulbecco's Medium からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

#### 【0906】

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

#### 【0907】

いくつかの実施形態では、限定培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1x培地の濃度範囲」という見出しの下の列に列挙された濃度範囲で存在する。他の実施形態では、限定培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1x培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙された最終濃度で存在する。他の実施形態では、限定培地は、無血清培地を含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のいくつかでは、無血清サプリメントは、表4の「サプリメントにおける好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙されたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

#### 【0908】

いくつかの実施形態では、限定培地の容量オスモル濃度は、約260~350 mOsmolである。いくつかの実施形態では、容量オスモル濃度は約280~310 mOsmolである。いくつかの実施形態では、限定培地は、最大約3.7 g/L、または約2.2

g / L 重炭酸ナトリウムで補充される。限定培地はさらに、L - グルタミン (約 2 mM の最終濃度)、1 つまたは複数の抗生物質、非必須アミノ酸 (NEAA ; 約 100 μM の最終濃度)、2 - メルカプトエタノール (約 100 μM の最終濃度) で補充され得る。

【0909】

いくつかの実施形態では、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) に記述される限定培地が、本発明において有用である。簡単に説明すると、RP MI または CTS (商標) OpTmizer (商標) は基礎細胞培地として使用され、0、2%、5%、または 10% のいずれかの CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement で補充される。

10

【0910】

いくつかの実施形態では、第 1 及び / または第 2 のガス透過性容器中の細胞培地は濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞数を増加させるために必要な手順を簡素化し得る。いくつかの実施形態では、第 1 及び / または第 2 のガス透過性容器中の細胞培地には、ベータ - メルカプトエタノール (BME または ME ; 2 - メルカプトエタノール、CAS 60 - 24 - 2 としても知られている) が含まれていない。

【0911】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖 (REP と称される増殖を含む) が実施され、優れた腫瘍反応性について TIL が選択されるステップをさらに含む。当技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第 2016 / 0010058 A 1 号に記載される方法が、優れた腫瘍反応性について TIL を選択するために使用され得、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0912】

必要に応じて、当技術分野で周知の標準的なアッセイを使用して、急速な第 2 の増殖 (REP 増殖と称される増殖を含む) の後に細胞生存率アッセイを実施することができる。例えば、バルク TIL のサンプルに対してトリパンプル - 排除アッセイを行うことができ、これは、死んだ細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にする。いくつかの実施形態では、TIL サンプルを計数し、Cellometer K2 自動細胞計数器 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) を使用して生存率を決定することができる。いくつかの実施形態では、生存率は、標準的な Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter プロトコルに従って決定される。

30

【0913】

T リンパ球と B リンパ球の多様な抗原受容体は、限定されるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント、すなわち V (可変)、D (多様性)、J (結合)、及び C (一定) は、免疫グロブリンと T 細胞受容体 (TCR) の結合特異性と下流の用途を決定する。本発明は、T 細胞レパートリーの多様性を示し、増加させる TIL を生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られる TIL は、T 細胞レパートリーの多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖で得られた TIL は、T 細胞レパートリーの多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び / または T 細胞受容体の多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は T 細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択される T 細胞受容体のうちの 1 つにある。いくつかの実施形態では、T 細胞受容体 (TCR) アルファ及び / またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では

40

50

、T細胞受容体(TCR)アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体(TCR)ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCRa b(すなわち、TCR / )の発現が増加する。

【0914】

いくつかの実施形態では、以下で詳細が説明されるように、急速な第2の増殖培養培地(例えば、CM2または第2の細胞培養培地と称されることもある)は、IL-2、OKT-3、ならびに、抗原提示フィーダー細胞(APC)及び/または、OKT-3を含むAPCの培養物からの培養上清を含む。いくつかの実施形態では、以下で詳細が説明されるように、急速な第2の増殖培養培地(例えば、CM2または第2の細胞培養培地と称されることもある)は、6000 IU/mLのIL-2、30 µg/フラスコのOKT-3、ならびに、7.5 × 10<sup>8</sup>個の抗原提示フィーダー細胞(APC)を含む。いくつかの実施形態では、以下で詳細が説明されるように、急速な第2の増殖培養培地(例えば、CM2または第2の細胞培養培地と称されることもある)は、IL-2、OKT-3、ならびに、抗原提示フィーダー細胞(APC)を含む。いくつかの実施形態では、以下で詳細が説明されるように、急速な第2の増殖培養培地(例えば、CM2または第2の細胞培養培地と称されることもある)は、6000 IU/mLのIL-2、3 µg/フラスコのOKT-3、ならびに、5 × 10<sup>8</sup>個の抗原提示フィーダー細胞(APC)を含む。

10

【0915】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖、例えば、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)によるステップDを、閉鎖システムバイオリクター内で実行する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖システムをTIL増殖のために用いる。いくつかの実施形態では、バイオリクターを用いる。いくつかの実施形態では、バイオリクターを容器として用いる。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターは、例えばG-REX-100またはG-REX-500である。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターはG-REX-100である。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターはG-REX-500である。

20

【0916】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞及び培養上清

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第2に増殖の手順(例えば、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)のステップD、ならびにREPと称されるもの)は、REP TIL増殖中及び/または急速な第2の増殖中及び/またはOKT-3を含むフィーダー細胞(例えばAPC)の培養物の培養上清に過剰なフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な血液ドナーからの標準全血単位から得られる末梢血単核細胞(PBMC)である。PBMCを、Ficoll-Paque勾配分離などの標準的な方法を使用して得る。

30

【0917】

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

40

【0918】

いくつかの実施形態では、PBMCは、7日または14日目の生存細胞の総数が、REPの0日目及び/または第2の増殖0日目(すなわち、第2の増殖の開始日)に培地に入れられた最初の生存細胞数よりも少ない場合、複製不能であり、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用に許容可能であるとみなされる。

【0919】

いくつかの実施形態では、PBMCは、7日または14日目のOKT3及びIL-2の存在下で培養された生存細胞の総数が、REPの0日目及び/または第2の増殖0日目(すなわち、第2の増殖の開始日)に培地に入れられた最初の生存細胞数から増加していな

50

い場合、複製不能であり、本明細書に記載の T I L 増殖手順での使用に許容可能であるとみなされる。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \text{ ng/ml}$  O K T 3 抗体及び  $3000 \text{ IU/ml}$  I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $6000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $3000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $6000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。

【0920】

いくつかの実施形態では、P B M C は、7日または14日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された生存細胞の総数が、R E P の 0 日目及び / または第 2 の増殖 0 日目 (すなわち、第 2 の増殖の開始日) に培地に入れられた最初の生存細胞数から増加していない場合、複製不能であり、本明細書に記載の T I L 増殖手順での使用に許容可能であるとみなされる。いくつかの実施形態では、P B M C を  $30 \sim 60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $1000 \sim 6000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \sim 60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $2000 \sim 5000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \sim 60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $2000 \sim 4000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \sim 60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $2500 \sim 3500 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。いくつかの実施形態では、P B M C を、 $30 \sim 60 \text{ ng/ml}$  の O K T 3 抗体及び  $6000 \text{ IU/ml}$  の I L - 2 の存在下で培養する。

【0921】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は P B M C である。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖における T I L 対抗原提示フィーダー細胞の比率は、約 1 対 10、約 1 対 25、約 1 対 50、約 1 対 100、約 1 対 125、約 1 対 150、約 1 対 175、約 1 対 200、約 1 対 225、約 1 対 250、約 1 対 275、1 対 300、1 対 325、1 対 350、1 対 375、1 対 400、1 対 500 である。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖における T I L 対抗原提示フィーダー細胞の比率は、1 対 50 ~ 1 対 300 である。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖における T I L 対抗原提示フィーダー細胞の比率は、1 対 100 ~ 1 対 200 である。

【0922】

いくつかの実施形態では、 $5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を、急速の第 2 の増殖プロセス中に使用する。いくつかの実施形態では、 $2 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、急速の第 2 の増殖プロセス中に使用する。いくつかの実施形態では  $2.5 \times 10^9$  個のフィーダー細胞を、急速の第 2 の増殖プロセス中に使用する。

【0923】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第 2 の増殖の手順は、約  $5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞対約  $100 \times 10^6$  個の T I L の比率を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第 2 の増殖の手順は、約  $7.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞対約  $100 \times 10^6$  個の T I L の比率を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第 2 の増殖の手順は、約  $5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞対約  $50 \times 10^6$  個の T I L の比率を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第 2 の増殖の手順は、約  $7.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞対約  $50 \times 10^6$  個の T I L の比率を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第 2 の増殖の手順は、約  $5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞対約  $25 \times 10^6$  個の T I L を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第 2 の増殖の手順は、約  $7.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞対約  $25 \times 10^6$  個の T I L を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第 2 の増殖は、急速な第 2 の増殖の 2 倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第 1 の増殖のプライミングが、約  $2.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第 2

の増殖は約  $5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第1の増殖のプライミングが、約  $2.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の増殖は約  $7.5 \times 10^8$  個のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第2の増殖は、第1の増殖のプライミングの2倍 ( $2.0 \times$ )、 $2.5 \times$ 、 $3.0 \times$ 、 $3.5 \times$  または  $4.0 \times$  のフィーダー細胞数を必要とする。

【0924】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第2の増殖の手順は、急速な第2の増殖中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種の健康な血液ドナー由来の標準全血単位から得られる末梢血単核細胞 (P B M C) である。P B M C を、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準的な方法を使用して得る。いくつかの実施形態では、P B M C の代わりに人工抗原提示 (a A P C) 細胞を使用する。いくつかの実施形態では、O K T - 3 を含む a A P C の培養物由来の培養上清を使用する。いくつかの実施形態では、P B M C を、第1の増殖のプライミングに添加された P B M C の濃度の2倍で急速な第2の増殖に添加する。

10

【0925】

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

【0926】

いくつかの実施形態において、人工抗原提示細胞は、P B M C の代わりとして、または P B M C と組み合わせて、急速な第2の増殖において使用される。

20

【0927】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第2の増殖の手順、ならびに R E P プロセスと称されるものは、フィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ O K T - 3 を含む抗原提示フィーダー細胞の培養物から得られる培養上清を必要とする。いくつかの実施形態では、培養上清を、I L - 2 及び O K T - 3 を補充した培養培地中の P B M C の培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清を、I L - 2 及び O K T - 3 を補充した培養培地中で約3日または4日間培養した後の P B M C の培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清を、培養中の P B M C の増殖速度が低下し始めた後、I L - 2 及び O K T - 3 を補充した培養培地で培養した P B M C の培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清を、培養中の P B M C の増殖速度が、約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上低下した後、I L - 2 及び O K T - 3 を補充した培養培地で培養された P B M C の培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清は、培養培地が枯渇または消費された後に、I L - 2 及び O K T - 3 を補充した培養培地で培養された P B M C の培養物から得る。いくつかの実施形態では、培養上清は、培養培地が約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上枯渇または消費された後に、I L - 2 及び O K T - 3 を補充した培養培地で培養された P B M C の培養物から得る。

30

【0928】

一実施形態では、第1の増殖のプライミング手順も急速な第2の増殖手順もフィーダー細胞を必要としないが、むしろ O K T - 3 を含むフィーダー細胞の培養物から得られる培養上清を必要とする。一実施形態では、第1の増殖のプライミング手順も急速な第2の増殖手順もフィーダー細胞を必要としないが、むしろ第1の増殖のプライミングは O K T - 3 を含むフィーダー細胞の第1の培養物から得られる培養上清を必要とし、急速な第2の増殖は、O K T - 3 を含む第2のフィーダー細胞の培養から得られた第2の培養上清を必要とする。他の実施形態では、第1の増殖のプライミング手順はフィーダー細胞を必要とし、急速な第2の増殖手順は O K T - 3 を含むフィーダー細胞の培養物から得られる培養上清を必要とする。さらに他の実施形態では、第1の増殖のプライミング手順は、O K T - 3 を含むフィーダー細胞の培養物から得られる培養上清を必要とし、急速な第2の増殖

40

50

手順はフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、第1の増殖のプライミング手順及び急速な第2の増殖手順の両方がフィーダー細胞を必要とする。

【0929】

本明細書に記載の急速な第2の増殖方法は、一般に、当技術分野で周知の高用量のサイトカイン、特にIL-2を含む培養培地を使用する。

【0930】

代替的に、TILの急速な第2の増殖のために、WO2015/189356及びWO2015/189357（これにより、その全体が参照により明確に組み込まれる）に一般的に概説されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上を組み合わせ、サイトカインの組み合わせを使用することがさらに可能である。したがって、可能性のある組み合わせは、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2、IL-15及びIL-21を含み、後者は多くの実施形態での特定の使用が見出されている。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特に明細書に記載のT細胞の産生に特に好都合である。

10

【0931】

E. ステップE：TILの採取

急速な第2の増殖ステップの後、細胞を採取することができる。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に記載される、1回、2回、3回、4回以上の増殖ステップの後に採取される。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に記載される、2回の増殖ステップの後に採取される。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に記載される、1回は第1の増殖のプライミングであり、1回は急速な第2の増殖である、2回の増殖ステップの後に採取される。

20

【0932】

TILは、例えば遠心分離を含む、任意の適切かつ無菌の方法で採取することができる。TILの採取の方法は当技術分野で周知であり、そのような既知の方法はいずれも本プロセスで使用することができる。いくつかの実施形態では、TILを、自動システムを使用して採取する。

30

【0933】

細胞ハーベスター及び/または細胞処理システムは、例えば、Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer、及びInotech Biosystems International, Inc.を含む様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースのハーベスターを本方法で使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞ハーベスター及び/または細胞処理システムは、膜ベースの細胞ハーベスターである。いくつかの実施形態では、細胞採取は、LOVOシステム（Fresenius Kabiによって製造された）などの細胞処理システムを介して行われる。「LOVO細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を無菌状態及び/または閉鎖システム環境の回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターを通してポンピングすることができ、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去するための連続フロー及び細胞処理を可能にする、任意のベンダーによって製造された任意の機器またはデバイスも指す。いくつかの実施形態では、細胞ハーベスター及び/または細胞処理システムは、細胞の分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び/または密閉された無菌システムでの他の細胞処理ステップを実施することができる。

40

【0934】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）によるステップDを、閉鎖システムバイオリアクター内で実行する。いくつかの実施形態では、本

50

明細書に記載されるように、閉鎖システムをT I L 増殖のために用いる。いくつかの実施形態では、バイオリクターを用いる。いくつかの実施形態では、バイオリクターを容器として用いる。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターは、例えばG - R E X - 1 0 0 またはG - R E X - 5 0 0 である。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターはG - R E X - 1 0 0 である。いくつかの実施形態では、用いるバイオリクターはG - R E X - 5 0 0 である。

【 0 9 3 5 】

いくつかの実施形態では、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) によるステップ E を、本明細書に記載のプロセスに従って実施する。いくつかの実施形態では、閉鎖システムは、システムの無菌性及び閉鎖性を維持するために、無菌条件下で注射器を介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の閉鎖システムを使用する。

10

【 0 9 3 6 】

いくつかの実施形態では、T I L を、本明細書に記載の方法に従って採取する。いくつかの実施形態では、1 4 日目 ~ 1 6 日目のT I L を、本明細書に記載の方法を使用して採取する。いくつかの実施形態では、T I L を 1 4 日目に、本明細書に記載の方法を使用して採取する。いくつかの実施形態では、T I L を 1 5 日目に、本明細書に記載の方法を使用して採取する。いくつかの実施形態では、T I L を 1 6 日目に、本明細書に記載の方法を使用して採取する。

【 0 9 3 7 】

20

F . ステップ F : 最終調合 / 輸液バッグへの移し替え

図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に例示的な順番で提供され、上記及び本明細書で詳細に概説される、A ~ E のステップが完了した後に、細胞を、患者への投与に使用するために容器に移す。いくつかの実施形態では、治療上十分な数のT I L が上記の増殖方法を使用して得られると、患者への投与に使用するために容器に移す。

【 0 9 3 8 】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して増殖されたT I L を、薬学的組成物として患者に投与する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、無菌緩衝液中のT I L の懸濁液である。本明細書に開示されるように増殖させたT I L は、当技術分野で周知の任意の適切な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、T I L は、単一の動脈内または静脈内注入として投与される、投与は、好ましくは約 3 0 ~ 6 0 分間持続する。他の適切な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内が含まれる。

30

【 0 9 3 9 】

G . P B M C フィーダー細胞比率

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の増殖方法で使用される培養培地 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) を参照) は、抗 C D 3 抗体、例えば、O K T - 3 を含む。I L - 2 と組み合わせた抗 C D 3 抗体は、T I L 集団のT 細胞の活性化と細胞分裂を誘導する。この効果は、完全長の抗体だけでなく、F a b 及びF ( a b ' ) 2 フラグメントでも見られるが、一般的には前者が好まれる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、例えば、T s o u k a s e t a l . , J . I m m u n o l . 1 9 8 5 , 1 3 5 , 1 7 1 9 を参照されたい。

40

【 0 9 4 0 】

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

A . T 細胞の体積 (直径 1 0 μ m ) :  $V = ( 4 / 3 ) r^3 = 5 2 3 . 6 \mu m^3$

B . 高さ 4 0 μ m (細胞 4 個) の G - R e x 1 0 0 ( M ) のカラム :  $V = ( 4 / 3 ) r^3 = 4 \times 1 0^{12} \mu m^3$

C . カラム B を満たすために必要な細胞の数 :  $4 \times 1 0^{12} \mu m^3 / 5 2 3 . 6 \mu m^3 = 7 . 6 \times 1 0^8 \mu m^3 * 0 . 6 4 = 4 . 8 6 \times 1 0^8$

50

D . 4 D空間で最適に活性化できる細胞の数： $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$

E . G - R e x 500に外挿された、フィーダーとTILの数：TIL： $100 \times 10^6$   
及びフィーダー： $2.5 \times 10^9$

この計算では、底辺が $100 \text{ cm}^2$ のシリンダー内でTILを活性化するための20面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値を使用した。NCI実験データを厳密に反映するT細胞の閾値活性化について、計算により実験結果として約 $5 \times 10^8$ を導出した。(1)(C)乗数(0.64)は、1992(2)年にJaegerとNagelによって計算された等価球のランダム充填密度である。(D)除数24は、4次元空間「ニュートン数」で類似のオブジェクトに接触する可能性のある等価な球の数である。(3)

(1) Jin, Jianjian, et al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283~292.

(2) Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20; 255(5051): 1523-31.

(3) O. R. Musin (2003). 「The problem of the twenty-five spheres」. Russ. Math. Surv. 58(4) : 794~795.

【0941】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞数は、急速な第2の増殖中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、急速な第2増殖の細胞培養培地と比較しておよそ50%少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中で第1の増殖のプライミングを実施することを含む。

【0942】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞(APC)の数は、プライミング第1の増殖中に外因的に供給されるAPCの数より多い。

【0943】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、1.1:1~20:1または約1.1:1~約20:1の範囲である。

【0944】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、1.1:1~10:1または約1.1:1~約10:1の範囲である。

【0945】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、1.1:1~9:1または約1.1:1~約9:1の範囲である。

【0946】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、1.1:1~8:1または約1.1:1~約8:1の範囲である。

【0947】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、1.1:1~7:

10

20

30

40

50

1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 7 : 1 の範囲である。

【 0 9 4 8 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 6 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 6 : 1 の範囲である。

【 0 9 4 9 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 5 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 5 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 0 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 4 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 4 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 1 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 3 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 3 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 2 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 9 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 9 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 3 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 8 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 8 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 4 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 7 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 7 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 5 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 6 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 6 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 6 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 5 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 5 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 7 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 4 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 4 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 8 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 3 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 3 : 1 の範囲である。

【 0 9 5 9 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖中に外因的に供給される A P C の数の、第 1 の増殖のプライミング中に外因的に供給される A P C の数に対する比率は、1 . 1 : 1 ~ 2 . 2 : 1 または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 . 2 : 1 の範囲である。

【 0 9 6 0 】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $1.1 : 1 \sim 2.1 : 1$ または約 $1.1 : 1 \sim 2.1 : 1$ の範囲である。

【0961】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給するPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $1.1 : 1 \sim 2 : 1$ または約 $1.1 : 1 \sim 2 : 1$ の範囲である。

【0962】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されたAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されたAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 10 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 10 : 1$ の範囲である。 10

【0963】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 5 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 5 : 1$ の範囲である。

【0964】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 4 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 4 : 1$ の範囲である。

【0965】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 3 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 3 : 1$ の範囲である。 20

【0966】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.9 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 2.9 : 1$ の範囲である。

【0967】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.8 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 2.8 : 1$ の範囲である。 30

【0968】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.7 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 2.7 : 1$ の範囲である。

【0969】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.6 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 2.6 : 1$ の範囲である。

【0970】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.5 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 2.5 : 1$ の範囲である。 40

【0971】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.4 : 1$ または約 $2 : 1 \sim 2.4 : 1$ の範囲である。

【0972】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.3 : 1$  40

1または約2 : 1 ~ 約2 . 3 : 1の範囲である。

【0973】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、2 : 1 ~ 2 . 2 : 1または約2 : 1 ~ 約2 . 2 : 1の範囲である。

【0974】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、2 : 1 ~ 2 . 1 : 1または約2 : 1 ~ 約2 . 1 : 1の範囲である。

【0975】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、2 : 1または約2 : 1である。

【0976】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数の、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、1 . 1 : 1、1 . 2 : 1、1 . 3 : 1、1 . 4 : 1、1 . 5 : 1、1 . 6 : 1、1 . 7 : 1、1 . 8 : 1、1 . 9 : 1、2 : 1、2 . 1 : 1、2 . 2 : 1、2 . 3 : 1、2 . 4 : 1、2 . 5 : 1、2 . 6 : 1、2 . 7 : 1、2 . 8 : 1、2 . 9 : 1、3 : 1、3 . 1 : 1、3 . 2 : 1、3 . 3 : 1、3 . 4 : 1、3 . 5 : 1、3 . 6 : 1、3 . 7 : 1、3 . 8 : 1、3 . 9 : 1、4 : 1、4 . 1 : 1、4 . 2 : 1、4 . 3 : 1、4 . 4 : 1、4 . 5 : 1、4 . 6 : 1、4 . 7 : 1、4 . 8 : 1、4 . 9 : 1、または5 : 1であるか、約それらの比である。

【0977】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数は、 $1 \times 10^8$ 、 $1 . 1 \times 10^8$ 、 $1 . 2 \times 10^8$ 、 $1 . 3 \times 10^8$ 、 $1 . 4 \times 10^8$ 、 $1 . 5 \times 10^8$ 、 $1 . 6 \times 10^8$ 、 $1 . 7 \times 10^8$ 、 $1 . 8 \times 10^8$ 、 $1 . 9 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $2 . 1 \times 10^8$ 、 $2 . 2 \times 10^8$ 、 $2 . 3 \times 10^8$ 、 $2 . 4 \times 10^8$ 、 $2 . 5 \times 10^8$ 、 $2 . 6 \times 10^8$ 、 $2 . 7 \times 10^8$ 、 $2 . 8 \times 10^8$ 、 $2 . 9 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $3 . 1 \times 10^8$ 、 $3 . 2 \times 10^8$ 、 $3 . 3 \times 10^8$ 、 $3 . 4 \times 10^8$ または $3 . 5 \times 10^8$  APCであるか、約それらのAPCの数であり、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数は、 $3 . 5 \times 10^8$ 、 $3 . 6 \times 10^8$ 、 $3 . 7 \times 10^8$ 、 $3 . 8 \times 10^8$ 、 $3 . 9 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $4 . 1 \times 10^8$ 、 $4 . 2 \times 10^8$ 、 $4 . 3 \times 10^8$ 、 $4 . 4 \times 10^8$ 、 $4 . 5 \times 10^8$ 、 $4 . 6 \times 10^8$ 、 $4 . 7 \times 10^8$ 、 $4 . 8 \times 10^8$ 、 $4 . 9 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $5 . 1 \times 10^8$ 、 $5 . 2 \times 10^8$ 、 $5 . 3 \times 10^8$ 、 $5 . 4 \times 10^8$ 、 $5 . 5 \times 10^8$ 、 $5 . 6 \times 10^8$ 、 $5 . 7 \times 10^8$ 、 $5 . 8 \times 10^8$ 、 $5 . 9 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $6 . 1 \times 10^8$ 、 $6 . 2 \times 10^8$ 、 $6 . 3 \times 10^8$ 、 $6 . 4 \times 10^8$ 、 $6 . 5 \times 10^8$ 、 $6 . 6 \times 10^8$ 、 $6 . 7 \times 10^8$ 、 $6 . 8 \times 10^8$ 、 $6 . 9 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $7 . 1 \times 10^8$ 、 $7 . 2 \times 10^8$ 、 $7 . 3 \times 10^8$ 、 $7 . 4 \times 10^8$ 、 $7 . 5 \times 10^8$ 、 $7 . 6 \times 10^8$ 、 $7 . 7 \times 10^8$ 、 $7 . 8 \times 10^8$ 、 $7 . 9 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $8 . 1 \times 10^8$ 、 $8 . 2 \times 10^8$ 、 $8 . 3 \times 10^8$ 、 $8 . 4 \times 10^8$ 、 $8 . 5 \times 10^8$ 、 $8 . 6 \times 10^8$ 、 $8 . 7 \times 10^8$ 、 $8 . 8 \times 10^8$ 、 $8 . 9 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $9 . 1 \times 10^8$ 、 $9 . 2 \times 10^8$ 、 $9 . 3 \times 10^8$ 、 $9 . 4 \times 10^8$ 、 $9 . 5 \times 10^8$ 、 $9 . 6 \times 10^8$ 、 $9 . 7 \times 10^8$ 、 $9 . 8 \times 10^8$ 、 $9 . 9 \times 10^8$ または $1 \times 10^9$  APCであるか、約それらのAPCの数である。

【0978】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数は、 $1 . 5 \times 10^8$  APC ~  $3 \times 10^8$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数は、 $4 \times 10^8$  APC ~  $7 . 5 \times 10^8$  APCであるか、または約それらの範囲である。

【0979】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数は、約 $2 \times 10^8$  APCから約 $2.5 \times 10^8$  APCの範囲であり、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数は、約 $4.5 \times 10^8$  APC～約 $5.5 \times 10^8$  APCの範囲である。

【0980】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミング中に外因的に供給されるAPCの数は、 $2.5 \times 10^8$  APCまたは約そのAPCであり、急速な第2の増殖中に外因的に供給されたAPCの数は、 $5 \times 10^8$  APCまたは約そのAPCである。

【0981】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング0日目に添加されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数は、第1の増殖のプライミング7日目（例えば、方法の7日目）に添加されるPBM Cの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、第1の増殖のプライミング0日目に抗原提示細胞を第1のTILの集団に添加すること、及び7日目に抗原提示細胞を第2のTILの集団に添加することを含み、0日目で添加される抗原提示細胞の数は、第1の増殖のプライミング7日目（例えば、方法の7日目）に添加される抗原提示細胞の数のおよそ50%である。

10

【0982】

他の実施形態では、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数は、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるPBM Cの数より多い。

20

【0983】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給されるAPCは、 $1.0 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ ～ $4.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0984】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給されるAPCは、 $1.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ ～ $3.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0985】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給されるAPCは、 $2 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ ～ $3 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

30

【0986】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給されるAPCは、 $2 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約その密度で培養フラスコに播種される。

【0987】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングで外因的に供給されるAPCは、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.1 \times 10^6$ 、 $1.2 \times 10^6$ 、 $1.3 \times 10^6$ 、 $1.4 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $1.6 \times 10^6$ 、 $1.7 \times 10^6$ 、 $1.8 \times 10^6$ 、 $1.9 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2.1 \times 10^6$ 、 $2.2 \times 10^6$ 、 $2.3 \times 10^6$ 、 $2.4 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $2.6 \times 10^6$ 、 $2.7 \times 10^6$ 、 $2.8 \times 10^6$ 、 $2.9 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$ 、 $3.2 \times 10^6$ 、 $3.3 \times 10^6$ 、 $3.4 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $3.7 \times 10^6$ 、 $3.8 \times 10^6$ 、 $3.9 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $4.1 \times 10^6$ 、 $4.2 \times 10^6$ 、 $4.3 \times 10^6$ 、 $4.4 \times 10^6$ もしくは $4.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの密度で培養フラスコに播種される。

40

【0988】

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、 $2.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ ～ $7.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0989】

50

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0990】

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0991】

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約その密度で培養フラスコに播種される。

10

【0992】

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.6 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.7 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.8 \times 10^6$ 、 $2.9 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$ 、 $3.2 \times 10^6$ 、 $3.3 \times 10^6$ 、 $3.4 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $3.7 \times 10^6$ 、 $3.8 \times 10^6$ 、 $3.9 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $4.1 \times 10^6$ 、 $4.2 \times 10^6$ 、 $4.3 \times 10^6$ 、 $4.4 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、 $4.6 \times 10^6$ 、 $4.7 \times 10^6$ 、 $4.8 \times 10^6$ 、 $4.9 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $5.1 \times 10^6$ 、 $5.2 \times 10^6$ 、 $5.3 \times 10^6$ 、 $5.4 \times 10^6$ 、 $5.5 \times 10^6$ 、 $5.6 \times 10^6$ 、 $5.7 \times 10^6$ 、 $5.8 \times 10^6$ 、 $5.9 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $6.1 \times 10^6$ 、 $6.2 \times 10^6$ 、 $6.3 \times 10^6$ 、 $6.4 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^6$ 、 $6.6 \times 10^6$ 、 $6.7 \times 10^6$ 、 $6.8 \times 10^6$ 、 $6.9 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $7.1 \times 10^6$ 、 $7.2 \times 10^6$ 、 $7.3 \times 10^6$ 、 $7.4 \times 10^6$  もしくは  $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの密度で培養フラスコに播種される。

20

【0993】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングで外因的に供給されるAPCは、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.1 \times 10^6$ 、 $1.2 \times 10^6$ 、 $1.3 \times 10^6$ 、 $1.4 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $1.6 \times 10^6$ 、 $1.7 \times 10^6$ 、 $1.8 \times 10^6$ 、 $1.9 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2.1 \times 10^6$ 、 $2.2 \times 10^6$ 、 $2.3 \times 10^6$ 、 $2.4 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $2.6 \times 10^6$ 、 $2.7 \times 10^6$ 、 $2.8 \times 10^6$ 、 $2.9 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$ 、 $3.2 \times 10^6$ 、 $3.3 \times 10^6$ 、 $3.4 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $3.7 \times 10^6$ 、 $3.8 \times 10^6$ 、 $3.9 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $4.1 \times 10^6$ 、 $4.2 \times 10^6$ 、 $4.3 \times 10^6$ 、 $4.4 \times 10^6$  もしくは  $4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.6 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.7 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.8 \times 10^6$ 、 $2.9 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $3.1 \times 10^6$ 、 $3.2 \times 10^6$ 、 $3.3 \times 10^6$ 、 $3.4 \times 10^6$ 、 $3.5 \times 10^6$ 、 $3.6 \times 10^6$ 、 $3.7 \times 10^6$ 、 $3.8 \times 10^6$ 、 $3.9 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $4.1 \times 10^6$ 、 $4.2 \times 10^6$ 、 $4.3 \times 10^6$ 、 $4.4 \times 10^6$ 、 $4.5 \times 10^6$ 、 $4.6 \times 10^6$ 、 $4.7 \times 10^6$ 、 $4.8 \times 10^6$ 、 $4.9 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $5.1 \times 10^6$ 、 $5.2 \times 10^6$ 、 $5.3 \times 10^6$ 、 $5.4 \times 10^6$ 、 $5.5 \times 10^6$ 、 $5.6 \times 10^6$ 、 $5.7 \times 10^6$ 、 $5.8 \times 10^6$ 、 $5.9 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $6.1 \times 10^6$ 、 $6.2 \times 10^6$ 、 $6.3 \times 10^6$ 、 $6.4 \times 10^6$ 、 $6.5 \times 10^6$ 、 $6.6 \times 10^6$ 、 $6.7 \times 10^6$ 、 $6.8 \times 10^6$ 、 $6.9 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $7.1 \times 10^6$ 、 $7.2 \times 10^6$ 、 $7.3 \times 10^6$ 、 $7.4 \times 10^6$  もしくは  $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または、約それらの密度で培養フラスコに播種される。

30

40

【0994】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給されるAPCは、 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPC

50

は、約  $2.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~  $7.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0995】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給される APC は、 $1.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~  $3.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の増殖において外因的に供給される APC は、約  $3.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~  $6 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

【0996】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給される APC は、 $2 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~  $3 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の増殖において外因的に供給される APC は、約  $4 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~  $5.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で培養フラスコに播種される。

10

【0997】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミングにおいて外因的に供給される APC は、 $2 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約その密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の増殖において外因的に供給される APC は、約  $4 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ 、または約その密度で培養フラスコに播種される。

【0998】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される P BMC の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $20 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

20

【0999】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される P BMC の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $10 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1000】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される P BMC の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $9 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

30

【1001】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $8 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1002】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $7 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

40

【1003】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $6 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1004】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、 $1.1 : 1$  ~  $5 : 1$ 、または、約そ

50

これらの範囲である。

【1005】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~4:1、または、約これらの範囲である。

【1006】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~3:1、または、約これらの範囲である。

10

【1007】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.9:1、または、約これらの範囲である。

【1008】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.8:1、または、

20

【1009】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.7:1、または、約これらの範囲である。

【1010】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.6:1、または、

30

【1011】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.5:1、または、約これらの範囲である。

【1012】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.4:1、または、

40

【1013】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.3:1、または、約これらの範囲である。

【1014】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1:1~2.2:1、または、

50

約それらの範囲である。

【1015】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $1.1 : 1 \sim 2.1 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1016】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $1.1 : 1 \sim 2 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

10

【1017】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 10 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1018】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 5 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

20

【1019】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 4 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1020】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 3 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

30

【1021】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.9 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1022】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.8 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

40

【1023】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.7 : 1$ 、または、約それらの範囲である。

【1024】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、 $2 : 1 \sim 2.6 : 1$ 、または、約そ

50

これらの範囲である。

【1025】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、2：1～2.5：1、または、約これらの範囲である。

【1026】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、2：1～2.4：1、または、約これらの範囲である。

10

【1027】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、2：1～2.3：1、または、約これらの範囲である。

【1028】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、2：1～2.2：1、または、約これらの範囲である。

20

【1029】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、2：1～2.1：1、または、約これらの範囲である。

【1030】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、2：1または、約2：1である。

30

【1031】

他の実施形態において、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数の、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数に対する比率は、1.1：1、1.2：1、1.3：1、1.4：1、1.5：1、1.6：1、1.7：1、1.8：1、1.9：1、2：1、2.1：1、2.2：1、2.3：1、2.4：1、2.5：1、2.6：1、2.7：1、2.8：1、2.9：1、3：1、3.1：1、3.2：1、3.3：1、3.4：1、3.5：1、3.6：1、3.7：1、3.8：1、3.9：1、4：1、4.1：1、4.2：1、4.3：1、4.4：1、4.5：1、4.6：1、4.7：1、4.8：1、4.9：1、または5：1であるか、約これらの比である。

40

【1032】

他の実施形態では、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、 $1 \times 10^8$ 、 $1.1 \times 10^8$ 、 $1.2 \times 10^8$ 、 $1.3 \times 10^8$ 、 $1.4 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^8$ 、 $1.6 \times 10^8$ 、 $1.7 \times 10^8$ 、 $1.8 \times 10^8$ 、 $1.9 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $2.2 \times 10^8$ 、 $2.3 \times 10^8$ 、 $2.4 \times 10^8$ 、 $2.5 \times 10^8$ 、 $2.6 \times 10^8$ 、 $2.7 \times 10^8$ 、 $2.8 \times 10^8$ 、 $2.9 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $3.1 \times 10^8$ 、 $3.2 \times 10^8$ 、 $3.3 \times 10^8$ 、 $3.4 \times 10^8$ または $3.5 \times 10^8$  APCであるか、約これらのAPCの数であり、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、 $3.5 \times 10^8$ 、 $3.6 \times 10^8$ 、 $3.7 \times 10^8$ 、 $3.8 \times 10^8$ 、 $3.9 \times 10^8$

50

、 $4 \times 10^8$ 、 $4.1 \times 10^8$ 、 $4.2 \times 10^8$ 、 $4.3 \times 10^8$ 、 $4.4 \times 10^8$ 、 $4.5 \times 10^8$ 、 $4.6 \times 10^8$ 、 $4.7 \times 10^8$ 、 $4.8 \times 10^8$ 、 $4.9 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $5.1 \times 10^8$ 、 $5.2 \times 10^8$ 、 $5.3 \times 10^8$ 、 $5.4 \times 10^8$ 、 $5.5 \times 10^8$ 、 $5.6 \times 10^8$ 、 $5.7 \times 10^8$ 、 $5.8 \times 10^8$ 、 $5.9 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $6.1 \times 10^8$ 、 $6.2 \times 10^8$ 、 $6.3 \times 10^8$ 、 $6.4 \times 10^8$ 、 $6.5 \times 10^8$ 、 $6.6 \times 10^8$ 、 $6.7 \times 10^8$ 、 $6.8 \times 10^8$ 、 $6.9 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $7.1 \times 10^8$ 、 $7.2 \times 10^8$ 、 $7.3 \times 10^8$ 、 $7.4 \times 10^8$ 、 $7.5 \times 10^8$ 、 $7.6 \times 10^8$ 、 $7.7 \times 10^8$ 、 $7.8 \times 10^8$ 、 $7.9 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $8.1 \times 10^8$ 、 $8.2 \times 10^8$ 、 $8.3 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^8$ 、 $8.5 \times 10^8$ 、 $8.6 \times 10^8$ 、 $8.7 \times 10^8$ 、 $8.8 \times 10^8$ 、 $8.9 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $9.1 \times 10^8$ 、 $9.2 \times 10^8$ 、 $9.3 \times 10^8$ 、 $9.4 \times 10^8$ 、 $9.5 \times 10^8$ 、 $9.6 \times 10^8$ 、 $9.7 \times 10^8$ 、 $9.8 \times 10^8$ 、 $9.9 \times 10^8$ または $1 \times 10^9$  APC (例えば、P BMCを含む)であるか、約それらのAPC (例えば、P BMCを含む)の数である。

### 【1033】

他の実施形態では、第1増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $1 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む) ~  $3.5 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む)、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖の7日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $3.5 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む) ~  $1 \times 10^9$  APC (例えば、P BMCを含む)、または約それらの範囲である。

### 【1034】

他の実施形態では、第1増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $1.5 \times 10^8$  APC ~  $3 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む)、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖の7日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $4 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む) ~  $7.5 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む)、または約それらの範囲である。

### 【1035】

他の実施形態では、第1増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $2 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む) ~  $2.5 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む)、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖の7日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $4.5 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む) ~  $5.5 \times 10^8$  APC (例えば、P BMCを含む)、または約それらの範囲である。

### 【1036】

他の実施形態では、第1増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $2.5 \times 10^8$  APC、または約その数のAPC (例えば、P BMCを含む)であり、急速な第2の増殖の7日目に外因的に供給されるAPC (例えば、P BMCを含む)の数は、 $5 \times 10^8$  APC、または約その数のAPC (例えば、P BMCを含む)である。

### 【1037】

いくつかの実施形態では、第1増殖のプライミング0日目に添加されるAPC (例えば、P BMCを含む)の層の数は、急速な第2の増殖7日目に添加されるAPC (例えば、P BMCを含む)の層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、第1の増殖のプライミング0日目に抗原提示細胞層を第1のTILの集団に添加すること、及び7日目に抗原提示細胞層を第2のTILの集団に添加することを含み、0日目に添加される抗原提示細胞層の数は、7日目に添加される抗原提示細胞層の数のおよそ50%である。

### 【1038】

他の実施形態では、急速な第2の増殖7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数は、第1の増殖のプライミング0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数より多い。

【1039】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層2層または約2層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2増殖の7日目は、細胞層4層または約4層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1040】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層1層または約1層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層3層または約3層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1041】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層1.5層または約2.5層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層3層または約3層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1042】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層1層または約1層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層3層または約2層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1043】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9もしくは3層、または約その層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9もしくは8層、または約その層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1044】

他の実施形態において、第1増殖のプライミング0日目は、細胞層1層～2層または約1層～2層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層3層～10層または約3層～10層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1045】

他の実施形態において、第1増殖のプライミング0日目は、細胞層2層～3層または約2層～3層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層4層～8層または約4層～8層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

【1046】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層2層または約2層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層4層～8層または約4層～8層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生する。

10

20

30

40

50

## 【1047】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、細胞層1、2もしくは3層、または、約1、2もしくは3層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、細胞層3、4、5、6、7、8、9もしくは10層または約3、4、5、6、7、8、9もしくは10層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生する。

## 【1048】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数に対する比率は、1：1.1～1：10または約1：1.1～1：10の範囲にある。

10

## 【1049】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数に対する比率は、1：1.1～1：8または約1：1.1～1：8の範囲にある。

20

## 【1050】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数に対する比率は、1：1.1～1：7または約1：1.1～1：7の範囲にある。

30

## 【1051】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数に対する比率は、1：1.1～1：6または約1：1.1～1：6の範囲にある。

## 【1052】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層数に対する比率は、1：1.1～1：5または約1：1.1～1：5の範囲にある。

40

## 【1053】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の

50

第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数に対する比率は、1:1.1~1:4または約1:1.1~1:4の範囲にある。

【1054】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMC

10

【1055】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMC

20

【1056】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMC

【1057】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMC

30

【1058】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMC

40

【1059】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC（例えば、PBMCを含む）の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で発生し、APC（例えば、PBMCを含む）の第1の層数の、APC（例えば、PBMC

50

を含む)の第2の層数に対する比率は、1:1.5~1:5または約1:1.5~1:5の範囲にある。

【1060】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数の、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数に対する比率は、1:1.6~1:4または約1:1.6~1:4の範囲にある。

10

【1061】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数の、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数に対する比率は、1:1.7~1:3.5または約1:1.7~1:3.5の範囲にある。

【1062】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数の、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数に対する比率は、1:1.8~1:3または約1:1.8~1:3の範囲にある。

20

【1063】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数の、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数に対する比率は、1:1.9~1:2.5または約1:1.9~1:2.5の範囲にある。

30

【1064】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数の、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数に対する比率は、1:2または約1:2である。

40

【1065】

他の実施形態において、第1の増殖のプライミング0日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、急速な第2の増殖7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数と等しい平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で発生し、APC(例えば、PBM Cを含む)の第1の層数の、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層数に対する比率は、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:

50

2 . 8、1 : 2 . 9、1 : 3、1 : 3 . 1、1 : 3 . 2、1 : 3 . 3、1 : 3 . 4、1 : 3 . 5、1 : 3 . 6、1 : 3 . 7、1 : 3 . 8、1 : 3 . 9、1 : 4、1 : 4 . 1、1 : 4 . 2、1 : 4 . 3、1 : 4 . 4、1 : 4 . 5、1 : 4 . 6、1 : 4 . 7、1 : 4 . 8、1 : 4 . 9、1 : 5、1 : 5 . 1、1 : 5 . 2、1 : 5 . 3、1 : 5 . 4、1 : 5 . 5、1 : 5 . 6、1 : 5 . 7、1 : 5 . 8、1 : 5 . 9、1 : 6、1 : 6 . 1、1 : 6 . 2、1 : 6 . 3、1 : 6 . 4、1 : 6 . 5、1 : 6 . 6、1 : 6 . 7、1 : 6 . 8、1 : 6 . 9、1 : 7、1 : 7 . 1、1 : 7 . 2、1 : 7 . 3、1 : 7 . 4、1 : 7 . 5、1 : 7 . 6、1 : 7 . 7、1 : 7 . 8、1 : 7 . 9、1 : 8、1 : 8 . 1、1 : 8 . 2、1 : 8 . 3、1 : 8 . 4、1 : 8 . 5、1 : 8 . 6、1 : 8 . 7、1 : 8 . 8、1 : 8 . 9、1 : 9、1 : 9 . 1、1 : 9 . 2、1 : 9 . 3、1 : 9 . 4、1 : 9 . 5、1 : 9 . 6、1 : 9 . 7、1 : 9 . 8、1 : 9 . 9もしくは1 : 10であるか、または約それらの比率である。

【1066】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $1.0 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~ 約 $4.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ の範囲であり、急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $2.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~ 約 $7.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ の範囲である。

【1067】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $1.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~ 約 $3.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ の範囲であり、急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $3.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~ 約 $6.0 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ の範囲である。

【1068】

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミングにおけるAPCの数は、約 $2.0 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~ 約 $3.0 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ の範囲であり、急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $4.0 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$  ~ 約 $5.5 \times 10^6$  APC /  $\text{cm}^2$ の範囲である。

【1069】

H. 任意の細胞培地コンポーネント

1. 抗CD3抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の増殖方法で使用される培養培地（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）を参照）は、抗CD3抗体を含む。IL-2と組み合わせた抗CD3抗体は、TIL集団のT細胞の活性化と細胞分裂を誘導する。この効果は、完全長の抗体だけでなく、Fab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントでも見られるが、一般的には前者が好まれる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Tsoukaset al., J. Immunol. 1985, 135, 1719を参照されたい。

【1070】

当業者に理解されるように、本発明で使用される適切な抗ヒトCD3抗体がいくつかあり、これには、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及び犬の抗体を含む、様々な哺乳類由来の抗ヒトCD3ポリクローナル抗体及び抗ヒトCD3モノクローナル抗体が含まれる。特定の実施形態では、OKT3抗CD3抗体が使用される（Ortho-McNeil, Raritan, NJ or Miltenyi Biotech, Auburn, CAから市販されている）。表1を参照されたい。

【1071】

2. 4-1BB (CD137) アゴニスト

いくつかの実施形態では、第1の増殖のプライミング及び/または急速な第2の増殖の細胞培養培地はTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BB (CD137) アゴニストである。4-1BBアゴニストは、当技術分野で周知の任意の4-1BB結合分子であり得る。4-1BB結合分子は、ヒトま

たは哺乳動物の4-1BBに結合できるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、または免疫グロブリン分子のサブクラスの免疫グロブリン重鎖を含み得る。4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される結合分子という用語には、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生される断片、上記のいずれかのエピトープ結合断片、及び操作された形態の抗体、例えば、4-1BBに結合するscFv分子も含まれる。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本開示の方法及び組成物での使用のための4-1BBアゴニストには、抗4-1BB抗体、ヒト抗4-1BB抗体、マウス抗4-1BB抗体、哺乳動物抗4-1BB抗体、モノクローナル抗4-1BB抗体、ポリクローナル抗4-1BB抗体、キメラ抗4-1BB抗体、抗4-1BBアドネクチン、抗4-1BBドメイン抗体、単鎖抗4-1BB断片、重鎖抗4-1BB断片、軽鎖抗4-1BB断片、抗4-1BB融合タンパク質、及びその断片、誘導體、コンジュゲート、バリエーション、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗4-1BB抗体は、強力な免疫応答を誘発することが知られている。Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、アゴニスト、抗4-1BBヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一細胞株由来の抗体）である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、EU-101 (Eutilex Co. Ltd.)、ウトミルバム、またはウレルマブ、またはその断片、誘導體、コンジュゲート、変異体、またはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルバムもしくはウレルマブ、またはその断片、誘導體、コンジュゲート、変異体、もしくはバイオシミラーである。

#### 【1072】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、融合タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、三量体または六量体4-1BBアゴニスト（3つまたは6つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体4-1BBアゴニストは、2つのリガンド結合ドメインを持つアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（4-1BBL）クラスタリング及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。3つのTNFRSF結合ドメイン及びIgG1-Fcを含み、任意にこれらの融合タンパク質のうち2つ以上をさらに連結する、三量体（三価）または六量体（または六価）以上の融合タンパク質が、例えば、Gieffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載されている。

#### 【1073】

アゴニスト4-1BB抗体及び融合タンパク質は、強力な免疫応答を誘発することが知られている。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で4-1BB抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、抗体依存性細胞毒性（ADCC）、例えばNK細胞の細胞毒性を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、抗体依存性細胞食作用（ADCP）を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、補体依存性細胞傷害（CDC）を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、Fc領域の機能性

を抑止するアゴニスト 4 - 1 B B モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【 1 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、ヒト 4 - 1 B B (配列番号 9 ) に高い親和性とアゴニスト活性で結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、ヒト 4 - 1 B B (配列番号 9 ) に結合する、結合分子である。いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、マウス 4 - 1 B B (配列番号 1 0 ) に結合する、結合分子である。4 - 1 B B アゴニストまたは結合分子が結合する 4 - 1 B B 抗原のアミノ酸配列を表 6 に要約する。

【表 6】

表 6 : 4 - 1 B B 抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 9 ヒト 4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9 (ホモサピエンス)	MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDDN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60
	TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120
	CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180
	PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240
	CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号 10 マウス 4-1BB、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー9 (ハツカネズミ)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60
	CNICRV CAGY FRFKKFCSS HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120
	LGTENDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSPSPST ISVTPEGGPG 180
	GHSLQVLTFL LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKKPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240
	CRCPQEEEGG GGGYEL 256

10

20

30

【 1 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、約 1 0 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、約 9 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、約 8 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、約 7 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、約 6 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、約 5 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、約 4 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合、または、約 3 0 p M 以下の  $K_D$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B と結合する、4 - 1 B B アゴニストを含む。

【 1 0 7 6 】

いくつかの実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約  $7.5 \times 10^5$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約  $7.5 \times 10^5$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約  $8 \times 10^5$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約  $8.5 \times 10^5$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約  $9 \times 10^5$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約  $9.5 \times 10^5$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、または約  $1 \times 10^6$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合する、4 - 1 B B アゴニストを含む。

40

【 1 0 7 7 】

いくつかの実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約  $2 \times 10^6$   $1 / M \cdot s$  より速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合する、4 - 1 B B アゴニストを含む。

50

<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 1 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 2 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 3 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 4 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 5 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 6 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 7 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 8 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 . 9 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、または約 3 × 1 0 <sup>-</sup>  
<sup>5</sup> 1 / s より遅い k d i s s o c でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合する、4 - 1 B B  
 アゴニストを含む。

【 1 0 7 8 】

いくつかの実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約 1 0 n M 以下  
 の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 9 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまた  
 はマウス 4 - 1 B B に結合、約 8 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結  
 合、約 7 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 6 n M 以下の I C  
<sub>50</sub> でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 5 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス  
 4 - 1 B B に結合、約 4 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 3  
 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス 4 - 1 B B に結合、約 2 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒ  
 トまたはマウス 4 - 1 B B に結合、または、約 1 n M 以下の I C <sub>50</sub> でヒトまたはマウス  
 4 - 1 B B に結合する、4 - 1 B B アゴニストを含む。

【 1 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 または M  
 O R - 7 4 8 0 としても知られるウトミルバム、またはその断片、誘導體、バリエーション、  
 もしくはバイオシミラーである。ウトミルバムは P f i z e r , I n c . から入手できる  
 。ウトミルバムは、免疫グロブリン G 2 - ラムダ、抗 [ ホモサピエンス T N F R S F 9 腫  
 瘍壊死因子受容体 ( T N F R ) スーパーファミリーメンバー 9、4 - 1 B B、T 細胞抗原  
 I L A、C D 1 3 7 ) ]、ホモサピエンス ( 完全ヒト ) モノクローナル抗体である。ウト  
 ミルバムのアミノ酸配列を表 7 に示す。ウトミルバムは、A s n 5 9 及び A s n 2 9 2 に  
 グリコシル化部位 ; 位置 2 2 ~ 9 6 ( V <sub>H</sub> - V <sub>L</sub> )、1 4 3 ~ 1 9 9 ( C <sub>H</sub> 1 - C <sub>L</sub> )、  
 2 5 6 ~ 3 1 6 ( C <sub>H</sub> 2 ) 及び 3 6 2 ~ 4 2 0 ( C <sub>H</sub> 3 ) での重鎖鎖内ジスルフィド架橋  
 ; 位置 2 2 ' ~ 8 7 ' ( H <sub>V</sub> - V <sub>L</sub> ) 及び 1 3 6 ' ~ 1 9 5 ' ( H <sub>C</sub> 1 - C <sub>L</sub> ) での軽鎖鎖内  
 ジスルフィド架橋 ; I g G 2 A アイソフォーム位置 2 1 8 ~ 2 1 8、2 1 9 ~ 2 1 9、2  
 2 2 ~ 2 2 2、及び 2 2 5 ~ 2 2 5、I g G 2 A / B アイソフォーム位置 2 1 8 ~ 1 3 0  
 、2 1 9 ~ 2 1 9、2 2 2 ~ 2 2 2、及び 2 2 5 ~ 2 2 5、ならびに、I g G 2 B アイソ  
 フォーム位置 2 1 9 ~ 1 3 0 ( 2 )、2 2 2 ~ 2 2 2、及び 2 2 5 ~ 2 2 5 での鎖間重鎖  
 - 重鎖ジスルフィド架橋 ; 及び、I g G 2 A アイソフォーム位置 1 3 0 ~ 2 1 3 ' ( 2 )  
 、I g G 2 A / B アイソフォーム位置 2 1 8 ~ 2 1 3 ' 及び 1 3 0 ~ 2 1 3 '、ならびに I  
 g G 2 B アイソフォーム位置 2 1 8 ~ 2 1 3 ' ( 2 ) での鎖間重鎖 - 軽鎖ジスルフィド架  
 橋を含む。ウトミルバムならびにそのバリエーション及び断片の調製及び特性は、米国特許第  
 8 , 8 2 1 , 8 6 7 号同第 8 , 3 3 7 , 8 5 0 号、及び同第 9 , 4 6 8 , 6 7 8 号、なら  
 びに、国際特許出願公開第 W O 2 0 1 2 / 0 3 2 4 3 3 A 1 号に記載されており、それぞ  
 れの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウトミルバムの前臨床特性は、F i s h  
 e r , e t a l . , C a n c e r I m m u n o l o g . & I m m u n o t h e r . 2  
 0 1 2 , 6 1 , 1 7 2 1 - 3 3 に記載されている。さまざまな血液腫瘍及び固形腫瘍の適  
 応症におけるウトミルバムの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所の臨床試験政府識  
 別子 N C T 0 2 4 4 4 7 9 3、N C T 0 1 3 0 7 2 6 7、N C T 0 2 3 1 5 0 6 6、及び  
 N C T 0 2 5 5 4 8 1 2 が含まれる。

【 1 0 8 0 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11によって与えられる重鎖及び配列番号12によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11及び配列番号12にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片(s c F v)、バリアント、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11及び配列番号12にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11及び配列番号12にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11及び配列番号12にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11及び配列番号12にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号11及び配列番号12にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

#### 【1081】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルバムの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号13に示される配列を含み、4-1BBアゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号14に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号13及び配列番号14にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号13及び配列番号14にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号13及び配列番号14にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号13及び配列番号14にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号13及び配列番号14にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号13及び配列番号14にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む、s c F v抗体を含む。

20

30

#### 【1082】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号15、配列番号16、及び配列番号17にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号18、配列番号19、及び配列番号20にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。

#### 【1083】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルバムに関して医薬品規制当局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、4-1BB抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はウトミルバムである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された4-1BBアゴニスト抗体であり、4-

40

50

1 B B アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はウトミルバムである。4 - 1 B B アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び / または欧州連合の E M A などの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はウトミルバムである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はウトミルバムである。

10

20

30

40

50

## 【表 7】

表7. ウトミルバムに関連する4-1BBアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 11 ウトミルバムの 重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN 60 SPSFQGGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVTVPS NFGTQTYTCN VDHPKSNSTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNNH YTKQSLSLSP G 441	10
配列番号 12 ウトミルバムの 軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVLG PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAV KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214	
配列番号 13 ウトミルバムの 重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118	
配列番号 14 ウトミルバムの 軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTKLTVL 108	
配列番号 15 ウトミルバムの 重鎖 CDR1	STYWIS 6	20
配列番号 16 ウトミルバムの 重鎖 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17	
配列番号 17 ウトミルバムの 重鎖 CDR3	RGYGIFDY 8	
配列番号 18 ウトミルバムの 軽鎖 CDR1	SGDNIGDQYA H 11	30
配列番号 19 ウトミルバムの 軽鎖 CDR2	QDKNRPS 7	
配列番号 20 ウトミルバムの 軽鎖 CDR3	ATYTGFGSLA V 11	40

## 【1084】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、BMS-663513及び20H4.9.h4aとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはその断片、誘導体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Bristol-Myers Squibb, Inc. 及び Creative Biolabs, Inc. から入手可能である。ウレルマブは免疫グロブリンG4-kappa、抗[ホモサピエンスTNFRSF9 (腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9、4-1BB、T細胞抗原ILA、CD137)]、ホモサピエンス(完全ヒト)モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表8に示す。ウレルマブは、位置298(及び298')に 50

N - グリコシル化部位、位置 22 ~ 95 (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>)、148 ~ 204 (C<sub>H</sub>1 - C<sub>L</sub>)、262 ~ 322 (C<sub>H</sub>2) 及び 368 ~ 426 (C<sub>H</sub>3) (及び位置 22' ~ 95'、148' ~ 204'、262' ~ 322'、及び 368' ~ 426') に重鎖鎖内ジスルフィド架橋；位置 23' ~ 88' (H<sub>V</sub> - V<sub>L</sub>) 及び 136' ~ 196' (C<sub>H</sub>1 - C<sub>L</sub>) (及び位置 23''' ~ 88''' 及び 136''' ~ 196''') に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋；227 ~ 227' 及び 230 ~ 230' に鎖間重鎖 - 重鎖ジスルフィド架橋；135 ~ 216' 及び 135' ~ 216' に鎖間重鎖 - 軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレマブならびにその変異体及び断片の調製及び特性は、米国特許第 7,288,638 号及び同第 8,962,804 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレマブの前臨床的及び臨床的特徴は、Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016 に記載されており、<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272> から入手可能である。さまざまな血液腫瘍及び固形腫瘍の適応症におけるウレマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所の臨床試験政府識別子 NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992、及び NCT01471210 が含まれる。

#### 【1085】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 によって与えられる重鎖及び配列番号 22 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 及び配列番号 22 にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、単鎖可変断片 (scFv)、バリアント、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 及び配列番号 22 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 及び配列番号 22 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 及び配列番号 22 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 及び配列番号 22 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 及び配列番号 22 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

#### 【1086】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、ウレマブの重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニスト重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) は、配列番号 23 に示される配列を含み、4-1BB アゴニスト軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) は、配列番号 24 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 23 及び配列番号 24 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 23 及び配列番号 24 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 23 及び配列番号 24 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 23 及び配列番号 24 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 23 及び配列番号 24 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 23 及び配列番号 24 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む、scFv 抗体を含む。

#### 【1087】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、配列番号 2 5、配列番号 2 6、及び配列番号 2 7 にそれぞれ示される配列、及びその保守的アミノ酸置換を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、ならびに、配列番号 2 8、配列番号 2 9、及び配列番号 3 0 にそれぞれ示される配列、及びその保守的アミノ酸置換を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメインを含む。

【 1 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、ウレルマブに関して医薬品規制当局によって承認された 4 - 1 B B アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、4 - 1 B B 抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して 1 つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はウレルマブである。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された 4 - 1 B B アゴニスト抗体であり、4 - 1 B B アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はウレルマブである。4 - 1 B B アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び / または欧州連合の E M A などの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はウレルマブである。

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 8. ウレルマブに関連する 4-1BB アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 21 ウレルマブの重鎖	QVQLQQWAG LLKPSETLSL TCAVYGGGFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVITYN 60 PSLESRVTIIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWFYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGK TYTCNVDHKP SNTKVDKRV SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPPEV TCVVVDVDSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGLK 448
配列番号 22 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVEFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLST 180 LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
配列番号 23 ウレルマブの可変重鎖	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWAGL LKPSETLSLT CAVYGGGFSG YYWSWIRQSP 60 ERGLEWIGEI NHGGYVITYN SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
配列番号 24 ウレルマブの可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDPTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
配列番号 25 ウレルマブの重鎖 CDR1	GYYS 5
配列番号 26 ウレルマブの重鎖 CDR2	EINHGGYVITY NPSLES 16
配列番号 27 ウレルマブの重鎖 CDR3	DYGPNGYDWY FDL 13
配列番号 28 ウレルマブの軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 29 ウレルマブの軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 30 ウレルマブの軽鎖 CDR3	QQRSDWPPAL T 11

10

20

30

40

## 【1089】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、1D8、3E1or、4B4 (BioLegend 309809)、H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532)、BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX)、145501 (Leinco Technologies B591)、ATCC 番号 HB-11248 として寄託され、米国特許第 6,974,863 号に開示された細胞株によって産生される抗体、5F4 (BioLegend 311503)、C65-485 (BD Pharmingen 559446)、米国特許出願公開第 US2005/0095244 に開示された抗体、米国特許第 7,288,638 号に開示された抗体 (2

50

0 H 4 . 9 - I g G 1 ( B M S - 6 6 3 0 3 1 ) など)、米国特許第 6 , 8 8 7 , 6 7 3 号に開示された抗体 ( 4 E 9 または B M S - 5 5 4 2 7 1 など)、米国特許第 7 , 2 1 4 , 4 9 3 号に開示された抗体、米国特許第 6 , 3 0 3 , 1 2 1 号に開示された抗体、米国特許第 6 , 5 6 9 , 9 9 7 号に開示された抗体、米国特許第 6 , 9 0 5 , 6 8 5 号に開示された抗体 ( 4 E 9 または B M S - 5 5 4 2 7 1 など)、米国特許第 6 , 3 6 2 , 3 2 5 号に開示された抗体 ( 1 D 8 または B M S - 4 6 9 4 9 2 、 3 H 3 または B M S - 4 6 9 4 9 7 、 または 3 E 1 など)、米国特許第 6 , 9 7 4 , 8 6 3 号に開示された抗体 ( 5 3 A 2 など) ; 米国特許第 6 , 2 1 0 , 6 6 9 号に開示された抗体 ( 1 D 8 、 3 B 8 、 または 3 E 1 など)、米国特許第 5 , 9 2 8 , 8 9 3 号に開示された抗体、米国特許第 6 , 3 0 3 , 1 2 1 号に開示された抗体、米国特許第 6 , 5 6 9 , 9 9 7 号に開示された抗体、国際特許出願公開第 W O 2 0 1 2 / 1 7 7 7 8 8 、 W O 2 0 1 5 / 1 1 9 9 2 3 及び W O 2 0 1 0 / 0 4 2 4 3 3 に開示された抗体、及びそれらの断片、誘導體、コンジュゲート、バリエーションまたはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開のそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【 1 0 9 0 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、国際特許出願公開第 W O 2 0 0 8 / 0 2 5 5 1 6 A 1 号、同第 W O 2 0 0 9 / 0 0 7 1 2 0 A 1 号、同第 W O 2 0 1 0 / 0 0 3 7 6 6 A 1 号、同第 W O 2 0 1 0 / 0 1 0 0 5 1 A 1 号、及び同第 W O 2 0 1 0 / 0 7 8 9 6 6 A 1 号 ; 米国特許出願公開第 U S 2 0 1 1 / 0 0 2 7 2 1 8 A 1 号、同第 U S 2 0 1 5 / 0 1 2 6 7 0 9 A 1 号、同第 U S 2 0 1 1 / 0 1 1 1 4 9 4 A 1 号、同第 U S 2 0 1 5 / 0 1 1 0 7 3 4 A 1 号、及び同第 U S 2 0 1 5 / 0 1 2 6 7 1 0 A 1 号 ; ならびに米国特許第 9 , 3 5 9 , 4 2 0 号、同第 9 , 3 4 0 , 5 9 9 号、同第 8 , 9 2 1 , 5 1 9 号、及び同第 8 , 4 5 0 , 4 6 0 号に記載されている 4 - 1 B B アゴニスト融合タンパク質であり、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

#### 【 1 0 9 1 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、図 1 7 に提供される、構造 I - A ( C 末端 F c - 抗体フラグメント融合タンパク質 ) または構造 I - B ( N 末端 F c - 抗体フラグメント融合タンパク質 ) に示されるような 4 - 1 B B アゴニスト融合タンパク質、またはその断片、誘導體、コンジュゲート、バリエーション、またはバイオシミラーである。

30

#### 【 1 0 9 2 】

構造 I - A 及び I - B ( 図 1 7 参照 ) において、円柱は個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造 I - A 及び I - B は、例えば、4 - 1 B B L ( 4 - 1 B B リガンド、C D 1 3 7 リガンド ( C D 1 3 7 L ) 、 もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 9 ( T N F S F 9 ) ) または 4 - 1 B B に結合する抗体に由来する 3 つの直線的に連結された T N F R S F 結合ドメインを含み、これらは折り畳まれて三価タンパク質を形成し、次いで I g G 1 - F c を介して第 2 の三価タンパク質に連結され ( C <sub>H</sub> 3 及び C <sub>H</sub> 2 ドメインを含む ) 、次いで、ジスルフィド結合 ( 小さな細長い楕円形 ) を介して 3 価のタンパク質の 2 つを連結し、構造を安定化し、6 つの受容体の細胞内シグナル伝達ドメインとシグナル伝達タンパク質と一緒にシグナル複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円柱として示される T N F R S F 結合ドメインは、例えば親水性残基及び柔軟性のための G l y 及び S e r 配列、ならびに溶解性のための G l u 及び L y s を含み得るリンカーによって連結された V <sub>H</sub> 及び V <sub>L</sub> 鎖を含む s c F v ドメインであり得る。de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44、Ahmad, et al., Clin. & Dev. Immunol. 2012, 980250、Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193 - 208、または、本明細書の他の場所に組み込まれる参考文献に記載されているものなど、任意の s c F v ドメインを使用することができる。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第 9 , 3 5 9 , 4 2 0 号、同第 9 , 3 4 0 , 5 9 9 号、同第 8 , 9 2 1 , 5 1 9 号、及び同第 8 , 4 5 0 , 4 6 0 号に記載されており、これらの開示は参照により本明

40

50

細書に組み込まれる。

【 1 0 9 3 】

構造 I - A の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表 9 に示す。Fc ドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号 3 1 のアミノ酸 1 7 ~ 2 3 0）、完全なヒンジドメイン（配列番号 3 1 のアミノ酸 1 ~ 1 6）またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号 3 1 のアミノ酸 4 ~ 1 6）を含む。C 末端 Fc 抗体を接続するための好ましいリンカーは、配列番号 3 2 ~ 配列番号 4 1 で示される実施形態から選択され得、追加のポリペプチドの融合に適したリンカーを含む。

【 表 9 】

表 9 : C 末端 Fc - 抗体フラグメント融合タンパク質設計による、4 - 1 B B アゴニスト融合タンパク質を含む TNFRSF アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列（構造 I - A）。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号 31 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLGQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLT LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSGDGFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号 32 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号 33 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号 34 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PCPAPE	27
配列番号 35 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PCPAPE	27
配列番号 36 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPCPAPE	29
配列番号 37 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPCPAPE	29
配列番号 38 リンカー	GGPGSSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号 39 リンカー	GGPGSSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号 40 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPA PE	21
配列番号 41 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

10

20

30

【 1 0 9 4 】

構造 I - B の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表 1 0 に示す。Fc 抗体フラグメントが構造 I - B のように TNRF S F アゴニスト融合タンパク質の N 末端に融合される場合、Fc モジュールの配列は好ましくは配列番号 4 2 に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号 4 3 ~ 配列番号 4 5 に示される実施形態から選択される。

40

50

【表 10】

表 10：N末端Fc-抗体フラグメント融合タンパク質設計による、4-1BBアゴニスト融合タンパク質を含むTNFRSFアゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列（構造I-B）。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）
配列番号 42 Fc ドメイン	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYV LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
配列番号 43 リンカー	SGSGSGSGSG S 11
配列番号 44 リンカー	SSSSSSGSGS GS 12
配列番号 45 リンカー	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

10

【1095】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表11に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにその断片、誘導体、コンジュゲート、バリエーション、及びバイオシミラーからなる群から選択される1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含む。

20

【1096】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、4-1BB L配列を含む1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、配列番号46による配列を含む1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、水溶性4-1BB L配列を含む1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、配列番号47による配列を含む1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含む。

30

【1097】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、配列番号13及び配列番号14に示される配列とそれぞれ少なくとも95%同一であるV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を含むscFvドメインである1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含み、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、配列番号23及び配列番号24に示される配列とそれぞれ少なくとも95%同一であるV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を含むscFvドメインである1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含み、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-Bによる4-1BBアゴニスト融合タンパク質は、表11に示される配列と少なくとも95%同一であるV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域を含むscFvドメインである1つまたは複数の4-1BB結合ドメインを含み、V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインはリンカーによって連結される。

40

50

## 【表 1 1】

表 1 1 : 融合タンパク質中の 4 - 1 B B 結合ドメインとして、または s c F v 4 - 1 B B アゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA IVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS PRSE	60 120 180 240 254
配列番号 47 4-1BBL 水溶性 ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYVFFQ LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDL PASSEARNSA FGFQGRLLHL SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE	60 120 168
配列番号 48 4B4-1-1 バー ジョン 1 の可変重 鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS	60 118
配列番号 49 4B4-1-1 バー ジョン 1 の可変軽 鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 50 4B4-1-1 バー ジョン 2 の可変重 鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA	60 119
配列番号 51 4B4-1-1 バー ジョン 2 の可変軽 鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 52 H39E3-2 の可変 重鎖	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP GKGLEWVADI KNDGSYNTYA PSLTNRFTIS RDNANKSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT	60 120
配列番号 53 H39E3-2 の可変 軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSL SSGNQKNYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA	60 110

10

20

30

## 【 1 0 9 8 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、( i ) 第 1 の水溶性 4 - 1 B B 結合ドメイン、( i i ) 第 1 のペプチドリンカー、( i i i ) 第 2 の水溶性 4 - 1 B B 結合ドメイン、( i v ) 第 2 のペプチドリンカー、及び ( v ) 第 3 の水溶性 4 - 1 B B 結合ドメインを含み、さらに N 末端及び / または C 末端に追加のドメインを含む、4 - 1 B B アゴニスト単鎖融合ポリペプチドであり、追加のドメインは F a b または F c フラグメントドメインである。いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、( i ) 第 1 の水溶性 4 - 1 B B 結合ドメイン、( i i ) 第 1 のペプチドリンカー、( i i i ) 第 2 の水溶性 4 - 1 B B 結合ドメイン、( i v ) 第 2 のペプチドリンカー、及び ( v ) 第 3 の水溶性 4 - 1 B B 結合ドメインを含み、さらに N 末端及び / または C 末端に追加のドメインを含む、4 - 1 B B アゴニスト単鎖融合ポリペプチドであり、追加のドメインは F a b または F c フラグメントドメインであり、水溶性 4 - 1 B B ドメインのそれぞれがストーク領域 ( 三量化に貢献し、細胞膜に特定の距離を与えるが、4 - 1 B B 結合ドメインの一部ではない ) を欠き、第 1 及び第 2 のペプチドリンカーが独立して 3 ~ 8 アミノ酸の長さを有する。

40

## 【 1 0 9 9 】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、( i ) 第 1 の水溶性腫瘍壊死因子

50

(TNF)スーパーファミリーサイトカインドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の水溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の水溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインを含む、4-1BBアゴニスト単鎖融合ポリペプチドであり、水溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインのそれぞれはストーク領域を欠き、第1及び第2のペプチドリンカーは独立して3~8アミノ酸の長さを有し、各TNFスーパーファミリーサイトカインドメインは4-1BB結合ドメインである。

【1100】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、前述のV<sub>L</sub>ドメインのいずれかに連結された前述のV<sub>H</sub>ドメインのいずれかを含む4-1BBアゴニストscFv抗体である。

10

【1101】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、BPS Bioscience、San Diego、CA、USAから市販されている、BPS Bioscience 4-1BBアゴニスト抗体カタログ番号79097-2である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、Creative Biolabs、Shirley、NY、USAから市販されている、Creative Biolabs 4-1BBアゴニスト抗体カタログ番号MOM-18179である。

【1102】

1. OX40 (CD134) アゴニスト

20

いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストはOX40 (CD134) アゴニストである。OX40アゴニストは、当技術分野で周知の任意のOX40結合分子であり得る。OX40結合分子は、ヒトまたは哺乳動物のOX40に結合できるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、任意のアイソタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)、または免疫グロブリン分子のサブクラスの免疫グロブリン重鎖を含み得る。OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される結合分子という用語には、抗体(全長抗体を含む)、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリによって産生される断片、上記のいずれかのエピトープ結合断片、及び操作された形態の抗体、例えば、OX40に結合するscFv分子も含まれる。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本開示の方法及び組成物での使用のためのOX40アゴニストには、抗OX40抗体、ヒト抗OX40抗体、マウス抗OX40抗体、哺乳動物抗OX40抗体、モノクローナル抗OX40抗体、ポリクローナル抗OX40抗体、キメラ抗OX40抗体、抗OX40アドネクチン、抗OX40ドメイン抗体、単鎖抗OX40断片、重鎖抗OX40断片、軽鎖抗OX40断片、抗OX40融合タンパク質、及びその断片、誘導體、コンジュゲート、バリエーション、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、アゴニスト、抗OX40ヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体(すなわち、単一細胞株由来の抗体)である。

30

40

【1103】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、融合タンパク質であり得る。OX40Lに融合したFcドメインを含むOX40融合タンパク質は、例えば、Sadun, et al., J. Immunother. 2009, 182, 1481-89に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体OX40アゴニスト(3つまたは6つのリガンド結合ドメインを有する)などの多量体OX40アゴニストは、2つのリガンド結合ドメインを持つアゴニストモノクローナル抗体と比較し

50

て、優れた受容体 (OX40L) クラスタリング及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。3つのTNFRSF結合ドメイン及びIgG1-Fcを含み、任意にこれらの融合タンパク質のうちの2つ以上をさらに連結する、三量体(三価)または六量体(または六価)以上の融合タンパク質は、例えば、Gieffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 2013, 12, 2735-47に記載されている。

【1104】

アゴニストOX40抗体及び融合タンパク質は、強力な免疫応答を誘発することが知られている。Curti, et al., Cancer Res. 2013, 73, 7189-98。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式でOX40抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体依存性細胞毒性(ADCC)、例えばNK細胞の細胞毒性を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体依存性細胞食作用(ADCP)を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、補体依存性細胞傷害(CDC)を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Fc領域の機能性を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【1105】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒトOX40(配列番号54)に高い親和性とアゴニスト活性で結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒトOX40(配列番号54)に結合する、結合分子である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、マウスOX40(配列番号55)に結合する、結合分子である。OX40アゴニストまたは結合分子が結合するOX40抗原のアミノ酸配列を表12に要約する。

【表12】

表12: OX40抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 54 ヒト OX40 (ホモサピエンス)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAIILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
配列番号 55 マウス OX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPGSHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNAQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKA 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

【1106】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、約100 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、約90 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、約80 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、約70 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、約60 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、約50 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、約40 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合、または、約30 pM以下の $K_D$ でヒトまたはマウスOX40と結合する、OX40アゴニストを含む。

【1107】

いくつかの実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約 $7.5 \times 10^5$  1/M・sか、それより速い $k_{assoc}$ でヒトまたはマウスOX40に結合、約7

、 $5 \times 10^5$  1 / M · s か、それより速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $8 \times 10^5$  1 / M · s か、それより速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $8.5 \times 10^5$  1 / M · s か、それより速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $9 \times 10^5$  1 / M · s か、それより速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $9.5 \times 10^5$  1 / M · s か、それより速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、または約  $1 \times 10^6$  1 / M · s か、それより速い  $k_{assoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合する、OX 40 アゴニストを含む。

## 【1108】

いくつかの実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約  $2 \times 10^{-5}$  1 / s よりか、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.1 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.2 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.3 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.4 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.5 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.6 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.7 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.8 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約  $2.9 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合、または約  $3 \times 10^{-5}$  1 / s か、それより遅い  $k_{dissoc}$  でヒトまたはマウス OX 40 に結合する、OX 40 アゴニストを含む。

## 【1109】

いくつかの実施形態において、記載される組成物、プロセス及び方法は、約 10 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 9 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 8 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 7 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 6 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 5 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 4 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 3 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、約 2 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合、または、約 1 nM 以下の IC<sub>50</sub> でヒトまたはマウス OX 40 に結合する、OX 40 アゴニストを含む。

## 【1110】

いくつかの実施形態では、OX 40 アゴニストは、MED I 0 5 6 2 または MED I - 0 5 6 2 としても知られるタポリキシズマブである。タポリキシズマブは、AstraZeneca, Inc. の子会社である MedImmune から入手できる。タポリキシズマブは、免疫グロブリン G1 - kappa、抗 [ホモサピエンス TNFRSF 4 (腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーメンバー 4、OX 40、CD 134)]、ヒト化及びキメラ型モノクローナル抗体である。タポリキシズマブのアミノ酸配列を表 13 に示す。タポリキシズマブは、フコシル化された複合体二分岐 CHO タイプグリカンと共に、位置 301 及び 301' に N - グリコシル化部位；位置 22 ~ 95 (H - VL)、148 ~ 204 (CH1 - CL)、265 ~ 325 (CH2) 及び 371 ~ 429 (CH3) (及び位置 22' ~ 95'、148' ~ 204'、265' ~ 325'、及び 371' ~ 429') に重鎖鎖内ジスルフィド架橋；位置 23' ~ 88H - (WL) 及び 134' ~ 194' (C - CL) (及び位置 23' ~ 88' 及び 134' ~ 194') に鎖鎖内ジスルフィド架橋；位置 230 ~ 230' 及び 233 - 233' に鎖間重鎖 - 重鎖ジスルフィド架橋；224 ~ 214' 及び 224' ~ 214' に鎖間重鎖 - 軽鎖ジスルフィド架橋を含む。さまざまな固形腫瘍の適応症におけるタポリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所の臨床試験政府識別子 NCT 02318394 及び NCT 02705482 が含まれる。

## 【 1 1 1 1 】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56によって与えられる重鎖及び配列番号57によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56及び配列番号57にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片(scfv)、バリエーション、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56及び配列番号57にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56及び配列番号57にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56及び配列番号57にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56及び配列番号57にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号56及び配列番号57にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

## 【 1 1 1 2 】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、タポリキシズマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号58に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号59に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号58及び配列番号59にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号58及び配列番号59にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号58及び配列番号59にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号58及び配列番号59にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号58及び配列番号59にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号58及び配列番号59にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む、scfv抗体を含む。

20

30

## 【 1 1 1 3 】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号60、配列番号61、及び配列番号62にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号63、配列番号64、及び配列番号65にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。

40

## 【 1 1 1 4 】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、タポリキシズマブに関して医薬品規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、OX40抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はタポリキシズマブである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラ

50

ーは、承認された、または承認のために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はタボリキシズマブである。

10

## 【表13】

表13：タボリキシズマブに関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列（一文字アミノ酸記号）	
配列番号 56 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEIYIGY ISYNGITYHN PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHPK SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSDGSPFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 451
配列番号 57 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVEIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWVK DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	60 120 180 214
配列番号 58 タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSS SGYWNWIRKH PGKGLEIYIGY ISYNGITYHN PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLLVTVS	60 118
配列番号 59 タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR	60 108
配列番号 60 タボリキシズマブの重鎖 CDR1	GSFSSGYWN	9
配列番号 61 タボリキシズマブの重鎖 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13
配列番号 62 タボリキシズマブの重鎖 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14
配列番号 63 タボリキシズマブの軽鎖 CDR1	QDISNYLN	8
配列番号 64 タボリキシズマブの軽鎖 CDR2	LLIYYTSKLNH S	11
配列番号 65 タボリキシズマブの軽鎖 CDR3	QQGSALPW	8

20

30

40

## 【1115】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Pfizer, Inc. から入手可

50

能な、完全ヒト抗体である 11D4 である。11D4 の調製及び特性は米国特許第 7,960,515 号、同第 8,236,930 号、及び同第 9,028,824 号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。11D4 のアミノ酸配列を表 14 に示す。

【1116】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 によって与えられる重鎖及び配列番号 67 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 及び配列番号 67 にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、単鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 及び配列番号 67 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 及び配列番号 67 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 及び配列番号 67 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 及び配列番号 67 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 及び配列番号 67 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

20

【1117】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、11D4 の重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 68 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 69 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 68 及び配列番号 69 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 68 及び配列番号 69 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 68 及び配列番号 69 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 68 及び配列番号 69 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 68 及び配列番号 69 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である VH 及び VL 領域を含む。

30

【1118】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 70、配列番号 71、及び配列番号 72 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびに、配列番号 73、配列番号 74、及び配列番号 75 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメインを含む。

40

【1119】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、11D4 に関して医薬品規制当局によって承認された OX40 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、OX40 抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して 1 つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤は 11D4 である。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1

50

つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤は11D4である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤は11D4である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤は11D4である。

10

## 【表14】

表14：11D4に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)		
配列番号 66 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY	60	
	ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS	120	
	TRGSPVFPPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL	180	
	YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPCPAP PVAGPSVFLF	240	
	PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVY	300	
	SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV	360	
	SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF	420	
	SCSVMEALH NHYTQKLSLSL SPGK	444	
	配列番号 67 11D4 の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSDFIFPP	120	
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT	180		
LSKADYKHKH VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	214		
配列番号 68 11D4 の重鎖可 変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY	60	
ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS	118		
配列番号 69 11D4 の軽鎖可 変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKPK EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS	60	
RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK	107		
配列番号 70 11D4 の重鎖 CDR1	SYSMN	5	
配列番号 71 11D4 の重鎖 CDR2	YISSSSSTID YADSVKQ	17	
配列番号 72 11D4 の重鎖 CDR3	ESGWYLFDY	9	
配列番号 73 11D4 の軽鎖 CDR1	RASQGISSWL A	11	
配列番号 74 11D4 の軽鎖 CDR2	AASSLQS	7	
配列番号 75 11D4 の軽鎖 CDR3	QQYNSYPPT	9	

20

30

40

## 【1120】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Pfizer, Inc. から入手可

50

能な、完全ヒト抗体である 18D8 である。18D8 の調製及び特性は米国特許第 7,960,515 号、同第 8,236,930 号、及び同第 9,028,824 号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。18D8 のアミノ酸配列を表 15 に示す。

#### 【1121】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 によって与えられる重鎖及び配列番号 77 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 及び配列番号 77 にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、単鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 及び配列番号 77 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 及び配列番号 77 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 及び配列番号 77 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 及び配列番号 77 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 76 及び配列番号 77 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

20

#### 【1122】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、18D8 の重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 78 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 79 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 78 及び配列番号 79 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 78 及び配列番号 79 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 78 及び配列番号 79 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 78 及び配列番号 99 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 78 及び配列番号 79 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である VH 及び VL 領域を含む。

30

40

#### 【1123】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 80、配列番号 81、及び配列番号 82 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびに、配列番号 83、配列番号 84、及び配列番号 85 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメインを含む。

#### 【1124】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、18D8 に関して医薬品規制当局によって承認された OX40 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、OX40 抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して 1 つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤は 18D8 である。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1

50

つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤は18D8である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤は18D8である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤は18D8である。

10

20

30

40

50

## 【表15】

表15：18D8に関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 76 18D8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLV SVVTVPSNFF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNV YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVELT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号 77 18D8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGSDTFTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWVKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSLTLL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC	60 120 180 213
配列番号 78 18D8 の重鎖可 変領域	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV TVSS	60 120 124
配列番号 79 18D8 の軽鎖可 変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGSDTFTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK	60 106
配列番号 80 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH	5
配列番号 81 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG	17
配列番号 82 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV	15
配列番号 83 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 84 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 85 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT	8

## 【1125】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、GlaxoSmithKline

p1cから入手可能なヒト化抗体であるHu119-122である。Hu119-122の調製及び特性は、米国特許第9,006,399号及び第9,163,085号、ならびに国際特許公開第WO2012/027328号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Hu119-122のアミノ酸配列を表16に示す。

#### 【1126】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu119-122の重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号86に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号87に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号86及び配列番号87にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号86及び配列番号87にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号86及び配列番号87にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号86及び配列番号87にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号86及び配列番号87にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

10

#### 【1127】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号88、配列番号89、及び配列番号90にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号91、配列番号92、及び配列番号93にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。

20

#### 【1128】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu119-122に関して医薬品規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、OX40抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu119-122である。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu119-122である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu119-122である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu119-122である。

30

40

50

## 【表 16】

表 16 : Hu119-122 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 86 Hu119-122 の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNLSRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS	60 120
配列番号 87 Hu119-122 の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHY QKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 88 Hu119-122 の重鎖 CDR1	SHDMS	5
配列番号 89 Hu119-122 の重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 90 Hu119-122 の重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 91 Hu119-122 の軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 92 Hu119-122 の軽鎖 CDR2	LASNLES	7
配列番号 93 Hu119-122 の軽鎖 CDR3	QHSRELPLT	9

10

20

## 【1129】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、GlaxoSmithKline plc から入手可能なヒト化抗体である Hu106-222 である。Hu106-222 の調製及び特性は、米国特許第 9,006,399 号及び第 9,163,085 号、ならびに国際特許公開第 WO2012/027328 号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Hu106-222 のアミノ酸配列を表 17 に示す。

30

## 【1130】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、Hu106-222 の重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 94 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 95 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 94 及び配列番号 95 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 94 及び配列番号 95 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 94 及び配列番号 95 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 94 及び配列番号 95 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 94 及び配列番号 95 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である VH 及び VL 領域を含む。

40

## 【1131】

50

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号96、配列番号97、及び配列番号98にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号99、配列番号100、及び配列番号101にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。

【1132】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu106-222に関して医薬品規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、OX40抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu106-222である。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu106-222である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu106-222である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はHu106-222ある。

10

20

30

40

50

## 【表 17】

表 17 : Hu106-222 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 94 Hu106-222 の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKPKGASVKV SCKASGYFT DYSMHVWRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWQGTTTVT SS	60 120 122
配列番号 95 Hu106-222 の軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASYLYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTEFGQ GTKLEIK	60 107
配列番号 96 Hu106-222 の重鎖 CDR1	DYSMH	5
配列番号 97 Hu106-222 の重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG	17
配列番号 98 Hu106-222 の重鎖 CDR3	PYYDYVSYYA MDY	13
配列番号 99 Hu106-222 の軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A	11
配列番号 100 Hu106-222 の軽鎖 CDR2	SASYLYT	7
配列番号 101 Hu106-222 の軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT	9

10

20

## 【1133】

30

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト抗体は、MED I 6 4 6 9 (9 B 1 2 と称される) である。MED I 6 4 6 9 はマウスモノクローナル抗体である。Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575 - 585。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、9 B 1 2 ハイブリドーマによって産生され、Biovest Inc. (Malvern, MA, USA) に寄託された抗体であり、Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575 - 585 に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は MED I 6 4 6 9 の CDR 配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、MED I 6 4 6 9 の重鎖可変領域配列及び/または軽鎖可変領域配列を含む。

40

## 【1134】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、L 1 0 6 B D (Pharmingen 製品番号 3 4 0 4 2 0) である。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 L 1 0 6 (BD Pharmingen 製品番号 3 4 0 4 2 0) の CDR である。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 L 1 0 6 (BD Pharmingen 製品番号 3 4 0 4 2 0) の重鎖可変領域配列及び/または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、ACT 3 5 (Santa Cruz Biotechnology, カタログ番号 2 0 0 7 3) である。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、抗体 ACT 3 5 (Santa Cruz Biotechnology, カタログ番号 2 0 0 7 3) の CDR である。いくつかの実施形態では、OX40

50

アゴニストは、抗体ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号20073)の重鎖可変領域配列及び/または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストはマウスモノクローナル抗体である抗mCD134/mOX40 (クローンOX86)であり、InvivoMab、BioXcell Inc、West Lebanon、NHから市販されている。

【1135】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、国際特許出願公開第WO95/12673号、同第WO95/21925号、同第WO2006/121810号、同第WO2012/027328号、同第WO2013/028231号、同第WO2013/038191号、及び同第WO2014/148895号；欧州特許出願第EP0672141号；米国特許出願公開第US2010/136030号、同第US2014/377284号、同第US2015/190506号、及び同第US2015/132288号 (クローン20E5及び12H3を含む)；ならびに米国特許第7,504,101号、同第7,550,140号、同第7,622,444号、同第7,696,175号、同第7,960,515号、同第7,961,515号、同第8,133,983号、同第9,006,399号、及び同第9,163,085号に記載のOX40アゴニストから選択され、これらのそれぞれの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【1136】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、構造I-A (C末端Fc-抗体フラグメント融合タンパク質)または構造I-B (N末端Fc-抗体フラグメント融合タンパク質)に示されるようなOX40アゴニスト融合タンパク質、またはその断片、誘導体、コンジュゲート、バリエーション、またはバイオシミラーである。構造I-A及びI-Bの特性は、上記及び米国特許第9,359,420号、同第9,340,599号、同第8,921,519号、及び同第8,450,460号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。構造I-Aのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表9に示す。Fcドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン (配列番号31のアミノ酸17~230)、完全なヒンジドメイン (配列番号31のアミノ酸1~16)またはヒンジドメインの一部 (例えば、配列番号31のアミノ酸4~16)を含む。C末端Fc抗体を接続するための好ましいリンカーは、配列番号32~配列番号41で示される実施形態から選択され得、追加のポリペプチドの融合に適したリンカーを含む。同様に、構造I-Bのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表10に示す。Fc抗体フラグメントが構造I-BのようにTNRF5F融合タンパク質のN末端に融合される場合、Fcモジュールの配列は好ましくは配列番号42に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号43~配列番号45に示される実施形態から選択される。

【1137】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、11D4の可変重鎖及び可変軽鎖、18D8の可変重鎖及び可変軽鎖、Hu119-122の可変重鎖及び可変軽鎖、Hu106-222の可変重鎖及び可変軽鎖、表18に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにその断片、誘導体、コンジュゲート、バリエーション、及びバイオシミラーからなる群から選択される1つまたは複数のOX40結合ドメインを含む。

【1138】

いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、OX40配列を含む1つまたは複数のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、配列番号102による配列を含む1つまたは複数のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、水溶性OX40配列を含む1つまたは複数のOX40結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造I-AまたはI-BによるOX40アゴニスト融合タンパク質は、配

10

20

30

40

50

列番号 103 による配列を含む 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 104 による配列を含む 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含む。

【 1 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 58 及び配列番号 59 に示される配列とそれぞれ少なくとも 95 % 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む s c F v ドメインである 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含み、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 68 及び配列番号 69 に示される配列とそれぞれ少なくとも 95 % 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む s c F v ドメインである 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含み、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 78 及び配列番号 79 に示される配列とそれぞれ少なくとも 95 % 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む s c F v ドメインである 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含み、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 86 及び配列番号 87 に示される配列とそれぞれ少なくとも 95 % 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む s c F v ドメインである 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含み、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 94 及び配列番号 95 に示される配列とそれぞれ少なくとも 95 % 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む s c F v ドメインである 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含み、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインはリンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質は、表 18 に示される配列と少なくとも 95 % 同一である V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> 領域を含む s c F v ドメインである 1 つまたは複数の O X 4 0 結合ドメインを含み、V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインはリンカーによって連結される。

10

20

30

40

50

【表 18 - 1】

表 18 : 融合タンパク質におけるOX40結合ドメイン (例えば、構造 I-A及び I-B) として、または s c F v OX40アゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYSF QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	60 120 180 183
配列番号 103 OX40L 水溶性ド メイン	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNV VIINCDGFYL ISLKGYSFQE VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL IHQNPGEFCV L	60 120 131
配列番号 104 OX40L 水溶性ド メイン(代替)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLLISL KGYFSQEVNI SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVT DNTSLDDDFHV NGGELILIHQ NPGEFCVL	60 120 128
配列番号 105 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGGSGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGLTVTVS	60 120
配列番号 106 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYQYVNH TTFGQGTK	60 108
配列番号 107 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLSRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLTVVSSA	60 120
配列番号 108 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYQYVNH TTFGQGTK	60 108
配列番号 109 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAVYYCAKDR YITLPPALDY WGQGLTVTVS	60 120
配列番号 110 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYKSNP PTFGQGTK	60 108
配列番号 111 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFYDW GQGLTVTVSS	60 120
配列番号 112 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKQP GQAPRLLIYD ASNRAATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR	60 108
配列番号 113 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSDYWG QGTSVTVSS	60 119
配列番号 114 軽鎖可変領域	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQKQP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR	60 108
配列番号 115 重鎖可変領域	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMHWKQS HGKSLWIGG IYPNNGGSTY NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTIVTVS P	60 120 121
配列番号 116 軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQKQP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD RFTGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR	60 108

10

20

30

40

50

【表 18 - 2】

配列番号 117 ヒト化抗体の重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHVVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLNKED TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV SS	60 120 122
配列番号 118 ヒト化抗体の重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHVVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWQGQTTVTV SS	60 120 122
配列番号 119 ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 120 ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 121 ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLLELVAE INSDGGSTYY PDTMERRFII SRDNTKTKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA	60 120
配列番号 122 ヒト化抗体の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAE INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS	60 120
配列番号 123 ヒト化抗体の軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K	60 111
配列番号 124 ヒト化抗体の軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 125 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMWVRQSP EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG EVFYFDYWGQ GTTLTVSS	60 120 138
配列番号 126 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHQP GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFGSGSGSRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLITFGAG TKLELK	60 120 126

10

20

## 【1140】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i)第1の水溶性OX40結合ドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の水溶性OX40結合ドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の水溶性OX40結合ドメインを含み、さらにN末端及び/またはC末端に追加のドメインを含む、OX40アゴニスト単鎖融合ポリペプチドであり、追加のドメインはFabまたはFcフラグメントドメインである。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i)第1の水溶性4-1BB結合ドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の水溶性OX40結合ドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の水溶性OX40結合ドメインを含み、さらにN末端及び/またはC末端に追加のドメインを含む、OX40アゴニスト単鎖融合ポリペプチドであり、追加のドメインはFabまたはFcフラグメントドメインであり、水溶性OX40結合ドメインのそれぞれがストーク領域(三量化に貢献し、細胞膜に特定の距離を与えるが、OX40結合ドメインの一部ではない)を欠き、第1及び第2のペプチドリンカーが独立して3~8アミノ酸の長さを有する。

30

40

## 【1141】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i)第1の水溶性腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーサイトカインドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の水溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、及び(v)第3の水溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインを含む、OX40アゴニスト単鎖融合ポリペプチドであり、水溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインのそれぞれはストーク領域を欠き、第1及び第2のペ

50

チドリンカーは独立して3～8アミノ酸の長さを有し、TNFスーパーファミリーサイトカインドメインはOX40結合ドメインである。

【1142】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、MEDI6383である。MEDI6383はOX40アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第6,312,700号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1143】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、前述のV<sub>L</sub>ドメインのいずれかに連結された前述のV<sub>H</sub>ドメインのいずれかを含むOX40アゴニストscFv抗体である。

【1144】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USAから市販されているCreative Biolabs OX40アゴニストモノクローナル抗体MOM-18455である。

【1145】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、BioLegend, Inc., San Diego, CA, USAから市販されているOX40アゴニスト抗体クローンBer-ACT35である。

【1146】

I. 任意の細胞生存率分析

必要に応じて、当技術分野で周知の標準的なアッセイを使用して、第1の増殖のプライミング（初期バルク増殖と称されることもある）の後に、細胞生存率アッセイを実施することができる。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、第1の増殖のプライミングの後に細胞生存率アッセイを実施することを含む。例えば、バルクTILのサンプルに対してトリパンブルー排除アッセイを行うことができ、これにより、死んだ細胞が選択的に標識され、生存率の評価が可能になる。生存率の試験に使用する他のアッセイには、Alamar blueアッセイ、及びMTTアッセイが含まれるが、これに限定されない。

【1147】

1. 細胞数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び/または生存率を測定する。限定されないが、CD3、CD4、CD8、及びCD56などのマーカーの発現、及び本明細書に開示または記載されているその他のマーカーの発現は、例えば、これらに限定されないが、BD Biosciences (BD Biosciences, San Jose, CA)から市販される、FACSCanto (商標)フローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して、抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定することができる。細胞は、使い捨てのcチップ血球計 (VWR, Batavia, IL) を使用して手作業で計数することができ、生存率は、トリパンブルー染色を含むがこれに限定されない、当技術分野で周知の任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、全体が参照により本明細書に組み込まれるUS SN 15/863,634に基づいてアッセイすることもできる。細胞生存率はまた、米国特許公開第2018/0280436号または国際特許公開第WO/2018/081473号に基づいてアッセイすることができ、両方とも、すべての目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。

【1148】

場合によっては、以下で説明するプロトコルを使用して、バルクTIL集団はすぐに凍結保存することができる。代替的に、バルクTIL集団をREPに供し、次いで以下で説明するように凍結保存することもできる。同様に、遺伝子改変されたTILが治療に使用される場合、バルクまたはREP TIL集団は、適切な治療のために遺伝子改変に供することができる。

【1149】

2. 細胞培養

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、上で論じられたもの、ならびに図 1、特に例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G に例示されるものを含む、TIL を増殖させるための方法は、約 5,000 mL ~ 約 25,000 mL の細胞培地、約 5,000 mL ~ 約 10,000 mL の細胞培地、または約 5,800 mL ~ 約 8,700 mL の細胞培地を使用することを含み得る。いくつかの実施形態では、培地は無血清培地である。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖のプライミングにおける培地は無血清である。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖における培地は無血清である。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖プライミング及び第 2 の増殖（急速な第 2 の増殖とも称される）における培地は両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、TIL の数を増やすことは、1 種類みの細胞培養培地を使用する。任意の適切な細胞培養培地、例えば、AIM-V 細胞培地（L-グルタミン、50 µM 硫酸ストレプトマイシン、及び 10 µM 硫酸ゲンタマイシン）細胞培養培地（Invitrogen、Carlsbad CA）を使用することができる。この点に関して、本発明の方法は、TIL の数を増やすために必要な培地の量及び培地の種類数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、TIL の数を増やすことは、3 日または 4 日おきよりも少ない頻度で細胞を供給することを含み得る。ガス透過性容器内の細胞数を増やすことは、細胞を増殖させるのに必要な供給頻度が減ることにより、細胞数を増やすのに必要な手順が簡素化される。

10

#### 【1150】

いくつかの実施形態では、第 1 及び / または第 2 のガス透過性容器中の細胞培養培地は濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞数を増やすために必要な手順を簡素化し得る。いくつかの実施形態では、第 1 及び / または第 2 のガス透過性容器中の細胞培地には、ベータ-メルカプトエタノール（BME）が含まれていない。

20

#### 【1151】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織サンプルを得ることと、IL-2、1X 抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 1 の気体透過性容器内で腫瘍組織サンプルを約 1 ~ 8 日間、例えば第 1 の増殖のプライミングとして約 8 日間培養することと、TIL を第 2 のガス透過性容器に移し、IL-2、2x 抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 2 のガス透過性容器内で約 7 ~ 9 日間、例えば、約 7 日、約 8 日、または約 9 日 TIL の数を増やすことと、を含む。

30

#### 【1152】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織サンプルを得ることと、IL-2、1X 抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 1 の気体透過性容器内で腫瘍組織サンプルを約 1 ~ 7 日間、例えば第 1 の増殖のプライミングとして約 7 日間培養することと、TIL を第 2 のガス透過性容器に移し、IL-2、2x 抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 2 のガス透過性容器内で約 7 ~ 9 日間、例えば、約 7 日、約 8 日、または約 9 日 TIL の数を増やすことと、を含む。

#### 【1153】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織サンプルを得ることと、IL-2、1X 抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 1 の気体透過性容器内で腫瘍組織サンプルを約 1 ~ 7 日間、例えば第 1 の増殖のプライミングとして約 7 日間培養することと、TIL を第 2 のガス透過性容器に移し、IL-2、2x 抗原提示フィーダー細胞、及び OKT-3 を含む細胞培地を含有する第 2 のガス透過性容器内で約 7 ~ 10 日間、例えば、約 7 日、約 8 日、約 9 日、または約 10 日 TIL の数を増加させることと、を含む。

40

#### 【1154】

いくつかの実施形態では、TIL をガス透過性容器内で増殖させる。気体透過性容器は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 2005/0106717 A 1 号に記載されているものを含め、当技術分野で周知の方法、組成物、及びデバイスを

50

使用して、P B M Cを使用してT I Lを増殖させるために使用されている。いくつかの実施形態では、T I Lをガス透過性バッグ内で増殖させる。いくつかの実施形態では、T I Lは、X u r i C e l l E x p a n s i o n S y s t e m W 2 5 ( G E H e a l t h c a r e ) などのガス透過性バッグ内でT I Lを増殖させる細胞増殖システムを使用して増殖させる。いくつかの実施形態では、T I Lは、X u r i C e l l E x p a n s i o n S y s t e m W 5 ( G E H e a l t h c a r e ) としても知られる、W A V E B i o r e a c t o r S y s t e m などのガス透過性バッグ内でT I Lを増殖させる細胞増殖システムを使用して増殖させる。いくつかの実施形態では、細胞増殖システムは、約100 mL、約200 mL、約300 mL、約400 mL、約500 mL、約600 mL、約700 mL、約800 mL、約900 mL、約1 L、約2 L、約3 L、約4 L、約5 L、約6 L、約7 L、約8 L、約9 L、約10 Lからなる群から選択される容量を有するガス透過性細胞バッグを含む。

10

## 【1155】

いくつかの実施形態では、T I Lは、G - R e x フラスコ ( W i l s o n W o l f M a n u f a c t u r i n g から市販されている ) で増殖させることができる。そのような実施形態は、細胞集団を約  $5 \times 10^5$  細胞 /  $\text{cm}^2$  から  $10 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6$  細胞 /  $\text{cm}^2$  に増殖させることを可能にする。いくつかの実施形態では、これは供給なしである。いくつかの実施形態において、これは、培地が G - R e x フラスコ内の約10 cmの高さに存在する限り、供給なしである。いくつかの実施形態では、これは供給なしであるが、1つまたは複数のサイトカインの添加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインは、サイトカインを培地と混合する必要なく、ポーラスとして添加することができる。そのような容器、デバイス、及び方法は、当技術分野で周知であり、T I Lの増殖のために使用されており、米国特許出願公開第US2014/0377739 A1号、国際公開第WO2014/210036 A1号、米国特許出願公開第US2013/0115617 A1号、国際公開第WO2013/188427 A1号、米国特許出願公開第US2011/0136228 A1号、米国特許第US8,809,050 B2号、国際公開第WO2011/072088 A2号、米国特許出願公開第US2016/0208216 A1号、米国特許出願公開第US2012/0244133 A1号、国際公開第WO2012/129201 A1号、米国特許出願公開第US2013/0102075 A1号、米国特許番号US8,956,860 B2号、国際公開第WO2013/173835 A1号、米国特許出願公開第US2015/0175966 A1号に記載されているものを含み、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。このようなプロセスは、J i n e t a l . , J . I m m u n o t h e r a p y , 2 0 1 2 , 3 5 : 2 8 3 - 2 9 2 にも記載されている。

20

30

## 【1156】

J . 任意のT I Lの遺伝子工学

いくつかの実施形態では、本発明の増殖されたT I Lを、タンパク質発現を一過性に変化させるために、それぞれが本明細書で提供される閉鎖された無菌製造プロセス中を含む、増殖ステップの前、間、または後にさらに操作する。いくつかの実施形態では、一過性に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の増殖されたT I Lを、転写因子 ( T F ) 及び / またはT I L中のタンパク質発現を一時的に変更できる他の分子で処理する。いくつかの実施形態では、T F 及び / またはタンパク質の発現を一時的に変化させることができる他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化。及び / またはT I L集団における腫瘍抗原特異的T細胞の数の変化をもたらす。

40

## 【1157】

ある特定の実施形態では、この方法は、T I L集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、第1のT I L集団、第2のT I L集団及び / または第3のT I L集団を遺伝子編集することを含む。

## 【1158】

50

いくつかの実施形態では、本発明は、1つまたは複数のタンパク質の発現の促進または1つまたは複数のタンパク質の発現の阻害、ならびに1セットのタンパク質の促進と別のセットのタンパク質の阻害の両方の同時の組み合わせのために、メッセンジャーRNA (mRNA) または低分子 (または短鎖) 干渉RNA (siRNA) のTIL集団への挿入を含む、リボ核酸 (RNA) 挿入などによるヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【1159】

いくつかの実施形態では、本発明の増殖されたTILは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、第1の増殖前に、例えば、図1 (特に、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に示されるステップAから得た、例えばTIL集団中を含むバルクTIL集団中に発生する。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図1 (例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に示されるステップBで増殖された、例えばTIL集団中を含む第1の増殖中に発生する。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、第1の増殖と第2の増殖との移行中のTIL集団中 (例えば、本明細書に記載の第2のTIL集団)、例えば、図1に示される、ステップBから得られた、及びステップCに含まれるTIL集団中を含む第1の増殖後に発生する。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図1に示される、ステップCから得られた、及びステップDでのその増殖の前から得られたTIL集団を含む、バルクTIL集団中で第2の増殖の前に発生する。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図1に示されるステップD (例えば、第3番のTIL集団) で増殖された、例えばTIL集団中を含む、第2の増殖中に発生する。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図1に示される、ステップDでの増殖から得られる、例えばTIL集団中を含む、第2の増殖後に発生する。

【1160】

いくつかの実施形態では、TIL集団におけるタンパク質発現を一過性に变化させる方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は当技術分野で周知であり、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306、及び米国特許出願公開第2014/0227237 A1号に記載されており、それぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団におけるタンパク質発現を一過性に变化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションのステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法 (リン酸カルシウムDNA沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス) は、当技術分野で周知でありGraham and van der Eb, Virology 1973, 52, 456-467、Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376、及びChen and Okayama, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752、及び米国特許第5,593,875号に記載されており、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団におけるタンパク質発現を一過性に变化させる方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。例えば、濾過水中のカチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n, n, n-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA) 及びジオレイルホスフォチジルエタノールアミン (DOPE) の1:1 (w/w) リポソーム製剤を用いる方法などのリポソームトランスフェクション法は、当技術分野で周知であり、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417及び米国特許第5,279,833号、同第5,908,635号、同第6,056,938号、同第6,110,490号、同第6,534,484号、及び同第7,687,070号に記載されており、これらのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団におけるタンパク質発現を一過性に

10

20

30

40

50

変化させる方法は、米国特許第 5,766,902 号、同第 6,025,337 号、同第 6,410,517 号、同第 6,475,994 号、及び同第 7,189,705 号に記載の方法を使用するトランスフェクションのステップを含み、それぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【1161】

いくつかの実施形態では、本発明の TIL は、国際特許出願第 WO 2019/136456 A1 または WO 2019/210131 A1 に記載の方法を使用して、1 つまたは複数の遺伝子の発現を一過性にまたは永続的に抑制するようにさらに改変され、それぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれ、これには、TIL を遺伝的に編集して、PD-1 及び CTLA-4 をコードする遺伝子などの特定の標的遺伝子をノックアウトする方法が含まれる。

10

#### 【1162】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は幹記憶 T 細胞 (TSCM) の増加をもたらす。TSCM は、抗原経験のセントラルメモリー T 細胞の初期前駆細胞である。TSCM は一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多能性能力を示し、一般に効果的な TIL 製品の産生に望ましいものである。TSCM は、養子細胞移入のマウスモデルにおいて、他の T 細胞サブセットと比較して抗腫瘍活性が増強されていることが示されている (Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011, Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012, Cieri et al. Blood 2013)。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、高比率の TSCM を含む組成物を有する TIL 集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% TSCM の割合を増加させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、TIL 集団における TSCM を少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、または 10 倍増加させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% の TSCM を有する TIL 集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% の TSCM を有する治療用 TIL 集団をもたらす。

20

30

40

#### 【1163】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、抗原経験の T 細胞の若返りをもたらす。いくつかの実施形態では、若返りには、例えば、増殖の増加、T 細胞活性化の増加、及び/または抗原認識の増加が含まれる。

#### 【1164】

いくつかの実施形態において、タンパク質発現の一過性変化は、腫瘍由来の TCR レパートリーを保存するために、T 細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、腫瘍由来の TCR レパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、腫瘍由来の TCR レパートリーを維持する。

50

## 【 1 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、PD-1 (PDCD1またはCC279とも称される)、TGFB2、CCR4/5、CBLB (CBLB)、CISH、CCR (キメラ共刺激受容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1)、CCL4 (MIP1-)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選択関連高移動度グループ (HMG) ボックス (TOX)、アンキリンリピートドメイン11 (ANKRD11)、BCL6 コリプレッサー (BCOR) 及び/またはcAMPプロテインキナーゼA (PKA) を含むが、これらに限定されない、遺伝子を標的にする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、PD-1、TGFB2、CCR4/5、CBLB (CBLB)、CISH、CCR (キメラ共刺激受容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TGF、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1)、CCL4 (MIP1-)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選択関連高移動度グループ (HMG) ボックス (TOX)、アンキリンリピートドメイン11 (ANKRD11)、BCL6 コリプレッサー (BCOR) 及び/またはcAMPプロテインキナーゼA (PKA) からなる群から選択される遺伝子を標的にする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、PD-1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、TGFB2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR4/5を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CISHを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR (キメラ共刺激受容体) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、IL-2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、IL-12を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、IL-15を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、IL-21を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、NOTCH1/2ICDを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、TIM3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、LAG3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、TIGITを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、TGFを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR4を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR5を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CXCR1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CXCR2を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CSCR3を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCL2 (MCP-1) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCL3 (MIP-1) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCL4 (MIP1-) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCL5 (RANTES) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CXCL1を標的とする。いくつかの実施形態では、タ

ンパク質発現の一過性変化は、CXCL8を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCL22を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCL17を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、VHLを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CD44を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、PIK3CDを標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、SOCS1を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度グループ(HMG)ボックス(TOX)を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、アンキリンリピートドメイン11(ANKRD11)を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、BCL6コリプレッサー(BCOR)を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、cAMPタンパク質キナーゼA(PKA)を標的とする。

10

## 【1166】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、ケモカイン受容体の増加及び/または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現するケモカイン受容体には、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1)、CCL4(MIP1-)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22、及び/またはCCL17を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

20

## 【1167】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGF $\beta$ R2、及び/またはTGF $\beta$ (例えば、TGF $\beta$ 経路遮断をもたらすことを含む)の減少及び/または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CBLB(CBL-B)の減少及び/または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CISHの減少及び/または発現低下をもたらす。

## 【1168】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、例えば、TILトラフィックまたは腫瘍部位への移動を改善するために、ケモカイン受容体の増加及び/または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR(キメラ共刺激受容体)の増加及び/または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、及び/またはCSCR3からなる群から選択されるケモカイン受容体の増加及び/または過剰発現をもたらす。

30

## 【1169】

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

40

## 【1170】

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

## 【1171】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、cAMPプロテインキナー

50

ゼ A ( P K A ) の減少及び / または発現低下をもたらす。

【 1 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの分子の減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される2つの分子の減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、P D - 1、ならびにL A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの分子の減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1、L A G - 3、C I S H、C B L B、T I M 3、及びそれらの組み合わせの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1、ならびにL A G - 3、C I S H、C B L B、T I M 3、及びそれらの組み合わせのうちの1つの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1及びL A G 3の減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1及びC I S Hの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1及びC B L Bの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、L A G 3及びC I S Hの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、L A G 3及びC B L Bの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、C I S H及びC B L Bの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、T I M 3及びP D - 1の減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、T I M 3及びL A G 3の減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、T I M 3及びC I S Hの減少及び / または発現低下をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、T I M 3及びC B L Bの減少及び / または発現低下をもたらす。

【 1 1 7 3 】

いくつかの実施形態では、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルス法またはレンチウイルス法によって、第1のT I L集団、第2のT I L集団、または採取されたT I L集団に挿入される(例えば、接着分子の発現が増加する)。

【 1 1 7 4 】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの分子の減少及び / または発現低下、かつ、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、及びそれらの組み合わせの増加及び / または発現増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C I S H、C B L B、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの分子の減少及び / または発現低下、かつ、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、及びそれらの組み合わせの増加及び / または発現増強をもたらす。

【 1 1 7 5 】

いくつかの実施形態では、約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%発現が低下する。いくつか

かの実施形態では、少なくとも約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 85%、約 90%、または約 95% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 80% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 85% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 90% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 95% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 99% 発現が低下する。

【1176】

いくつかの実施形態では、約 5%、約 10%、約 10%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、または約 95% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 85%、約 90%、または約 95% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 80% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 85% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 90% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 95% 発現が増加する。いくつかの実施形態では、少なくとも約 99% 発現が増加する。

【1177】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、TILを転写因子(TF)及び/またはTILのタンパク質発現を一時的に変更できる他の分子で処理することによって誘導される。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)及び/またはタンパク質発現を一時的に変更できる他の分子の細胞内送達のために、SQZベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが使用される。転写因子を含むタンパク質を、T細胞を含む様々な一次ヒト細胞に送達する能力を実証するそのような方法は、米国特許出願公開第US 2019/0093073 A1号、同第US 2018/0201889 A1号、及び同第US 2019/0017072 A1号に記載されており、それぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。そのような方法は、TIL集団を転写因子(TF)及び/または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために、本発明で用いることができ、前記TFが及び/または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子は、腫瘍抗原の発現増加及び/またはTIL集団における腫瘍抗原特異的T細胞の数を増加させ、したがって、TIL集団をリプログラミングし、リプログラムされていないTIL集団と比較してリプログラミングされたTIL集団の治療効果を増加させる。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、本明細書に記載される、エフェクターT細胞の亜集団及び/またはTIL集団の開始集団または前の集団(すなわち、リプログラミング前)に対する中央記憶T細胞の増加をもたらす。

【1178】

いくつかの実施形態では、転写因子(TF)には、TCF-1、NOTCH1/2ICD及び/またはMYBが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)はTCF-1である。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)はNOTCH1/2ICDである。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)はMYBである。いくつかの実施形態では、追加のTILリプログラミングを誘導するために、転写因子(TF)を人工多能性幹細胞培養(iPSC)、例えば市販のKNOCKOUT Serum Replacement(Gibco/ThermoFisher)と共に投与する。いくつかの実施形態では、転写因子(TF)を、追加のTILリプログラミングを誘導するためにiPSCカクテルと共に投与する。いくつかの実施形態では、転写因子(

10

20

30

40

50

TF)を、iPSCカクテルなしで投与する。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、TSCMの割合を増加させる。いくつかの実施形態では、リプログラミングは、約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95% TSCMの割合(%)を増加させる。

#### 【1179】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過性に変更する方法は、1つまたは複数のタンパク質の産生のために遺伝子を安定的に組み込むステップを含む、TIL集団を遺伝的に改変する方法と組み合わせることができる。ある特定の実施形態では、方法は、TIL集団を遺伝的に改変するステップを含む。ある特定の実施形態では、方法は、第1のTIL集団、第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を遺伝的に改変することを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝的に改変する方法は、レトロウイルス形質導入のステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝的に改変する方法は、レンチウイルス形質導入のステップを含む。レンチウイルス形質導入システムは当技術分野で知られており、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77; Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75; Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71及び米国特許第6,627,442号に記載されており、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝的に改変する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入のステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入システムは当技術分野で知られており、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16,に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝的に改変する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入のステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入システムは当技術分野で知られており、トランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないように、トランスポザーゼがDNA発現ベクターとして、または発現可能なRNAまたはタンパク質として、例えば、トランスポザーゼがmRNA(例えば、キャップ及びポリAテールを含むmRNA)として、提供されるシステムを含む。SB10、SB11、及びSB100xなどのサケ型Tel様トランスポザーゼ(SBまたはSleeping Beautyトランスポザーゼ)を含む適切なトランスポゾン媒介遺伝子導入システム、及び酵素活性が増加した人工酵素は、Hackett, et al., Mol. Therapy 2010, 18, 674-83及び米国特許第6,489,458号に記載されており、それぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【1180】

いくつかの実施形態では、TILにおけるタンパク質発現の一過性変化は、一般に長さが19~25塩基対の二本鎖RNA分子である、短い干渉RNAまたはサイレンシングRNAとして知られることもある低分子干渉RNA(sRNA)によって誘導される。sRNAはRNA干渉(RNAi)で使用され、相補的なヌクレオチド配列を持つ特定の遺伝子の発現を妨害する。sRNAは、本発明に従ってCCRにも改変されたTIL中の遺伝子を一過性にノックダウンするために使用され得る。

#### 【1181】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、自己送達RNA干渉(sdRNA)によって誘導され、これは、2'-OH置換(典型的にはフッ素または-OCH<sub>3</sub>)の割合(%)が高い、化学的に合成された非対称sRNA二本鎖であり、20ヌクレオチドのアンチセンス(ガイド)鎖と13~15塩基のセンス(パッセンジャー)鎖が、テトラエチレングリコール(TEG)リンカーを使用してその3'末端でコレステロールに結合している。低分子干渉RNA(sRNA)は、短鎖干渉RNAまたはサイレンシングRNAとしても知られ、通常19~25塩基対の長さの二本鎖RNA分子である。

*siRNA* は RNA 干渉 (*RNAi*) で使用され、相補的なヌクレオチド配列を持つ特定の遺伝子の発現を妨害する。*sdRNA* は共有結合及び疎水的に修飾された *RNAi* 化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要としない。*sdRNA* は一般に、最小限の二本鎖領域を持つ非対称の化学修飾された核酸分子である。*sdRNA* 分子は通常、一本鎖領域と二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域と二本鎖領域の両方にさまざまな化学修飾を含むことができる。さらに、*sdRNA* 分子は、本明細書に記載されるように、従来の及び高度なステロール型分子などの疎水性コンジュゲートに結合することができる。*sdRNA* 及びそのような *sdRNA* を作製するための関連方法もまた、例えば、米国特許出願公開第 US 2016/0304873 A1 号、同第 US 2019/0211337 A1 号、同第 US 2009/0131360 A1 号、及び同第 US 2019/0048341 A1 号、及び米国特許第 10,633,654 号及び同第 10,913,948 B2 号に記載されており、それぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。*sdRNA* の構造、化学、標的位点、配列の好みなどを最適化するために、アルゴリズムが開発され、*sdRNA* 効力予測に利用されている。これらの分析に基づいて、機能的 *sdRNA* 配列は一般に、40% 以上の確立で、1  $\mu$ M 濃度で発現が 70% 以上低下すると定義されている。

#### 【1182】

二本鎖 DNA (*dsRNA*) は、一般に、センス (パッセンジャー) 鎖及びアンチセンス (ガイド) 鎖である RNA の相補鎖の対を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。*dsRNA* という用語は、*siRNA* とは対照的に、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によってより大きな *dsRNA* 分子から放出される *siRNA* 分子の配列を含む前駆体分子を指す。

#### 【1183】

いくつかの実施形態では、方法は、*siRNA* または *sdRNA* の使用を含む、TIL 集団におけるタンパク質発現の一過性変化を含む。*sdRNA* の使用方法は、Khvorova and Watts, Nat. Biotechnol. 2017, 35, 238-248、Byrne, et al., J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2013, 29, 855-864、及び Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018 (近刊) に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、*siRNA* の送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊 (スクイズまたは SQZ 法など) を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL 集団への *sdRNA* の送達は、エレクトロポレーション、SQZ、または他の方法を使用せずに、代わりに、培地中で TIL 集団が 1  $\mu$ M / 10,000 TIL の濃度で *sdRNA* に曝露される 1~3 日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、*siRNA* または *sdRNA* の TIL 集団への送達を含み、培地中で TIL 集団を *siRNA* または *sdRNA* に 1  $\mu$ M / 10,000 TIL の濃度で 1~3 日間曝露することを含む。いくつかの実施形態では、TIL 集団への *siRNA* または *sdRNA* の TIL 集団への送達は、培地中で TIL 集団が 10  $\mu$ M / 10,000 TIL の濃度の *siRNA* または *sdRNA* に曝露される 1~3 日間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL 集団への *siRNA* または *sdRNA* の TIL 集団への送達は、培地中で TIL 集団が 0.1  $\mu$ M / 10,000 TIL ~ 50  $\mu$ M / 10,000 TIL の濃度の *sdRNA* に曝露される 1~3 日間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL 集団への *siRNA* または *sdRNA* の TIL 集団への送達は、培地中で TIL 集団が 0.1  $\mu$ M / 10,000 TIL ~ 50  $\mu$ M / 10,000 TIL の濃度の *siRNA* または *sdRNA* に曝露される 1~3 日間を使用して達成され、*siRNA* または *sdRNA* への曝露は、培地に新鮮な *siRNA* または *sdRNA* を追加することにより 2, 3, または 5 回実施される。他の適切なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第 US 2011/0039

914 A1号、同第US2013/0131141 A1号、及び同第US2013/0131142 A1号、及び米国特許第9,080,171号に記載されており、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1184】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、製造中にTIL集団に挿入される。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、NOTCH1/2ICD、PD-1、CTLA-4TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGF、TGFBR2、cAMPプロテインキナーゼA(PKA)、BAFFBR3、CISH、及び/またはCBLBに干渉するRNAをコードする。いくつかの実施形態では、発現の低下は、例えば、フローサイトメトリー及び/またはqPCRによって評価される遺伝子サイレンシングの割合(%)に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約80%、約85%、約90%、または約95%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約85%、約90%、または約95%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約80%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約85%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約90%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約95%発現が低下する。いくつかの実施形態では、少なくとも約99%発現が低下する。

10

20

30

40

50

【1185】

siRNAまたはsdRNAの化学修飾に基づく自己送達可能RNAi技術を本発明の方法と一緒に使用して、本明細書に記載のTILにsiRNAまたはsdRNAを首尾よく送達することができる。非対称siRNAまたはsdRNA構造及び疎水性リガンドによる骨格修飾の組み合わせ(例えば、Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018及びUS20160304873を参照)により、siRNAまたはsdRNAのヌクレアーゼ安定性を利用して、培地への単純な添加によりsdRNAまたはsdRNAを、追加の製剤及び方法なしで培養哺乳動物細胞に浸透することができる。この安定性により、培地中のsiRNAまたはsdRNAの活性濃度を維持するだけで、一定レベルのRNAiを介した標的遺伝子活性の低下をサポートすることができる。理論に拘束されるわけではないが、siRNAまたはsdRNAのバックボーンの安定化は、遺伝子発現効果を長期間低下させ、非分裂細胞では数か月持続することができる。

【1186】

いくつかの実施形態では、95%を超えるTILのトランスフェクション効率及び様々な特異的siRNAまたはsdRNAによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、RNAi効果及び/または寿命の増加させるために、いくつかの非修飾リボース残基を含むsiRNAまたはsdRNAを完全に修飾された配列で置き換えた。いくつかの実施形態では、発現効果の低下は、12時間、24時間、36時間、48時間、5日、6日、7日、または8日以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の低下は、TILのsiRNAまたはsdRNA処理後10日以上で減少する。いくつかの実施形態では、標的発現の70%超の低下が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の70%超の低下が維持されたTILである。いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1経路での発現の低下は、TILにより強力なインビボ効果を示させ、これは、いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1経路の抑制効果を回避することによるものである。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAによるPD-1の発現の低下は、TIL増殖の増加をもたらす。

【1187】

いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 70% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 75% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 80% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 85% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 90% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 95% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、標的遺伝子の発現の 99% 減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 0.25  $\mu$ M ~ 約 4  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 0.25  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 0.5  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 0.75  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 1.0  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 1.25  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 1.5  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 1.75  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 2.0  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 2.25  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 2.5  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 2.75  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 3.0  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 3.25  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 3.5  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 3.75  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用される *s i R N A* または *s d R N A* 配列は、約 4.0  $\mu$ M の濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の低下を示す。

#### 【 1 1 8 8 】

いくつかの実施形態では、*s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチド剤は、安定性及び/または治療剤の有効性を高めるために、及び治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすために、1つまたは複数の修飾を含む。そのような修飾には、2'-O-メチル修飾、2'-O-フルオロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、2'-F修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾及び/または2'-デオキシヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンD、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び/またはフェニルを含む、1つまたは複数の疎水性修飾を含むため

に修飾される。さらなる特定の実施形態では、化学的に修飾されたヌクレオチドは、ホスホロチオエート、2'-O-メチル、2'デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖を修飾することができ、修飾糖には、D-リボース、2'-O-アルキル(2'-O-メチル及び2'-O-エチルを含む)、すなわち、2'-アルコキシ、2'-アミノ、2'-S-アルキル、2'-ハロ(2'-フルオロを含む)、T-メトキシエトキシ、2'-アリルオキシ(-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)、2'-プロパルギル、2'-プロピル、エチニル、エテニル、プロベニル、及びシアノなどを含むことができるが、これらに限定されない。一実施形態では、糖部分はヘキソースであり、Augustyns, et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992), に記載されるオリゴヌクレオチドに組み込まれ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【1189】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖である、すなわち、分子の両端に一本鎖配列の突出がない、すなわち平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は異なる長さのものであり得る。換言すれば、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であるわけではない。例えば、2つの別個の核酸分子が使用される場合、分子の1つ、例えば、アンチセンス配列を含む第1の分子は、それにハイブリダイズする第2の分子より長くなり得る(分子の一部が一本鎖のままになる)。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、両端の分子の一部が一本鎖のままであり得る。

20

#### 【1190】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び/またはループまたはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約70%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約80%にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約90%~95%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約96%~98%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のミスマッチを含む。

30

#### 【1191】

いくつかの実施形態では、siRNA または sdRNA オリゴヌクレオチドは、例えば、3'または5'結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護することができる(例えば、米国特許第5,849,902号及びWO98/13526)。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される「ブロッキング基」という用語は、保護基または合成のためのカップリング基(例えば、FITC、プロピル(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)、グリコール(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-)リン酸塩(PO<sub>3</sub><sup>2+</sup>)、ホスホン酸水素、またはホスホルアミダイト)のどちらかとしてオリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに接続することができる置換基(例えば、OH基以外)を指す。「ブロッキング基」には、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの5'及び3'末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含まれ得る。

40

#### 【1192】

いくつかの実施形態では、siRNA または sdRNA 内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部は、置換結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって連結される。

#### 【1193】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、少なくとも1、5、2、3、4、5、6、7、

50

8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500 s i R N A または s d R N A の細胞取り込みの増強につながる。いくつかの実施形態では、C または U 残基の少なくとも1つは、疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数の C 及び U が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、C s 及び U s の少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% または少なくとも95% が疎水性修飾を含むことができる。いくつかの実施形態では、すべての C 及び U が疎水性修飾を含む。

10

## 【1194】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 分子は、プロトン付加可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンがセンス鎖に組み込まれる (R I S C ローディング後に廃棄される分子の部分に)。いくつかの実施形態では、本発明の s i R N A または s d R N A 化合物は、二重鎖領域 (長さ10~15塩基の効率的な R I S C 侵入に必要) 及び長さ4~12ヌクレオチドの一本鎖領域を含む非対称化合物を含み、13ヌクレオチドの二重鎖を持つ。いくつかの実施形態では、6ヌクレオチドの一本鎖領域が使用される。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A の一本鎖領域は、2~12個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合 (ホスホロチオエート修飾と称される) を含む。いくつかの実施形態では、6~8個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が使用される。いくつかの実施形態では、本発明の s i R N A または s d R N A 化合物は、安定性を提供し、R I S C 侵入に適合する固有の化学修飾パターンも含む。例えば、ガイド鎖は、R I S C への侵入を妨げることなく安定性を確認する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の化学修飾パターンは、2' F 修飾された C 及び U ヌクレオチドの大部分及びリン酸化された5'末端を含む。

20

## 【1195】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 中のヌクレオチドの少なくとも30%が修飾される。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 中の少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% ヌクレオチドが修飾されている。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 中の100%のヌクレオチドが修飾されている。

30

## 【1196】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A 分子は、最小限の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、8~15ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、8、9、10、11、12、13、14 または 15 ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、13ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖の間に100%の相補性がある場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖の間に1つまたは複数のミスマッチがある場合もあります。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は平滑末端であるか、または1ヌクレオチドのオーバーハングを有する。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、4~12ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 ヌクレオチド長であり得る。

40

50

いくつかの実施形態では、一本鎖領域はまた、4ヌクレオチド長未満または12ヌクレオチド長を超えることができる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、6または7ヌクレオチド長である。

【1197】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNA分子は向上した安定性を有する。場合によっては、化学的に修飾されたsiRNAまたはsdRNA分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間または24時間以上（中間値を含む）の半減期を有する。いくつかの実施形態では、sd-rxRNAは、12時間より長い培地中の半減期を有する。

10

【1198】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、効力の増大のために最適化される及び/または毒性が軽減される。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び/またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び/またはガイド鎖及び/またはパッセンジャー鎖中のホスホロチオエート修飾の数は、いくつかの態様では、RNAの効力に影響を与える一方で、いくつかの態様では、2'-フルオロ(2'F)修飾を2'-O-メチル(2'OMe)修飾に置き換えることは、分子の毒性に影響を与える可能性がある。いくつかの実施形態において、分子の2'F含有量の減少は、分子の毒性を減少させると予測される。いくつかの実施形態では、RNA分子中のホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、sdRNAは、2'F修飾を有しないが、細胞取り込み及び組織浸透において同等の有効性を特徴とする。

20

【1199】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、長さが約18~19ヌクレオチドであり、約2~14個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または14を超えるヌクレオチドを含むことができる。ガイド鎖は、RISCへの侵入を妨げることなく安定性を高める1つまたは複数の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのホスフェート修飾ヌクレオチドは、3'末端、5'末端、またはガイド鎖全体に広がり得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の3'末端の10個のヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖はまた、分子全体に配置できる2'F及び/または2'OMe修飾を含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の位置1のヌクレオチド（ガイド鎖の最も5'の位置にあるヌクレオチド）は、2'OMe修飾されている及び/またはリン酸化されている。ガイド鎖内のC及びUヌクレオチドを2'F修飾することができる。例えば、19ntガイド鎖の位置2~10（または異なる長さのガイド鎖の対応する位置）のC及びUヌクレオチドを2'F修飾することができる。ガイド鎖内のC及びUヌクレオチドを2'OMe修飾することもできる。例えば、19ntガイド鎖の位置11~18（または異なる長さのガイド鎖の対応する位置）のC及びUヌクレオチドを2'OMe修飾することができる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も3'末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のC及びUの大部分が2'F修飾され、ガイド鎖の5'末端がリン酸化される。他の実施形態では、位置1及び位置11~18のCまたはUが2'OMe修飾され、ガイド鎖の5'末端がリン酸化される。他の実施形態では、位置1及び位置11~18のCまたはUが2'OMe修飾され、ガイド鎖の5'末端がリン酸化され、位置2~10のCまたはUが2'F修飾される。

30

40

【1200】

自己送達型RNAi技術は、追加の製剤や技術を必要とせずに、RNAi剤（siRNA、sdRNA、または他のRNAi剤のいずれか）で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクトしにくい細胞株をトランスフェクトする能力、高いインピボ活性、及び使いやすさは、従来のsiRNAベースの技術よりも重要な機能上の利

50

点を示す組成物及び方法の特徴であり、そのため、本発明のTILにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関するいくつかの実施形態においてsdRNA法が採用されている。sdRNA法は、エキスピボ及びインピボの両方で、化学的に合成された化合物を広範囲の一次細胞と組織に直接送達することを可能にする。本明細書の本発明のいくつかの実施形態に記載のsdRNAは、Advirna LLC、Worcester、MA、USAから市販されている。

【1201】

siRNA及びsdRNAは、疎水的に修飾されたsiRNA-アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され、例えば、Byrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864 開示に開示されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1202】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチドは、無菌エレクトロポレーションを使用して、本明細書に記載のTILに送達することができる。ある特定の実施形態では、方法は、siRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチドを送達するためのTIL集団の無菌エレクトロポレーションを含む。

【1203】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達することができる。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達系は、脂質、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、送達剤を必要としない自己送達RNAi剤である。ある特定の実施形態では、方法は、TIL集団にsiRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

20

【1204】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載のTILと接触し（例えば、接触させる、本明細書では投与するまたは送達するとも称される）本明細書に記載のTILに取り込まれ、これにはTILによる受動的取り込みを含む。siRNAまたはsdRNAは、第1の増殖中、例えばステップB中、第1の増殖後、例えばステップC中、第2の増殖前または中、例えばステップDの前または最中、ステップDの後、ステップEの採取前、ステップFの採取中または採取後、ステップFの最終調合及び/または輸液バッグへの移し替えの前または最中に、本明細書に記載のTILに添加することができる。さらには、ステップFの任意の凍結保存ステップからの解凍後に、siRNAまたはsdRNAを添加することができる。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする1つまたは複数のsiRNAまたはsdRNAを、TIL及び他の薬剤を含む細胞培養培地に、100nM~20mM、200nM~10mM、500nm~1mM、1µM~100µM、及び1µM~100µMからなる群から選択される濃度で添加し得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする1つまたは複数のsiRNAまたはsdRNAを、TIL及び他の薬剤を含む細胞培養培地に、0.1µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、0.5µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、0.75µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、1µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、1.25µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、1.5µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、2µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、5µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地、または10µM siRNAまたはsdRNA / 10,000 TIL / 100µL培地からなる群から選択される量で添加し得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、

30

40

50

C I S H、及びC B L Bを含む、本明細書に記載の遺伝子を標的とする1つまたは複数のs d R N Aを、P R E PまたはR E P段階で、1日2回、1日1回、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、または7日ごとにT I L培養物に添加し得る。

【1205】

s i R N Aまたはs d R N Aを含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、s i R N Aまたはs d R N Aを細胞培養培地に高濃度で溶解し、受動的取り込みが起こるのに十分な時間を与えることによって、増殖プロセス中に本明細書に記載のT I Lと接触させることができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、T I L集団を本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチド、例えばs i R N Aまたはs d R N Aを細胞培養培地に溶解し、細胞培養培地をT I L集団と接触させることを含む。T I Lは、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団及び/または第三の集団であり得る。

10

【1206】

いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aオリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、D M S O、グリセロールまたはデキストラン、エレクトロポレーションを含む適切な当該分野で認められた方法によって、または、例えば、カチオン性、アニオン性、または中性脂質組成物を使用したトランスフェクションによって、または当該技術分野で知られている方法(例えば、W O 9 0 / 1 4 0 7 4、W O 9 1 / 1 6 0 2 4、W O 9 1 / 1 7 4 2 4、米国特許第4,897,355号、B e r g a n e t a 1 9 9 3 . N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 2 1 : 3 5 6 7 ) を使用したりポソームを使用して増強することができる。

20

【1207】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子の発現を低下させるために、2つ以上のs i R N Aまたはs d R N Aが使用される。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aを標的とするP D - 1、T I M - 3、C B L B、L A G 3及び/またはC I S Hのうちの1つ以上が併用される。いくつかの実施形態では、2つ以上の遺伝子標的の発現を減少させるために、P D - 1 s i R N Aまたはs d R N Aを、T I M - 3、C B L B、L A G 3及び/またはC I S Hのうちの1つまたは複数と共に使用する。いくつかの実施形態では、L A G 3 s i R N Aまたはs d R N Aを、s i R N Aまたはs d R N Aを標的とするC I S Hと組み合わせて使用して、両方の標的の遺伝子発現を低下させる。いくつかの実施形態では、本明細書中のP D - 1、T I M - 3、C B L B、L A G 3及び/またはC I S Hのうちの1つまたは複数を標的とするs i R N Aまたはs d R N Aは、A d v i r n a L L C , W o r c e s t e r , M A , U S A から市販されている。

30

【1208】

いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aは、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aは、P D - 1、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、一方のs i R N Aまたはs d R N Aは、P D - 1を標的とし、他方のs i R N Aまたはs d R N Aは、L A G 3、T I M 3、C T L A - 4、T I G I T、C I S H、T G F R 2、P K A、C B L B、B A F F ( B R 3 )、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aは、P D - 1、L A G - 3、C I S H、C B L B、T I M 3、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aは、P D - 1及びL A G 3、C I S H、C B L B、T I M 3、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのs i R N Aまたはs d R N AがP D - 1を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N AがL A G 3を標的とする。いくつかの実施形態では、1つのs i R N Aまたはs d R N

40

50

AがPD-1を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCISHを標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がPD-1を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がLAG3を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCISHを標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がLAG3を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCISHを標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCBLBを標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がTIM3を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がPD-1を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がTIM3を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がLAG3を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がTIM3を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCISHを標的とする。いくつかの実施形態では、1つの*siRNA*または*sdRNA*がTIM3を標的とし、1つの*siRNA*または*sdRNA*がCBLBを標的とする。

10

#### 【1209】

上述のように、本発明の実施形態は、治療効果を増強するために遺伝子編集によって遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を提供する。本発明の実施形態は、1つまたは複数のタンパク質の発現の促進及び1つまたは複数のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、TIL集団へのヌクレオチド挿入(RNAまたはDNA)による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態はまた、TILを治療用集団に増殖させるための方法を提供し、この方法は、TILを遺伝子編集することを含む。TIL集団を遺伝的に改変するために使用できるいくつかの遺伝子編集技術があり、これらは本発明に従って使用するのに適している。

20

#### 【1210】

いくつかの実施形態では、方法は、TIL集団、例えば、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団及び/または第三の集団を遺伝子改変する方法を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝的に改変する方法は、1つまたは複数のタンパク質の産生または阻害(例えば、サイレンシング)のための遺伝子の安定した組み込みのステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝的に改変する方法は、エレクトロポレーションのステップを含む。エレクトロポレーション法は当技術分野で周知であり、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306、及び米国特許出願公開第2014/0227237A1号に記載されており、それぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第5,019,034号、同第5,128,257号、同第5,137,817号、同第5,173,158号、同第5,232,856号、同第5,273,525号、同第5,304,120号、同第5,318,514号、同第6,010,613号、及び同第6,078,490号に記載されているものなど、当技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法はパルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でTILを処理して、TILの規定及び制御された永久的または一時的な変化を変更、操作、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を持つ、少なくとも3つの単一のオペレーター制御の個別にプログラムされたDC電気パルスのシーケンスをTILに印加するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルスのシーケンスは、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：(1)少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つは、パルス振幅が互いに異なる、(2)少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つは、パルス幅が互いに異なる、(3)少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットにおける第1のパルス間隔は、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセッ

30

40

50

トにおける第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でTILを処理して、TILの規定及び制御された永久的または一時的な変化を変更、操作、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を持つ、少なくとも3つの単一のオペレーター制御の個別にプログラムされたDC電気パルスのシーケンスをTILに印加するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つは、パルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルス電場でTILを処理して、TILの規定及び制御された永久的または一時的な変化を変更、操作、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を持つ、少なくとも3つの単一のオペレーター制御の個別にプログラムされたDC電気パルスのシーケンスをTILに印加するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つは、パルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TIL中のポア形成を誘発するためにパルス電場でTILを処理するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を持つ、少なくとも3つの単一のオペレーター制御の個別にプログラムされたDC電気パルスのシーケンスをTILに印加するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルスのシーケンスは、以下の特徴のうちの一つ、二つ、または三つを有する：(1)少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つは、パルス振幅が互いに異なる、(2)少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つは、パルス幅が互いに異なる、(3)少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットにおける第1のパルス間隔は、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットにおける第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子改変する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションのステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法(リン酸カルシウムDNA沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス)は、当技術分野で知られており、Graham and van der Eb, *Virology* 1973, 52, 456-467、Wigler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 1373-1376、及びChen and Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 2745-2752、及び米国特許第5,593,875号に記載されており、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子改変する方法は、リポソームトランスフェクションのステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば1:1(w/w)カチオン性脂質Nのリポソーム製剤N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n,n,n-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)及び濾過水中のジオレイルホスフォチジルエタノールアミン(DOPE)は、当技術分野で知られており、Rose, et al., *Biotechniques* 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413-7417、ならびに米国特許第5,279,833号、5,908,635号、同第6,056,938号、同第6,110,490号、同第6,534,484号、及び同第7,687,070号に記載されており、これらのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子改変する方法は、米国特許第5,766,902号、同第6,025,337号、同第6,410,517号、同第6,475,994号、及び同第7,189,705号に記載される方法を使用するトランスフェクションのステップを含み、これらのそれぞれの開示は、参照に

10

20

30

40

50

より本明細書に組み込まれる。T I Lは、本明細書に記載の第1のT I L集団、第2のT I L集団及び/または第3のT I L集団であり得る。

【1211】

一実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子における二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。このようなプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することにより、つまり、ゲノム内の特定のDNA配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的化し、標的配置での二本鎖切断の生成を媒介することにより、正確なゲノム編集を可能にする。DNAの二本鎖切断は、続いて内因性修復機構を切断部位に動員し、非相同末端結合(NHEJ)または相同性指向修復(HDR)のいずれかによるゲノム編集を仲介する。したがって、切断を修復することにより、標的遺伝子産物を破壊する(例えば、サイレンシング、抑制、または増強する)挿入変異/欠失変異の導入をもたらす。

10

【1212】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様ヌクレアーゼ(TALEN)、及びCRISPR関連ヌクレアーゼ(例えば、CRISPR/Cas9)が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、DNA認識のモードに基づいて2つのカテゴリに大きく分類でき、ZFN及びTALENは、タンパク質とDNAの相互作用を介して特異的なDNA結合を達成するが、Cas9などのCRISPRシステムは、標的DNAと直接、及びタンパク質-DNA相互作用によって塩基対を形成する短いRNAガイド分子によって特定のDNA配列を標的とする。例えば、Cox et al., Nature Medicine, 2015, Vol. 21, No. 2を参照のこと。

20

【1213】

本発明のT I L増殖方法に従って使用され得る遺伝子編集方法の非限定的な例には、CRISPR方法、TALE方法、及びZFN方法が含まれ、これらは以下により詳細に記載される。一実施形態によれば、T I Lを治療集団に増殖させるための方法は、本明細書に記載の方法(例えば、Gen3プロセス)または米国特許出願公開番号US 2020/0299644 A1号及び同第US 2020/0121719 A1号、ならびに米国特許第10,925,900号(これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載される任意の実施形態に従って実行され得、本方法は、強化された治療効果を提供できるT I Lを生成するためにさらにCRISPR法、TALE法またはZFN法の1つまたは複数によってT I Lの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。一実施形態によれば、遺伝子編集されたT I Lは、それらをインビトロで改変されていないT I Lと比較することによって、例えば、改変されていないT I Lと比較してインビトロでエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、改善された治療効果について評価することができる。ある特定の実施形態では、方法は、CRISPR、TALE及び/またはZFN法を使用してT I L集団を遺伝子編集することを含む。

30

【1214】

本発明のいくつかの実施形態において、エレクトロポレーションが、CRISPR、TALEN、及びZFNシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムはフローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態での使用に適した適切なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のMaxCyte STXシステムである。Agile PulseシステムまたはBTX-Harvard Apparatusから入手可能なECM830、Cellaxes Elektra(Collectric icon)、Nucleofector(Lonza/Amaxa)、GenePulser MXcell(BIORAD)、iPorator-96(Primax)またはsiPORTer96(Ambion)など、本発明での使用に適する可能性がある代替の市販のエレクトロポレーション器具がいくつかある。本発明のいくつかの実施形態では

40

50

、エレクトロポレーションシステムは、残りのT I L 増殖方法と共に閉鎖無菌システムを形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、残りのT I L 増殖方法と共に閉鎖無菌システムを形成する。

【1215】

T I L を治療集団に増殖させる方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態（例えば、プロセスGen3）に従って、または米国特許出願公開番号US2020/0299644 A1及び同第US2020/0121719 A1号、ならびに米国特許第10,925,900号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、この方法は、CRISPR法（例えば、CRISPR/Cas9またCRISPR/Cpf1）による少なくとも一部のT I L で遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、T I L 増殖プロセス中のCRISPR法の使用は、治療用T I L 集団の少なくとも一部において、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させる。代替的に、T I L 増殖プロセス中のCRISPR法の使用は、治療用T I L 集団の少なくとも一部において、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増強させる。

10

【1216】

CRISPRは、「Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats（クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート）」の略である。遺伝子編集のためにCRISPRシステムを使用する方法は、本明細書ではCRISPR法とも称される。RNA及びCasタンパク質を組み込み、本発明に従って使用することができる3つの型のCRISPRシステムがある：I型、II型、及びIII型。II型CRISPR（Cas9で例示）は、最もよく特徴付けられたシステムの1つである。

20

【1217】

CRISPR技術は、バクテリアと古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然な防御メカニズムから適応された。これらの生物は、CRISPR由来のRNA及びCas9を含むさまざまなCasタンパク質を使用して、外来の侵入者のDNAを切り刻んで破壊することにより、ウイルスやその他の異物による攻撃を阻止する。CRISPRは、ヌクレオチド反復とスペーサーの存在という2つの異なる特徴を持つDNAの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、CRISPR領域全体に分布し、外来DNAの短いセグメント（スペーサー）が反復配列の間に散在している。II型CRISPR/Casシステムでは、スペーサーはCRISPRゲノム遺伝子座内に統合され、短いCRISPR RNA（crRNA）に転写及び処理される。これらのcrRNAは、トランス活性化crRNA（tracrRNA）にアニールし、Casタンパク質による病原性DNAの配列特異的な切断とサイレンシングを指示する。Cas9タンパク質による標的認識は、crRNA内の「シード」配列と、crRNA結合領域の上流の保存されたジヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列を必要とする。それによってCRISPR/Casシステムは、crRNAを再設計することにより、事実上いずれのDNA配列をも切断するように再標的化することができる。ネイティブシステムのcrRNA及びtracrRNAは、遺伝子工学で使用するために、約100ヌクレオチドの単一ガイドRNA（sgRNA）に簡略化することができる。CRISPR/Casシステムは、Cas9エンドヌクレアーゼ及び必要なcrRNAコンポーネントを発現するプラスミドの共送達により、ヒト細胞に直接移植することができる。Casタンパク質のさまざまなバリエーションを使用して、標的化の制限（例えば、Cpf1などのCas9のオルソログ）を減らすことができる。

30

40

【1218】

CRISPR法を介してT I L を永久的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2（TIM-3）、Cis h、TGF、PKA、CBL-B、PPP2CA

50

、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、及びBCORが含まれる。挙げられる【1219】

CRISPR法を介してTILを永久的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、及びIL-21が挙げられる。

【1220】

CRISPR法によって標的遺伝子配列の発現を変更するためのシステム、方法、及び組成物の例、及び本発明の実施形態に従って使用することができるものは、米国特許第8,697,359号、同第8,993,233号、同第8,795,965号、同第8,771,945号、同第8,889,356号、同第8,865,406号、同第8,999,641号、同第8,945,839号、同第8,932,814号、同第8,871,445号、同第8,906,616号、及び同第8,895,308号に記載されており、これらのそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。CRISPR/Cas9及びCRISPR/Cpf1発現用プラスミドなど、CRISPRメソッドを実行するためのリソースは、GenScriptなどの企業から市販されている。

【1221】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、TIL集団の遺伝子改変は、米国特許第9790490号に記載され、その開示は参照により本明細書に組み込まれる、CRISPR/Cpf1システムを使用して実施され得る。

【1222】

TILを治療集団に増殖させる方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態（例えば、プロセス2A）に従って、または米国特許出願公開番号US2020/0299644A1及び同第US2020/0121719A1号、ならびに米国特許第10,925,900号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、この方法は、TALE法による少なくとも一部のTILで遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、TIL増殖プロセス中のTALE法の使用は、治療用TIL集団の少なくとも一部において、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させる。代替的に、TIL増殖プロセス中のTALE法の使用は、治療用TIL集団の少なくとも一部において、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増強させる。

【1223】

TALEは「Transcription Activator-Like Effector（転写アクチベーター様エフェクター）」タンパク質の略で、TALEN（「Transcription Activator-Like Effector Nucleases（転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ）」）を含む。遺伝子編集のためにTALEシステムを使用する方法はまた、本明細書においてTALE法と称され得る。TALEは、植物病原性バクテリア属Xanthomonasに由来する天然のタンパク質であり、それぞれが1つの塩基対を認識する一連の33~35アミノ酸反復ドメインから構成されるDNA結合ドメインを含んでいる。TALEの特異性は、繰り返し可変2残基（repeat-variable di-residues）（RVD）として知られる2つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーTALEリピートは、連続したDNA配列を認識するために結合される。DNA結合ドメインの特定のRVDは、標的遺伝子座の塩基を認識し、予測可能なDNA結合ドメインを組み立てるための構

10

20

30

40

50

造的特徴を提供する。T A L EのDNA結合ドメインは、I I S F o k Iエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合され、標的可能なT A L Eヌクレアーゼを作成する。部位特異的変異を誘発するために、14~20塩基対のスペーサー領域で区切られた2つの個別のT A L E NアームがF o k Iモノマーを近接させて二量体化し、標的の二本鎖切断を生成する。

#### 【1224】

さまざまなアセンブリ方法を利用したいくつかの大規模で体系的な研究により、T A L Eリピートを組み合わせ、事実上いかなるユーザー定義の配列をも認識できることが示されている。カスタム設計されたT A L Eアレイは、C e l l e c t i s B i o r e s e a r c h ( P a r i s , F r a n c e )、T r a n s p o s a g e n B i o p h a r m a c e u t i c a l s ( L e x i n g t o n , K Y , U S A ) 及びL i f e T e c h n o l o g i e s ( G r a n d I s l a n d , N Y , U S A ) から市販されている。本発明での使用に適したT A L E及びT A L E N法は米国特許出願公開第US2011/0201118 A1号、同第US2013/0117869 A1号、同第US2013/0315884 A1号、同第US2015/0203871 A1号、及び同第US2016/0120906 A1号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【1225】

T A L E法を介してT I Lを永久的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 ( T I M - 3 )、C i s h、T G F、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及びB C O Rが挙げられる

20

#### 【1226】

T A L E法を介してT I Lを永久的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及びI L - 2 1が挙げられる。

30

#### 【1227】

T A L E法によって標的遺伝子配列の発現を変更するためのシステム、方法、及び組成物の例であって、本発明の実施形態に従って使用され得るものは、参照により組み込まれる米国特許第8,586,526号に記載されている。

#### 【1228】

T I Lを治療集団に増殖させる方法は、本明細書に記載の方法の任意の実施形態(例えば、G e n 3)に従って、または米国特許出願公開番号US2020/0299644 A1及び同第US2020/0121719 A1号、ならびに米国特許第10,925,900号に記載されており、これらの各開示は参照により本明細書に組み込まれ、この方法は、ジンクフィンガー及びジンクフィンガーヌクレアーゼ法による少なくとも一部のT I Lで遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、T I L増殖プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、治療用T I L集団の少なくとも一部において、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させる。代替的に、T I L増殖プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、治療用T I L集団の少なくとも一部において、1つまたは複数の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増強させる。

40

#### 【1229】

50

個々のジンクフィンガーには、保存された配置で約30個のアミノ酸が含まれている。α-ヘリックスの表面にあるいくつかのアミノ酸は、通常、さまざまなレベルの選択性で、DNAの主溝の3bpに接触する。ジンクフィンガーには2つのタンパク質ドメインがある。第1のドメインは、真核生物の転写因子を含み、ジンクフィンガーを含むDNA結合ドメインである。第2のドメイン、ForkI制限酵素を含み、DNAの触媒的切断に関与するはヌクレアーゼドメインである。

#### 【1230】

個々のZFNのDNA結合ドメインは通常3~6個の個々のジンクフィンガーリピートを含み、それぞれ9~18塩基対を認識できる。ジンクフィンガードメインが意図した標的部位に特異的である場合、理論的には、合計18塩基対を認識する3フィンガーZFNのペアでさえ、哺乳類ゲノムの単一の遺伝子座を標的とすることができる。新しいジンクフィンガーアレイを生成する1つの方法は、既知の特異性のより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、それぞれが3塩基対のDNA配列を認識できる3つの別個のジンクフィンガーを組み合わせ、9塩基対の標的部位を認識できる3フィンガーアレイを生成するものである。代替的に、オリゴマープールエンジニアリング(OPEN)などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存の相互作用を考慮したランダム化されたライブラリから新しい亜鉛フィンガーアレイを選択することができる。改変されたジンクフィンガーは市販されており、Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA)は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)と提携して、ジンクフィンガー構築用の独自プラットフォーム(Composer (登録商標))を開発した。

10

20

#### 【1231】

ジンクフィンガー法を介してTILを永久的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、CISH、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOX P3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、及びBCORが挙げられる

30

#### 【1232】

ジンクフィンガー法を介してTILを永久的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、及びIL-21が挙げられる。

#### 【1233】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変更するためのシステム、方法、及び組成物の例であって、本発明の実施形態に従って使用され得るものは、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,746,838号、同第6,794,136号、同第6,824,978号、同第6,866,997号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、同第7,030,215号、同第7,220,719号、同第7,241,573号、同第7,241,574号、同第7,585,849号、同第7,595,376号、同第6,903,185号、及び同第6,479,626号に記載される。

40

#### 【1234】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変更するためのシステム、方法、

50

及び組成物のその他の例であって、本発明の実施形態に従って使用され得るものは、Beane, et al., Mol. Therapy, 2015, 23 1380-1390に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1235】

いくつかの実施形態では、TILは、高親和性T細胞受容体(TCR)、例えば、MAGE-1、HER2、もしくはNY-ESO-1、または腫瘍関連細胞表面分子(例えば、メソセリン)または系列限定細胞表面分子(例えば、CD19)に結合するキメラ抗原受容体(CAR)などの腫瘍関連抗原を標的とするTCRを含むがこれに限定されない追加の機能を含むように任意に遺伝子操作される。ある特定の実施形態では、方法は、高親和性T細胞受容体(TCR)、例えば、MAGE-1、HER2、またはNY-ESO-1、または腫瘍関連細胞表面分子(例えば、メソセリン)または系統限定細胞表面分子(例えば、CD19)に結合するキメラ抗原受容体(CAR)などの腫瘍関連抗原を標的とするTCRを含むように、TILの集団を遺伝子操作することを含む。適切に、TILの集団は、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団及び/または第3の集団であり得る。

10

【1236】

K. TIL製造用の閉鎖システム

本発明は、TIL培養プロセス中の閉鎖システムの使用を提供する。このような閉鎖システムは、防止を可能にする、及び/または微生物汚染を減らし、より少ないフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖システムは2つの容器を使用する。

20

【1237】

そのような閉鎖システムは、当技術分野で周知であり、例えば、<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>及び<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>で確認できる。

【1238】

滅菌接続デバイス(STCD)は、互換性のある2つのチューブ間に滅菌接合部を作り出す。この手順により、さまざまな容器とチューブ径の無菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖システムは、例えば、実施例12に記載されるように、ルアーロック及びヒートシールシステムを含む。いくつかの実施形態では、閉鎖システムは、システムの無菌性及び閉鎖性を維持するために、無菌条件下で注射器を介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例12に記載の閉鎖システムを使用する。いくつかの実施形態では、TILは、実施例12のセクション「最終製剤及び充填」に記載の方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

30

【1239】

いくつかの実施形態では、閉鎖システムは、腫瘍断片が得られた時点から、TILが患者への投与または凍結保存の準備が整うまで、1つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、第1の容器は閉鎖G容器であり、TIL集団は遠心分離され、第1の閉鎖G容器を開くことなく輸液バッグに移される。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、輸液バッグはハイポサーモソル含有輸液バッグである。閉鎖システムまたは閉鎖TIL細胞培養システムは、一度腫瘍サンプル及び/または腫瘍の断片が追加されると、システムは外部から密閉され、細菌、真菌、及び/またはその他の微生物汚染の侵害のない閉鎖環境を形成することを特徴とする。

40

【1240】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の減少は、約5%~約100%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の減少は、約5%~約95%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の減少は、約5%~約90%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の減少は、約10%~約90%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の減少は、約15%~約85%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の減少は、約5%、

50

約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 97%、約 98%、約 99%、または 100%である。

【1241】

閉鎖システムにより、微生物汚染のない及び/または大幅に減少した T I L 増殖を可能にする。

【1242】

さらに、T I L 細胞培養環境の pH、二酸化炭素分圧、酸素分圧は、細胞の培養に伴ってそれぞれ変化する。そのため、細胞培養に適した培地を循環させていても、T I L の増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に維持する必要がある。そのためには、閉鎖環境の培養液中の pH、二酸化炭素分圧、酸素分圧などの物理的要因をセンサーで監視し、その信号を使用して培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御し、培養液の変化に応じて、閉鎖環境のガス分圧をリアルタイムで調整し、細胞培養環境を最適化することが望ましい。いくつかの実施形態において、本発明は、閉鎖環境への入口に、閉鎖環境の pH、二酸化炭素分圧及び酸素分圧を測定し、最適化する監視装置を備えたガス交換器を組み込む閉鎖細胞培養システムを提供し、モニタリング装置からの信号に基づいてガス濃度を自動的に調整することにより、細胞培養環境を最適化する。

【1243】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力は、例えば圧力維持装置によって変化させることができ、したがって、空間が正圧状態での T I L の増殖に適していることを保証するか、または負圧状態での流体の浸出を促進し、したがって、細胞増殖を促進させる。さらに、断続的に負圧を印加することにより、密閉環境の容積の一時的な収縮により、密閉環境内の循環液を均一かつ効率的に置換することができる。

【1244】

いくつかの実施形態では、T I L の増殖に最適な培養成分を置換または添加することができ、I L - 2 及び/または O K T 3、ならびに組み合わせなどを含む因子も添加することができる。

【1245】

L. 任意の T I L の凍結保存

バルク T I L 集団（例えば、第 2 の T I L の集団）または増殖された T I L 集団（例えば、第 3 の T I L の集団）のいずれかを任意に凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療用 T I L 集団に対して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第 2 の増殖後に採取された T I L に対して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び/または図 1 C 及び/または図 1 E 及び/または図 1 F 及び/または図 1 G）の例示的なステップ F での T I L に対して行われる。いくつかの実施形態では、T I L は輸液バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、T I L は、輸液バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、T I L は凍結保存され、輸液バッグには入れられない。いくつかの実施形態では、凍結保存媒体を使用して凍結保存を実施する。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含む。これは一般に、T I L 集団を凍結溶液、例えば、85%補体不活化 A B 血清及び 15%ジメチルスルホキシド（DMSO）に入れることによって達成される。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、-80 で 24 時間保存し、必要に応じて、凍結保存用の気体窒素冷凍庫に移される。S a d e g h i , e t a l . , A c t a O n c o l o g i c a 2 0 1 3 , 5 2 , 9 7 8 - 9 8 6 を参照。

【1246】

適切な時点で、細胞を冷凍庫から取り出し、37 の水浴でおよそ 4 / 5 の溶液が解凍されるまで解凍する。細胞は一般に完全培地に再懸濁され、任意に 1 回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍された T I L は、当技術分野で知られているように、生存率について計数及び評価することができる。

10

20

30

40

50

## 【1247】

いくつかの実施形態では、TILの集団は、CS10凍結保存培地(CryoStor 10、BioLife Solutions)を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILの集団は、ジメチルスルホキシド(DMSO)を含む凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILの集団は、1:1(vol:vol)のCS10と細胞培養培地の比率を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILの集団は、約1:1(体積:体積)のCS10と細胞培養培地の比率を使用して凍結保存され、さらに追加のIL-2を含む。

## 【1248】

上述、及び、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に提供されるステップA~Eに例示されるように、凍結保存は、TIL増殖プロセス全体の多くの時点で行われ得る。いくつかの実施形態では、(例えば、図1のステップD(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)により提供される)第2の増殖後の増殖されたTIL集団を凍結保存することができる。凍結保存は一般に、TIL集団を凍結溶液、例えば、85%補体不活化AB血清及び15%ジメチルスルホキシド(DMSO)に入れることによって達成される。溶液中の細胞を極低温バイアルに入れ、-80で24時間保存し、必要に応じて、凍結保存用の気体窒素冷凍庫に移される。Sadeghi, et al., Acta Oncologica 2013, 52, 978-986を参照。いくつかの実施形態では、TILは5%DMSO中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、細胞培養培地に加えて5%DMSO中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、実施例Dで提供される方法に従って凍結保存される。

## 【1249】

必要な時点で、細胞を冷凍庫から取り出し、37の水浴でおおよそ4/5の溶液が解凍されるまで解凍する。細胞は一般に完全培地に再懸濁され、任意に1回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたTILは、当技術分野で知られているように、生存率について計数及び評価することができる。

## 【1250】

場合によっては、以下で説明するプロトコルを使用して、ステップBのTIL集団をすぐに凍結保存することができる。代替的に、バルクTIL集団をステップC及びステップDに供し、ステップDの後に凍結保存することができる。同様に、療法に遺伝子改変されたTILが使用される場合、ステップBまたはステップDのTIL集団を、適切な療法のために遺伝子改変に供することができる。

## 【1251】

## M. 増殖TILの表現型の特徴

いくつかの実施形態では、TILは、増殖後、本明細書及び実施例に記載されるものを含め、多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップBにおける第1の増殖後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップCによる移行中に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップCによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップDによる第2の増殖後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップDによる2回以上の増殖後に分析される。

## 【1252】

いくつかの実施形態では、マーカーは、CD8及びCD28からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CD8の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、CD28の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、CD8及び/またはCD28の発現は、他のプロセスと比較して、例えば、図1(特に、例えば図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に提供される2Aプロセスと

比較して、本発明のプロセス（例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）に提供される Gen 3 プロセス）に従って産生される T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、C D 8 の発現は、他のプロセスと比較して、例えば、図 1（特に、例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセス（例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）に提供される Gen 3 プロセス）に従って産生される T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、C D 2 8 の発現は、他のプロセスと比較して、例えば、図 1（特に、例えば図 1 A）に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセス（例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）に提供される Gen 3 プロセス）に従って産生される T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、高い C D 2 8 発現は、より若く、より持続的な T I L 表現型を示す。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の調節マーカーの発現が測定される。

10

#### 【 1 2 5 3 】

いくつかの実施形態では、C D 8 及び / または C D 2 8 発現に基づく、第 1 の T I L 集団、第 2 の T I L 集団、第 3 の T I L 集団、または採取された T I L 集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を増殖させる方法のステップのいずれの間にも実施されない。

#### 【 1 2 5 4 】

いくつかの実施形態では、中央記憶細胞の割合（%）は、他のプロセスと比較して、例えば、図 1（特に、例えば図 1 A）に提供される 2 A プロセスと比較して、本発明のプロセス（例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）に提供される Gen 3 プロセス）に従って産生される T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、中央記憶細胞の記憶マーカーは、C C R 7 及び C D 6 2 L からなる群から選択される。

20

#### 【 1 2 5 5 】

いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び / または C D 8 + T I L メモリサブセットは、異なるメモリサブセットに分割することができる。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び / または C D 8 + T I L はナイーブ（C D 4 5 R A + C D 6 2 L +）T I L を構成する。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び / または C D 8 + T I L は中央記憶（C M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L +）T I L を構成する。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び / または C D 8 + T I L は、エフェクターメモリー（E M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L -）T I L を構成する。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び / または C D 8 + T I L は、R A + エフェクターメモリー / エフェクター（T E M R A / T E F F、C D 4 5 R A + C D 6 2 L +）T I L を構成する。いくつかの実施形態では、C D 4 + 集団と比較して C D 8 + の % がより高い。いくつかの実施形態では、T I L は、グランザイム B、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択される 1 つ以上のマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、T I L はグランザイム B を発現する。いくつかの実施形態では、T I L はパーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、T I L はグラニュライシンを発現する。

30

40

#### 【 1 2 5 6 】

いくつかの実施形態では、サイトカイン放出アッセイを使用して、再刺激された T I L をサイトカイン放出について評価することもできる。いくつかの実施形態では、T I L を、インターフェロン - （I F N - ）分泌について評価することができる。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は、例えば図 1（特に、例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）に提供されるステップ D の後の、急速な第 2 の増殖後に E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、T I L の健康は、I F N - ガンマ（I F N - ）分泌によって測定される。いくつ

50

かの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は活性TILを示す。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  産生の効力アッセイが使用される。IFN- $\gamma$  産生は、細胞毒性の可能性の別の尺度である。IFN- $\gamma$  産生は、CD3、CD28、及びCD137/4-1BBに対する抗体で刺激されたTILの培地中のサイトカインIFN- $\gamma$  のレベルを決定することによって測定することができる。これらの刺激されたTILからの培地のIFN- $\gamma$  レベルは、IFN- $\gamma$  放出を測定することによって決定することができる。いくつかの実施形態では、例えば、図1（特に、例えば図1A）で提供される2AプロセスのステップDと比較して、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に提供されるGen3プロセスのステップDにおけるTIL中のIFN- $\gamma$  産生の増加は、ステップDのTILの細胞毒性の可能性の増加を示している。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は、1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍、またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は1倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は2倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は3倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は4倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は5倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、Quantikine ELISAキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、エクスピボでのTILで測定される。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、例えば図1Bの方法を含む本発明の方法によって生成されたTILを含む、エクスピボでのTILで測定される。

10

#### 【1257】

20

いくつかの実施形態では、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍、または以上のIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも1倍多いIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも2倍多いIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも3倍多いIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも4倍多いIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも5倍多いIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。

30

#### 【1258】

いくつかの実施形態では、少なくとも100 pg/ml ~ 約1000 pg/ml、またはそれ以上のIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1Gの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されるTILである。一部の実施形態では、少なくとも200 pg/ml、少なくとも250 pg/ml、少なくとも300 pg/ml、少なくとも350 pg/ml、少なくとも400 pg/ml、少なくとも450 pg/ml、少なくとも500 pg/ml、少なくとも550 pg/ml、少なくとも600 pg/ml、少なくとも650 pg/ml、少なくとも700 pg/ml、少なくとも750 pg/ml、少なくとも800 pg/ml、少なくとも850 pg/ml、少なくとも900 pg/ml、少なくとも950 pg/ml、または少なくとも1000 pg/ml、またはそれ以上のIFN- $\gamma$  分泌が可能なTILは、例えば図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/ま

40

50



















## 【 1 2 6 2 】

いくつかの実施形態では、本発明の増殖方法は、増殖されていない T I L 集団と比較して、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または 1 G に提供される T I L を含む、インピトロで増加したグランザイム B 分泌を示す増殖された T I L 集団を生成する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 倍 ~ 5 0 倍、またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、 I F N - 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍、少なくとも 5 0 倍、またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 2 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 3 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 4 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 5 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 6 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 7 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 8 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 9 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 0 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 2 0 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 3 0 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 4 0 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の増殖された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、増殖されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 5 0 倍増加する。

10

20

30

## 【 1 2 6 3 】

いくつかの実施形態では、 I F N - 分泌と比較して、少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍、またはそれ以上の低いレベルの T N F - (すなわち、T N F アルファ) 分泌が可能な T I L は、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、 I F N - 分泌と比較して、少なくとも 1 倍の低いレベルの T N F - (すなわち、T N F アルファ) 分泌が可能な T I L は、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、 I F N - 分泌と比較して、少なくとも 2 倍の低いレベルの T N F - (すなわち、T N F アルファ) 分泌が可能な T I L は、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、 I F N - 分泌と比較して、少なくとも 3 倍の低いレベルの T N F - (すなわち、T N F アルファ) 分泌が可能な T I L は、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / また

40

50



いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  及びグランザイム B のレベルを測定して、例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される TIL の表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  のレベルを測定して、例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される TIL の表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  のレベルを測定して、例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される TIL の表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  、グランザイム B 及び TNF- $\alpha$  のレベルを測定して、例えば図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生される TIL の表現型特性を決定する。

10

## 【1266】

Tリンパ球とBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られてはいるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント、すなわち V (可変)、D (多様性)、J (結合)、及び C (一定) は、免疫グロブリンと T 細胞受容体 (TCR) の結合特異性と下流のアプリケーションを決定する。本発明は、T 細胞レパトリーの多様性を示し、増加させる TIL を生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって得られる TIL は、T 細胞レパトリーの多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られる TIL は、新たに収集された TIL 及び / または例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G) で具現化されるもの以外の方法を含む、本明細書に提供されるもの以外の他の方法を使用して調製された TIL と比較して、T 細胞レパトリーの多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られる TIL は、新たに収集された TIL 及び / または図 1 (特に、例えば、図 1 A) に例示される、プロセス 2 A と称される方法を使用して調製された TIL と比較して、T 細胞レパトリーの多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第 1 の増殖で得られた TIL は、T 細胞レパトリーの多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリンの多様性及び / または T 細胞受容体の多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は T 細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択される T 細胞受容体のうちの 1 つにある。いくつかの実施形態では、T 細胞受容体 (TCR) アルファ及び / またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T 細胞受容体 (TCR) アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T 細胞受容体 (TCR) ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCR (すなわち、TCR  $\alpha$  /  $\beta$ ) の発現が増加する。

20

30

## 【1267】

いくつかの実施形態では、TIL の活性化及び枯渇は、1 つまたは複数のマーカーを検査することによって決定することができる。いくつかの実施形態では、活性化及び枯渇は、多色フローサイトメトリーを使用して決定することができる。いくつかの実施形態では、マーカーの活性化及び枯渇には、CD 3、PD-1、2B4 / CD 244、CD 8、CD 25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD 194 / CCR 4、CD 4、TIGIT、CD 183、CD 69、CD 95、CD 127、CD 103、及び / または LAG-3 からなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、マーカーの活性化及び枯渇には、BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki 67、LAG-3、PD-1、TIGIT、及び / または TIM-3 からなる群から選択される 1 つまたは複数のマーカーを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、マーカーの活性化及び枯渇には、BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki 67、LAG-3、CD 103+ / CD 69+、CD 103+ / CD 69-、P

40

50

D - 1、T I G I T、及び/またはT I M - 3からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、T細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために、T細胞マーカー（活性化及び枯渇マーカーを含む）を決定及び/または分析することができる。いくつかの実施形態では、T細胞マーカーは、T I G I T、C D 3、F o x P 3、T i m - 3、P D - 1、C D 1 0 3、C T L A - 4、L A G - 3、B T L A - 4、I C O S、K i 6 7、C D 8、C D 2 5、C D 4 5、C D 4、及び/またはC D 5 9からなる群から選択される1つまたは複数のマーカーを含み得るが、これらに限定されない。

【1268】

いくつかの実施形態では、凍結保存後に表現型の特徴付けを調べる。

10

【1269】

N. 追加のプロセス実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療用T I L集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、（a）対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のT I L集団を得ることと、（b）I L - 2及びO K T - 3を含む第1の細胞培養培地で第1のT I L集団を培養して、第2のT I L集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第2のT I Lの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のT I L集団は、第1のT I L集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、（c）第2のT I L集団を、I L - 2、O K T - 3、及び外因性抗原提示細胞（A P C）を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のT I L集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のT I L集団を得るために約1～10日間実施され、第3のT I L集団は治療用T I L集団である、急速な第2の増殖を実施することと、（d）ステップ（c）から得られた治療用T I L集団を採取することと、を含む。

20

【1270】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療用T I L集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、（a）対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のT I L集団を得ることと、（b）I L - 2、ならびにI L - 2及びO K T - 3が補足された培養培地中で培養された抗原提示細胞（A P C）の培地から得た培養上清を含む第1の細胞培養培地で第1のT I L集団を培養して、第2のT I L集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の細胞培養培地はA P Cで補足されておらず、第1の増殖のプライミングは第2のT I Lの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のT I L集団は、第1のT I L集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、（c）第2のT I L集団を、I L - 2、O K T - 3、及び外因性抗原提示細胞（A P C）を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のT I L集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のT I L集団を得るために約1～10日間実施され、第3のT I L集団は治療用T I L集団である、急速な第2の増殖を実施することと、（d）ステップ（c）から得られた治療用T I L集団を採取することと、を含む。

30

40

【1271】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療用T I L集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、（a）対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のT I L集団を得ることと、（b）I L - 2、O K T - 3、及び外因性抗原提示細胞（A P C）を含む第1の細胞培養培地で第1のT I L集団を培養して、第2のT I L集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第2のT I Lの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のT I L集団は、第1のT I L集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、（c）第2のT I L

50

集団を、IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された培養培地中で培養されたAPCの培地から得た培養上清を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の細胞培養培地はAPCが補足されておらず、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～10日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d)ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【1272】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a)対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b)IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された培養培地中で培養された第1の抗原提示細胞(APC)の培地から得た第1の培養上清を含む第1の細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の細胞培養培地はAPCで補足されておらず、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c)第2のTIL集団を、IL-2ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された第2のAPCの培養物から得た第2の培養上清を含む、第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の細胞培養培地は、APCが補足されておらず、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～10日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d)ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【1273】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a)対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b)IL-2及びOKT-3を含む第1の細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c)第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～8日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d)ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【1274】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a)対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b)IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された抗原提示細胞(APC)の培養物から得た培養上清を含む第1の細胞培養培地で、第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の細胞培養培地はAPCで補足されておらず、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c)第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生す

10

20

30

40

50

ることにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～8日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d)ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【1275】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a)対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b)外因性抗原提示細胞(APC)、IL-2及びOKT-3を含む第1の細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c)第2のTIL集団を、IL-2ならびにIL-2及びOKT-3が補足された培養培地中で培養されたAPCの培地から得た培養上清を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の細胞培養培地はAPCが補足されておらず、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～8日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d)ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【1276】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a)対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b)IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された第1の抗原提示細胞(APC)の培養物から得た第1の培養上清を含む第1の細胞培養培地で、第1のTIL集団を培養して第2のTIL集団を産生することによって、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の細胞培養培地はAPCで補足されておらず、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約1～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c)第2のTIL集団を、IL-2ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された第2のAPCの培養物から得た第2の培養上清を含む、第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の細胞培養培地は、APCが補足されておらず、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～8日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d)ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

【1277】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a)対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b)IL-2及びOKT-3を含む第1の細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約1～7日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c)第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約1～11日間実施され、第3のTIL集団は治療用T

IL 集団である、急速な第 2 の増殖を実施することと、( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 TIL 集団を採取することと、を含む。

【 1 2 7 8 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( TIL ) を治療用 TIL 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、( a ) 対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を得ることと、( b ) IL - 2 及び OKT - 3 を含む第 1 の細胞培養培地で第 1 の TIL 集団を培養して、第 2 の TIL 集団を産生することにより、第 1 の増殖のプライミングを実施することと、( c ) 第 2 の TIL 集団を、IL - 2、OKT - 3 及び外因性抗原提示細胞 ( APC ) を含む第 2 の細胞培養培地と接触させて、第 3 の TIL 集団を産生することにより、急速な第 2 の増殖を実施することと、( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 TIL 集団を採取することと、を含む。

10

【 1 2 7 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( TIL ) を治療用 TIL 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、( a ) 対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を得ることと、( b ) IL - 2、ならびに IL - 2 及び OKT - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された抗原提示細胞 ( APC ) の培養物から得た培養上清を含む第 1 の細胞培養培地で、第 1 の TIL 集団を培養して、第 2 の TIL 集団を産生することにより、第 1 の増殖のプライミングを実施することと、( c ) 第 2 の TIL 集団を、IL - 2、OKT - 3 及び外因性抗原提示細胞 ( APC ) を含む第 2 の細胞培養培地と接触させて、第 3 の TIL 集団を産生することにより、急速な第 2 の増殖を実施することと、( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 TIL 集団を採取することと、を含む。

20

30

【 1 2 8 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( TIL ) を治療用 TIL 集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、( a ) 対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を得ることと、( b ) 外因性抗原提示細胞 ( APC )、IL - 2 及び OKT - 3 が補足された第 1 の細胞培養培地で、第 1 の TIL 集団を培養して、第 2 の TIL 集団を産生することにより、第 1 の増殖のプライミングを実施することと、( c ) 第 2 の TIL 集団を、IL - 2 ならびに IL - 2 及び OKT - 3 が補足された培養培地中で培養された APC の培地から得た培養上清を含む第 2 の細胞培養培地と接触させて、第 3 の TIL 集団を産生することにより、急速な第 2 の増殖を実施することと、( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 TIL 集団を採取することと、を含む。

40

【 1 2 8 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 ( TIL ) を治療用 TIL 集団

50

に増殖させるための方法を提供し、本方法は、(a) 対象から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、(b) IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された第1の抗原提示細胞(APC)の培養物から得た第1の培養上清を補足した第1の細胞培養培地で、第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の細胞培養培地はAPCで補足されておらず、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約7日または8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(c) 第2のTIL集団を、IL-2ならびにIL-2及びOKT-3が補足された培養培地中で培養された第2のAPCの培地から得た第2の培養上清を含む、第2の細胞培養培地と接触させて、第3のTIL集団を産生することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の細胞培養培地は、APCが補足されておらず、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約8~10日間実施され、第3のTIL集団は治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(d) ステップ(c)から得られた治療用TIL集団を採取することと、を含む。

10

#### 【1282】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖のステップが複数のステップに分割されて培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供し、前記培養のスケールアップは、(1) 第1の容器、例えば、G-REX 100MCS容器中で、約2~4日間、小規模培養で第2のTIL集団を培養することにより急速な第2の増殖を実施し、次いで(2) 小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-REX 500MCS容器に移し、第2の容器において、小規模培養からの第2のTIL集団を、約4~8日間、より大規模な培養で培養することによる。いくつかの実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウトを達成する：(1) 第1の容器、例えば、G-REX 100MCS容器中で、約3~4日間、第1の小規模培養で第2のTIL集団を培養することにより急速な第2の増殖を実施し、次いで(2) 第1の小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが一緒である、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器中へ移動及び割り当て、各第2の容器において、係る第2の容器に移動された第1の小規模培養からの第2のTIL集団の一部を、約4~8日間、第2の小規模培養で培養する。いくつかの実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウトを達成する：(1) 第1の容器、例えば、G-REX 100MCS容器またはG-REX 10M容器中で、約3~4日間、第1の小規模培養で第2のTIL集団を培養することにより急速な第2の増殖を実施し、次いで(2) 第1の小規模培養からの第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが一緒である、5個の第2の容器中へ移動及び割り当て、各第2の容器において、係る第2の容器に移動された第1の小規模培養からの第2のTIL集団の一部を、約6日または7日間、第2の小規模培養で培養する。いくつかの実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成する：(1) 第1の容器、例えば、G

20

30

40

50

- R E X 1 0 0 M C S 容器中で、約 3 ~ 4 日間、第 1 の小規模培養で第 2 の T I L 集団を培養することにより急速な第 2 の増殖を実施し、次いで ( 2 ) 第 1 の小規模培養からの第 2 の T I L 集団を、第 1 の容器よりもサイズが大きい、2 , 3 または 4 個の第 2 の容器中、例えば、G - R E X 5 0 0 M C S 容器へ移動及び割り当て、各第 2 の容器において、係る第 2 の容器に移動された第 1 の小規模培養からの第 2 の T I L 集団の一部を、約 5 日 ~ 7 日間、大規模培養で培養する。

【 1 2 8 3 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) において、第 1 の T I L 集団を、外因性抗原提示細胞 ( A P C ) をさらに含む第 1 の培養培地と接触させることによって、一次の第 1 の増殖が行われるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供し、ステップ ( c ) における第 2 の培養培地中の A P C の数が、ステップ ( b ) における第 1 の培養培地中の A P C の数よりも多い。

10

【 1 2 8 4 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( c ) において第 2 の培養培地に追加の外因性 A P C が補足されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 8 5 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 2 0 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 2 0 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【 1 2 8 6 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 1 0 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 1 0 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 8 7 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 9 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 9 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【 1 2 8 8 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 8 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 8 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 8 9 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 7 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 7 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【 1 2 9 0 】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 6 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 6 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 2 9 1 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数の、ステップ ( b ) で添加される A P C の数に対する比率が、1 . 1 : 1 ~ 5 : 1 の範囲、または約 1 . 1 : 1 ~ 約 5 : 1 の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに

50

に記載の方法を提供する。

【1292】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~4:1の範囲、または約1.1:1~約4:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1293】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~3:1の範囲、または約1.1:1~約3:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1294】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比が、1.1:1~2.9:1の範囲、または約1.1:1~約2.9:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1295】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.8:1の範囲、または約1.1:1~約2.8:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落の

20

【1296】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.7:1の範囲、または約1.1:1~約2.7:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1297】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.6:1の範囲、または約1.1:1~約2.6:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落の

30

【1298】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.5:1の範囲、または約1.1:1~約2.5:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1299】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.4:1の範囲、または約1.1:1~約2.4:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落の

40

【1300】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.3:1の範囲、または約1.1:1~約2.3:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1301】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.2:1の範囲、または約1.1:1~約2.2:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落の

50

いずれかに記載の方法を提供する。

【1302】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2.1:1の範囲、または約1.1:1~約2.1:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1303】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1~2:1の範囲、または約1.1:1~約2:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1304】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~10:1の範囲、または約2:1~約10:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1305】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~5:1の範囲、または約2:1~約5:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1306】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~4:1の範囲、または約2:1~約4:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1307】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~3:1の範囲、または約2:1~約3:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1308】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.9:1の範囲、または約2:1~約2.9:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1309】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.8:1の範囲、または約2:1~約2.8:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1310】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.7:1の範囲、または約2:1~約2.7:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1311】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.6:1の範囲、または約2:1~約2.6:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

50

に記載の方法を提供する。

【1312】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.5:1の範囲、または約2:1~約2.5:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1313】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.4:1の範囲、または約2:1~約2.4:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1314】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.3:1の範囲、または約2:1~約2.3:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1315】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.2:1の範囲、または約2:1~約2.2:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1316】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1~2.1:1の範囲、または約2:1~約2.1:1の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1317】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、2:1または約2:1であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1318】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数の、ステップ(b)で添加されるAPCの数に対する比率が、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、1.6:1、1.7:1、1.8:1、1.9:1、2:1、2.1:1、2.2:1、2.3:1、2.4:1、2.5:1、2.6:1、2.7:1、2.8:1、2.9:1、3:1、3.1:1、3.2:1、3.3:1、3.4:1、3.5:1、3.6:1、3.7:1、3.8:1、3.9:1、4:1、4.1:1、4.2:1、4.3:1、4.4:1、4.5:1、4.6:1、4.7:1、4.8:1、4.9:1、もしくは5:1であるか、または約それらの数であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1319】

他の実施形態では、本発明は、一次第1の増殖で添加されるAPCの数が、 $1 \times 10^8$ 、 $1.1 \times 10^8$ 、 $1.2 \times 10^8$ 、 $1.3 \times 10^8$ 、 $1.4 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^8$ 、 $1.6 \times 10^8$ 、 $1.7 \times 10^8$ 、 $1.8 \times 10^8$ 、 $1.9 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $2.2 \times 10^8$ 、 $2.3 \times 10^8$ 、 $2.4 \times 10^8$ 、 $2.5 \times 10^8$ 、 $2.6 \times 10^8$ 、 $2.7 \times 10^8$ 、 $2.8 \times 10^8$ 、 $2.9 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $3.1 \times 10^8$ 、 $3.2 \times 10^8$ 、 $3.3 \times 10^8$ 、 $3.4 \times 10^8$ または $3.5 \times 10^8$  APCであるか、約それらのAPCの数であり、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数が、 $3.5 \times 10^8$ 、 $3.6 \times 10^8$ 、 $3.7 \times 10^8$ 、 $3.8 \times 10^8$ 、 $3.9 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $4.1 \times 10^8$ 、 $4.2 \times 10^8$ 、 $4.3 \times 10^8$ 、 $4.4 \times 10^8$ 、4

50

$1.5 \times 10^8$ 、 $4.6 \times 10^8$ 、 $4.7 \times 10^8$ 、 $4.8 \times 10^8$ 、 $4.9 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $5.1 \times 10^8$ 、 $5.2 \times 10^8$ 、 $5.3 \times 10^8$ 、 $5.4 \times 10^8$ 、 $5.5 \times 10^8$ 、 $5.6 \times 10^8$ 、 $5.7 \times 10^8$ 、 $5.8 \times 10^8$ 、 $5.9 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $6.1 \times 10^8$ 、 $6.2 \times 10^8$ 、 $6.3 \times 10^8$ 、 $6.4 \times 10^8$ 、 $6.5 \times 10^8$ 、 $6.6 \times 10^8$ 、 $6.7 \times 10^8$ 、 $6.8 \times 10^8$ 、 $6.9 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $7.1 \times 10^8$ 、 $7.2 \times 10^8$ 、 $7.3 \times 10^8$ 、 $7.4 \times 10^8$ 、 $7.5 \times 10^8$ 、 $7.6 \times 10^8$ 、 $7.7 \times 10^8$ 、 $7.8 \times 10^8$ 、 $7.9 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $8.1 \times 10^8$ 、 $8.2 \times 10^8$ 、 $8.3 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^8$ 、 $8.5 \times 10^8$ 、 $8.6 \times 10^8$ 、 $8.7 \times 10^8$ 、 $8.8 \times 10^8$ 、 $8.9 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $9.1 \times 10^8$ 、 $9.2 \times 10^8$ 、 $9.3 \times 10^8$ 、 $9.4 \times 10^8$ 、 $9.5 \times 10^8$ 、 $9.6 \times 10^8$ 、 $9.7 \times 10^8$ 、 $9.8 \times 10^8$ 、 $9.9 \times 10^8$ または $1 \times 10^9$  APCであるか、または約それらのAPCの数であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1320】

他の実施形態では、本発明は、一次第1の増殖に添加されるAPCの数が $1 \times 10^8$  APC ~  $3.5 \times 10^8$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数が、 $3.5 \times 10^8$  APC ~  $1 \times 10^9$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1321】

他の実施形態では、本発明は、一次第1の増殖に添加されるAPCの数が $1.5 \times 10^8$  APC ~  $3 \times 10^8$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数が、 $4 \times 10^8$  APC ~  $7.5 \times 10^8$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1322】

他の実施形態では、本発明は、一次第1の増殖に添加されるAPCの数が $2 \times 10^8$  APC ~  $2.5 \times 10^8$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であり、急速な第2の増殖で添加されるAPCの数が、 $4.5 \times 10^8$  APC ~  $5.5 \times 10^8$  APCの範囲であるか、または約それらの範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1323】

他の実施形態では、本発明は、 $2.5 \times 10^8$ 個または約その数のAPCが一次拡張に加えられ、 $5 \times 10^8$ 個または約その数のAPCが添加されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1324】

他の実施形態において、本発明は、一次第1の増殖において添加される抗原提示細胞が末梢血単核細胞(PBMC)であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1325】

他の実施形態において、本発明は、急速な第2の増殖において添加される抗原提示細胞が末梢血単核細胞(PBMC)であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1326】

他の実施形態では、本発明は、第1の増殖のプライミングにおいて、第1の細胞培養培地が末梢血単核細胞(PBMC)の培養物から得られた培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

#### 【1327】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖において、第2の細胞培養培地が末梢血単核細胞(PBMC)の培養物から得られた培養上清を含むように修正された、上記の

10

20

30

40

50

該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 3 2 8 】

他の実施形態では、本発明は、プライミングの第 1 の増殖において、第 1 の細胞培養培地が末梢血単核細胞 ( P B M C ) の第 1 の培養物から得られた第 1 の培養上清を含み、急速な第 2 の増殖において、第 2 の細胞培養培地は、 P B M C の第 2 の培養物から得られた第 2 の培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 3 2 9 】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の増殖のプライミングにおいて、第 1 の細胞培養培地が末梢血単核細胞 ( P B M C ) の培養物から得られた培養上清を含み、培養上清は培養物中の細胞増殖速度が低下し始めた後に得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、培養上清は、 P B M C の培養開始から 3 日または 4 日後に得られる。いくつかの実施形態では、培養上清は、培養物中の細胞増殖速度が、培養物中の細胞増殖速度のピークから少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 以上低下した後に得られる。いくつかの実施形態において、培養上清は、 P M B C が培養された細胞培養培地が消費された、または使い果たされた後に得られる。

10

【 1 3 3 0 】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の増殖において、第 2 の細胞培養培地が末梢血単核細胞 ( P B M C ) の培養物から得られた培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、培養上清は、 P B M C の培養開始から 3 日または 4 日後に得られる。いくつかの実施形態では、培養上清は、培養物中の細胞増殖速度が、培養物中の細胞増殖速度のピークから少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 以上低下した後に得られる。いくつかの実施形態において、培養上清は、 P M B C が培養された細胞培養培地が消費された、または使い果たされた後に得られる。

20

【 1 3 3 1 】

他の実施形態では、本発明は、プライミングの第 1 の増殖において、第 1 の細胞培養培地が末梢血単核細胞 ( P B M C ) の第 1 の培養物から得られた第 1 の培養上清を含み、急速な第 2 の増殖において、第 2 の細胞培養培地は、 P B M C の第 2 の培養物から得られた第 2 の培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、第 1 の培養上清は、 P B M C の培養開始から 3 日または 4 日後に得られる。いくつかの実施形態では、第 2 の培養上清は、 P B M C の培養開始から 3 日または 4 日後に得られる。いくつかの実施形態において、第 1 の培養上清は、第 1 の P B M C の培養の開始から 3 または 4 日後に得られ、第 2 の培養上清は、第 2 の P B M C の培養の開始から 3 または 4 日後に得られる。いくつかの実施形態では、第 1 の培養上清は、第 1 の P B M C の培養物中の細胞増殖速度が、第 1 の P B M C の培養物中の細胞増殖速度のピークから少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 以上低下した後に得られる。いくつかの実施形態では、第 2 の培養上清は、第 2 の P B M C の培養物中の細胞増殖速度が、第 2 の P B M C の培養物中の細胞増殖速度のピークから少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 以上低下した後に得られる。いくつかの実施形態では、第 1 の培養上清は、第 1 の P B M C の培養物中の細胞増殖速度が、第 1 の P B M C の培養物中の細胞増殖速度のピークから少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 以上低下した後、及び、第 2 の培養上清は、第 2 の P B M C

30

40

50

の培養物中の細胞増殖速度が、第2のPBM Cの培養物中の細胞増殖速度のピークから少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上低下した後に得られる。いくつかの実施形態では、第1の培養上清は、第1のPBM Cが培養された細胞培養培地が消費された、または使い果たされた後に得られる。いくつかの実施形態では、第2の培養上清は、第2のPBM Cが培養された細胞培養培地が消費された、または使い果たされた後に得られる。いくつかの実施形態では、第1の培養上清は、第1のPBM Cが培養された細胞培養培地が消費された、または使い果たされた後に得られ、第2の培養上清は、第2のPBM Cが培養された細胞培養培地が消費された、または使い果たされた後に得られる。

10

**【1332】**

他の実施形態では、本発明は、第1の増殖のプライミングにおいて、第1の細胞培養培地が、約 $1 \times 10^7$  ~ 約 $1 \times 10^9$ 末梢血単核細胞(PBM C)で開始されたPBM Cの培養物から得られた培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、第1の細胞培養培地は、約 $5 \times 10^7$  ~ 約 $5 \times 10^8$ 末梢血単核細胞(PBM C)で開始されたPBM Cの培養物から得られた培養上清を含む。

**【1333】**

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖において、第2の細胞培養培地が、約 $1 \times 10^7$  ~ 約 $1 \times 10^9$ 末梢血単核細胞(PBM C)で開始されたPBM Cの培養物から得られた培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、第2の細胞培養培地は、約 $5 \times 10^7$  ~ 約 $5 \times 10^8$ 末梢血単核細胞(PBM C)で開始されたPBM Cの培養物から得られた培養上清を含む。

20

**【1334】**

他の実施形態では、本発明は、プライミングの第1の増殖において、第1の細胞培養培地が、約 $1 \times 10^7$  ~ 約 $1 \times 10^9$ 末梢血単核細胞(PBM C)で開始されたPBM Cの第1の培養物から得られた培養上清を含み、急速な第2の増殖において、第2の細胞培養培地が、約 $1 \times 10^7$  ~ 約 $1 \times 10^9$ PBM Cで開始されたPBM Cの培養物から得られた培養上清を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、第1の細胞培養培地は、約 $5 \times 10^7$  ~ 約 $5 \times 10^8$ 末梢血単核細胞(PBM C)で開始されたPBM Cの第1の培養物から得られた培養上清を含み、かつ、急速な第2の増殖において、第2の細胞培養培地が、約 $5 \times 10^7$  ~ 約 $5 \times 10^8$ PBM Cで開始されたPBM Cの培養物から得られた培養上清を含む。

30

**【1335】**

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片は複数の別々の容器に分配され、それぞれの別々の容器内で、第1のTIL集団がステップ(a)で得られ、第2のTILの集団がステップ(b)で得られ、第3のTILの集団がステップ(c)で得られ、ステップ(c)の複数の容器からの治療用のTIL集団が組み合わせられて、ステップ(d)からの採取されたTIL集団を生成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

**【1336】**

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

**【1337】**

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも2つの別個の容器を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

**【1338】**

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が2 ~ 20個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

50

## 【 1 3 3 9 】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 1 5 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 4 0 】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 1 0 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 4 1 】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2 ~ 5 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 4 2 】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

## 【 1 3 4 3 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) において第 1 の T I L 集団に対して第 1 の増殖のプライミングが行われる容器ごとに、そのような第 1 の T I L 集団から生成された第 2 の T I L 集団に対して、ステップ ( c ) における急速な第 2 の増殖が同じ容器内で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

## 【 1 3 4 4 】

他の実施形態では、本発明は、個別の容器のそれぞれが第 1 のガス透過性表面領域を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 4 5 】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 4 6 】

他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第 1 のガス透過性表面領域を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 4 7 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) において、追加の抗原提示細胞 ( A P C ) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ ( c ) で添加される A P C の数が、ステップ ( b ) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ ( b ) において A P C が第 1 のガス透過性表面領域上に 1 細胞層 ~ 3 細胞層、または約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

## 【 1 3 4 8 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) において A P C が第 1 のガス透過性表面領域上に 1 . 5 細胞層 ~ 2 . 5 細胞層、または約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

## 【 1 3 4 9 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) において A P C が第 1 のガス透過性表面領域上に 2 細胞層、または約 2 細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 5 0 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) において A P C が第 1 のガス透過性表面領域上に 1、1 . 1、1 . 2、1 . 3、1 . 4、1 . 5、1 . 6、1 . 7、1 . 8、1 . 9、2、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5、2 . 6、2 . 7、2 . 8、2 . 9 もしくは 3 細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された

50

、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1351】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に3細胞層~10細胞層、または約3細胞層~約10細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1352】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に4細胞層~8細胞層、または約4細胞層~約8細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1353】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に3、4、5、6、7、8、9、もしくは10細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1354】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9もしくは8細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1355】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてプライミング第1増殖が第1のガス透過性表面積を含む第1容器内で実施され、ステップ(c)において急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む第2の容器内で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1356】

他の実施形態では、本発明は、第2の容器が第1の容器よりも大きくなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1357】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、追加の抗原提示細胞(APC)を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ(c)で添加されるAPCの数が、ステップ(b)で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に1細胞層~3細胞層、または約1細胞層~約3細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1358】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に1.5細胞層~2.5細胞層、または約1.5細胞層~約2.5細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1359】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に2細胞層、または約2細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1360】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9も

10

20

30

40

50

しくは3細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1361】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第2のガス透過性表面領域上に3細胞層~10細胞層、または約3細胞層~約10細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1362】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第2のガス透過性表面領域上に4細胞層~8細胞層、または約4細胞層~約8細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1363】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第2のガス透過性表面領域上に3、4、5、6、7、8、9、もしくは10細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1364】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第2のガス透過性表面領域上に4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9もしくは8細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1365】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてプライミング第1増殖が第1のガス透過性表面積を含む第1容器内で実施され、ステップ(c)において急速な第2の増殖が、第1の容器内で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1366】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、追加の抗原提示細胞(APC)を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ(c)で添加されるAPCの数が、ステップ(b)で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に1細胞層~3細胞層、または約1細胞層~約3細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1367】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に1.5細胞層~2.5細胞層、または約1.5細胞層~約2.5細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1368】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に2細胞層、または約2細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1369】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9もしくは3細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

50

## 【 1 3 7 0 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に3細胞層~10細胞層、または約3細胞層~約10細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 7 1 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に4細胞層~8細胞層、または約4細胞層~約8細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 7 2 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に3、4、5、6、7、8、9、もしくは10細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

## 【 1 3 7 3 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)においてAPCが第1のガス透過性表面領域上に4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9もしくは8細胞層、または約それらの数の細胞層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

## 【 1 3 7 4 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、追加の抗原提示細胞(APC)を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ(c)で添加されるAPCの数が、ステップ(b)で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)で積層されるAPC層の平均数の、(c)で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1:1.1~1:10または約1:1.1~約1:10の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 3 7 5 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、追加の抗原提示細胞(APC)を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ(c)で添加されるAPCの数が、ステップ(b)で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)で積層されるAPC層の平均数の、(c)で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1:1.1~1:9または約1:1.1~約1:9の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

## 【 1 3 7 6 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、追加の抗原提示細胞(APC)を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ(c)で添加されるAPCの数が、ステップ(b)で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)で積層されるAPC層の平均数の、(c)で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1:1.1~1:8または約1:1.1~約1:8の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

## 【 1 3 7 7 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、追加の抗原提示細胞(APC)を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ(c)で添加されるAPCの数が、ステップ(b)で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)で積層されるAPC層の平均数の、(c)で積層され

50

る A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.1 \sim 1 : 7$  または約  $1 : 1.1 \sim 約 1 : 7$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1378】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、追加の抗原提示細胞 (A P C) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ (c) で添加される A P C の数が、ステップ (b) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ (b) で積層される A P C 層の平均数の、(c) で積層される A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.1 \sim 1 : 6$  または約  $1 : 1.1 \sim 約 1 : 6$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1379】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、追加の抗原提示細胞 (A P C) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ (c) で添加される A P C の数が、ステップ (b) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ (b) で積層される A P C 層の平均数の、(c) で積層される A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.1 \sim 1 : 5$  または約  $1 : 1.1 \sim 約 1 : 5$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1380】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、追加の抗原提示細胞 (A P C) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ (c) で添加される A P C の数が、ステップ (b) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ (b) で積層される A P C 層の平均数の、(c) で積層される A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.1 \sim 1 : 4$  または約  $1 : 1.1 \sim 約 1 : 4$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1381】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、追加の抗原提示細胞 (A P C) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ (c) で添加される A P C の数が、ステップ (b) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ (b) で積層される A P C 層の平均数の、(c) で積層される A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.1 \sim 1 : 3$  または約  $1 : 1.1 \sim 約 1 : 3$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1382】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、追加の抗原提示細胞 (A P C) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ (c) で添加される A P C の数が、ステップ (b) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ (b) で積層される A P C 層の平均数の、(c) で積層される A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.1 \sim 1 : 2$  または約  $1 : 1.1 \sim 約 1 : 2$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1383】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、追加の抗原提示細胞 (A P C) を第 1 の T I L 集団の第 1 の細胞培養培地に補充することによって一次の第 1 の増殖が実施され、ステップ (c) で添加される A P C の数が、ステップ (b) で添加される A P C の数よりも多く、ステップ (b) で積層される A P C 層の平均数の、(c) で積層される A P C 層の平均数に対する比率が、 $1 : 1.2 \sim 1 : 8$  または約  $1 : 1.2 \sim 約 1 : 8$  の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供

50

する。

【1384】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.3～1：7または約1：1.3～約1：7の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1385】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.4～1：6または約1：1.4～約1：6の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1386】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.5～1：5または約1：1.5～約1：5の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1387】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.6～1：4または約1：1.6～約1：4の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1388】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.7～1：3.5または約1：1.7～約1：3.5の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1389】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.8～1：3または約1：1.8～約1：3の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1390】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.9～1：2.5または約1：1.9～約1：2.5の範囲であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1391】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：2または約1：2であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1392】

他の実施形態では、本発明が、ステップ（b）において、追加の抗原提示細胞（APC）を第1のTIL集団の第1の細胞培養培地に補充することによって一次の第1の増殖が実施され、ステップ（c）で添加されるAPCの数が、ステップ（b）で添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）で積層されるAPC層の平均数の、（c）で積層されるAPC層の平均数に対する比率が、1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.1、1：2.2、1：2.3、1：2.4、1：2.5、1：2.6、1：2.7、1：2.8、1：2.9、1：3、1：3.1、1：3.2、1：3.3、1：3.4、1：3.5、1：3.6、1：3.7、1：3.8、1：3.9、1：4、1：4.1、1：4.2、1：4.3、1：4.4、1：4.5、1：4.6、1：4.7、1：4.8、1：4.9、1：5、1：5.1、1：5.2、1：5.3、1：5.4、1：5.5、1：5.6、1：5.7、1：5.8、1：5.9、1：6、1：6.1、1：6.2、1：6.3、1：6.4、1：6.5、1：6.6、1：6.7、1：6.8、1：6.9、1：7、1：7.1、1：7.2、1：7.3、1：7.4、1：7.5、1：7.6、1：7.7、1：7.8、1：7.9、1：8、1：8.1、1：8.2、1：8.3、1：8.4、1：8.5、1：8.6、1：8.7、1：8.8、1：8.9、1：9、1：9.1、1：9.2、1：9.3、1：9.4、1：9.5、1：9.6、1：9.7、1：9.8、1：9.9もしくは1：10または約それらの数から選択されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1393】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比率が、1.5：1～100：1、または約1.5：1～約100：1であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1394】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比率が、50：1または約50：1であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1395】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比率が、25：1または約25：1であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1396】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比率が、20：1または約20：1であるように修正さ

10

20

30

40

50

れた、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1397】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数の、第1のTIL集団におけるTILの数に対する比率が、10:1または約10:1であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1398】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団の数が、第1のTIL集団の数よりも少なくとも50倍、50倍または約50倍多くなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1399】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団の数が、第1のTIL集団の数よりも少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49もしくは50倍、その数倍または約その数倍多くなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1400】

他の実施形態において、本発明は、ステップ(c)における第2の期間の開始から約2日後または約3日後に、細胞培養培地に追加のIL-2が補足される。

【1401】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用してステップ(d)で採取したTIL集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1402】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)の後に、(e)ステップ(d)から採取したTIL集団を、任意にHypothermosolを含む輸液バッグに移す追加のステップを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1403】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用してステップ(e)で採取したTIL集団を含む輸液バッグを凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1404】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、1:1の採取したTIL集団対凍結保存培地の比率を使用して実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1405】

他の実施形態において、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞(PBMC)であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1406】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが照射され、同種異系であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1407】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において第1の培養培地に添加されるAPCの総数が $2.5 \times 10^8$ であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する

【1408】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において第2の培養培地に添加されるAPCの総数が $5 \times 10^8$ であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに

10

20

30

40

50

記載の方法を提供する

【1409】

他の実施形態では、本発明は、APCがPBMCであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1410】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが照射され、同種異系であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1411】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1412】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)の採取することが膜ベースの細胞処理システムを使用して実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1413】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)の採取することがLOVO細胞処理システムを使用して実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1414】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり5~60断片、または約5~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1415】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり10~60断片、または約10~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1416】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり15~60断片、または約15~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1417】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり20~60断片、または約20~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1418】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり25~60断片、または約25~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1419】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり30~60断片、または約30~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1420】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり35~60断片、または約35~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1421】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の複数の断片が1容器あたり40~60断片、または約40~約60断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 1 4 2 2 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の複数の断片が 1 容器あたり 4 5 ~ 6 0 断片、または約 4 5 ~ 約 6 0 断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 3 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の複数の断片が 1 容器あたり 5 0 ~ 6 0 断片、または約 5 0 ~ 約 6 0 断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 4 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の複数の断片が 1 容器あたり 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59 もしくは 6 0、または約それらの数の断片を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 5 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $27\text{ mm}^3$ 、または約その数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 6 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $20\text{ mm}^3 \sim 50\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 7 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $21\text{ mm}^3 \sim 30\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 8 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $22\text{ mm}^3 \sim 29.5\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 2 9 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $23\text{ mm}^3 \sim 29\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 3 0 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $24\text{ mm}^3 \sim 28.5\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 3 1 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $25\text{ mm}^3 \sim 28\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 3 2 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が  $26.5\text{ mm}^3 \sim 27.5\text{ mm}^3$ 、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 4 3 3 】

他の実施形態では、本発明は、各断片が 2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4

1、42、43、44、45、46、47、48、49もしくは50 mm<sup>3</sup>、または約それらの数の体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1434】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が30～60、または約30～約60の断片を含み、1300 mm<sup>3</sup>～1500 mm<sup>3</sup>、または約それらの数の総体積を有するように修正された、上で適用可能な先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1435】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が50、または約50の断片を含み、1350 mm<sup>3</sup>の総体積を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1436】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が50、または約50の断片を含み、1グラム～1.5グラム、または約1グラム～約1.5グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1437】

他の実施形態では、本発明は、第1の細胞培養培地がG容器またはXuriセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1438】

他の実施形態では、本発明は、第2の細胞培養培地がG容器またはXuriセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1439】

他の実施形態では、本発明は、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地のそれぞれがG容器またはXuriセルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1440】

他の実施形態では、本発明は、第1の細胞培養培地中のIL-2濃度が約10,000 IU/mL～約5,000 IU/mLであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1441】

他の実施形態では、本発明は、第2の細胞培養培地中のIL-2濃度が約10,000 IU/mL～約5,000 IU/mLであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1442】

他の実施形態では、本発明は、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地のそれぞれにおけるIL-2濃度が約10,000 IU/mL～約5,000 IU/mLであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1443】

他の実施形態では、本発明は、第1の細胞培養培地中のIL-2濃度が約6,000 IU/mLであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1444】

他の実施形態では、本発明は、第2の細胞培養培地中のIL-2濃度が約6,000 IU/mLであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1445】

他の実施形態では、本発明は、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地のそれぞれにおけるIL-2濃度が約6,000 IU/mLであるように修正された、上記の該当す

50

る先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1446】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド(DMSO)を含むように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1447】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7%~10%のDMSOを含むように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1448】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の第1の期間が1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日、または約それらの期間内に実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1449】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)の第2の期間が1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日もしくは11日、または約それらの期間内に実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1450】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の第1の期間及びステップ(c)の第2の期間が1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日、または約それらの期間内にそれぞれ個別に実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1451】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の第1の期間及びステップ(c)の第2の期間が5日、6日、もしくは7日、または約それらの期間内にそれぞれ個別に実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1452】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)の第1の期間及びステップ(c)の第2の期間が7日、または約7日の期間内にそれぞれ個別に実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1453】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~ステップ(d)が合計14日~18日、または約14日~約18日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1454】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~ステップ(d)が合計15日~18日、または約15日~約18日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1455】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~ステップ(d)が合計16日~18日、または約16日~約18日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1456】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~ステップ(d)が合計17日~18日、または約17日~約18日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1457】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~ステップ(d)が合計14日~17日、または約14日~約17日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1458】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計15日～17日、または約15日～約17日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1459】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計16日～17日、または約16日～約17日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1460】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計14日～16日、または約14日～約16日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1461】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計15日～16日、または約15日～約16日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1462】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計14日、または約14日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1463】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計15日、または約15日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1464】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計16日、または約16日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1465】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計17日、または約17日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1466】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計18日、または約18日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1467】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計14日以下、または約14日間以下で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1468】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計15日以下、または約15日間以下で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1469】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計16日以下、または約16日間以下で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1470】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)～ステップ(d)が合計17日以下、または約17日間以下で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか

50

に記載の方法を提供する。

【1471】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~ステップ(d)が合計18日以下、または約18日間以下で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1472】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(d)で採取されたTILの治療的集団が、TILの治療上有効な用量に十分なTILを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1473】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な用量に十分なTILの数が $2.3 \times 10^{10} \sim 13.7 \times 10^{10}$ または約それらの数となるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1474】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第3のTIL集団が効力の増大、インターフェロン-ガンマ産生の増大、及び/またはポリクローナリティの増加を提供するような上記で修正された、先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1475】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第3のTIL集団が、16日間より長いプロセスで準備されたTILと比較して少なくとも1倍~5倍、またはそれ以上のインターフェロン-ガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1476】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第3のTIL集団が、17日間より長いプロセスで準備されたTILと比較して少なくとも1倍~5倍、またはそれ以上のインターフェロン-ガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1477】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第3のTIL集団が、18日間より長いプロセスで準備されたTILと比較して少なくとも1倍~5倍、またはそれ以上のインターフェロン-ガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1478】

他の実施形態では、本発明はステップ(c)第3のTIL集団から得たエフェクターT細胞及び/または中央記憶T細胞は、ステップ(b)第2の細胞集団から得たエフェクターT細胞及び/または中央記憶T細胞と比較して増加したCD8及びCD28発現を示すように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1479】

他の実施形態では、本発明は、方法に記載された各容器が密閉容器であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【1480】

他の実施形態では、本発明は、方法に記載された各容器がG容器であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【1481】

他の実施形態では、本発明は、方法に記載された各容器がGREX-10であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【1482】

他の実施形態では、本発明は、方法に記載された各容器がGREX-100であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【1483】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本発明は、方法に記載された各容器が G R E X - 5 0 0 であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【 1 4 8 4 】

他の実施形態において、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供する。

【 1 4 8 5 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖がいかなる抗原提示細胞 ( A P C ) または O K T 3 も追加せずに実施されるプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

10

【 1 4 8 6 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖がいかなる抗原提示細胞 ( A P C ) も追加せずに実施されるプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

【 1 4 8 7 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖がいかなる O K T 3 も追加せずに実施されるプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

20

【 1 4 8 8 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖が追加の抗原提示細胞 ( A P C ) 無し、かつ追加の O K T 3 無しに実施されるプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

【 1 4 8 9 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖が 1 6 日間より長く実施されるプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

30

【 1 4 9 0 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖が 1 7 日間より長く実施されるプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

【 1 4 9 1 】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) の治療用集団を提供し、治療用 T I L 集団は、第 1 の T I L の増殖が 1 8 日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、効力の増大、インターフェロン - ガンマ産生の増大、及び / またはポリクローナリティの増加を提供する。

40

【 1 4 9 2 】

他の実施形態では、本発明は、インターフェロン 産生の増加を提供する、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の治療用 T I L 集団を提供する。

【 1 4 9 3 】

他の実施形態では、本発明は、ポリクローナリティの増加を提供する、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の治療用 T I L 集団を提供する。

50

## 【 1 4 9 4 】

他の実施形態では、本発明は、効果の増加を提供する、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の治療用 T I L 集団を提供する。

## 【 1 4 9 5 】

他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、16日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも1倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、17日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも1倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、18日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも1倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ）に示される）増殖プロセスにより、少なくとも1倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

10

## 【 1 4 9 6 】

他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、16日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも2倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、17日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも2倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、18日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも2倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ）に示される）増殖プロセスにより、少なくとも2倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

20

30

## 【 1 4 9 7 】

他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、16日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも3倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、17日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも3倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、18日間より長いプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも3倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能であるように修正された上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ）に示される）増殖プロセスにより、少なくとも3倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

40

## 【 1 4 9 8 】

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の増殖を、抗原提示細胞（A P C）を追加せ

50

ずを実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って ( また、例えば、図 1 ( 特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示される ) 増殖プロセスにより、少なくとも 1 倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

**【 1 4 9 9 】**

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の増殖を、O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って ( また、例えば、図 1 ( 特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示される ) 増殖プロセスにより、少なくとも 1 倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

10

**【 1 5 0 0 】**

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の増殖を、A P C を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である治療用 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って ( また、例えば、図 1 ( 特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示される ) 増殖プロセスにより、少なくとも 2 倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

20

**【 1 5 0 1 】**

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の増殖を、O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である治療用 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って ( また、例えば、図 1 ( 特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示される ) 増殖プロセスにより、少なくとも 2 倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

30

**【 1 5 0 2 】**

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の増殖を、A P C を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である治療用 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って ( また、例えば、図 1 ( 特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示される ) 増殖プロセスにより、少なくとも 1 倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

40

**【 1 5 0 3 】**

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の増殖を、O K T 3 を追加せずに実施するプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多くのインターフェロンガンマ産生が可能である治療用 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従って ( また、例えば、図 1 ( 特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G ) に示される ) 増殖プロセスにより、少なくとも 3 倍多くインターフェロン - ガンマ産生が可能になる。

**【 1 5 0 4 】**

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検 ( 例えば、パンチ生検を含む ) 、コア

50

生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。

【1505】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1506】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1507】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検（例えば、パンチ生検を含む）であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。 10

【1508】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1509】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1つまたは複数の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、第1の増殖のプライミングを約8日間実施することを含む、及び(iv)方法が、急速な第2の増殖を約11日間実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。 20

【1510】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1つまたは複数の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、第1の増殖のプライミングを約8日間実施することを含む、及び(iv)方法が、第2のTIL集団の培養物を約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。 30

【1511】

前述の実施形態のいくつかでは、最大5つの継代培養が、急速な第2の増殖においてTILの第2の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。前述の実施形態のいくつかでは、TILの第2の集団の培養物は、最大5つの継代培養物に均等に分割される。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

【1512】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。 40

【1513】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1514】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、 50

19または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1515】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1516】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1517】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約10個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1518】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1519】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1520】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1521】

第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約10個の細針吸引から得られるように上記の該当する段落を修正する。

【1522】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1523】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1524】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1525】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1526】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1527】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1528】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1529】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1530】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1531】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象からの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1532】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、IL-2を含む第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、IL-2、OKT-3及び抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地中で第1のTIL集団を約8日間培養して、第2のTIL集団を得ることにより、第1の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び(iv)方法が、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む第3の細胞培養培地中で約11日間培養することにより、急速な第2の増殖ステップを実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

【1533】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、IL-2を含む第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、IL-2ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された抗原提示細胞(APC)の培養物から得た培養上清を含む第2の細胞培養培地中で第1のTIL集団を約8日間培養して、第2のTIL集団を得ることにより、第1の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び(iv)方法が、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む第3の細胞培養培地中で約11日間培養することにより急速な第2の増殖ステップを実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

## 【 1 5 3 4 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、対象からの腫瘍組織の 1 ~ 約 1 0 個のコア生検から第 1 の T I L 集団を得ることを含む、( i i ) 方法が、第 1 の増殖のプライミングステップを実施する前に、約 3 日間、I L - 2 を含む第 1 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養するステップを実施することを含む、( i i i ) 方法が、I L - 2、O K T - 3 及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養して、第 2 の T I L 集団を得ることにより、第 1 の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び ( i v ) 方法が、第 2 の T I L 集団を、I L - 2 ならびに I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された A P C の培養物から得た培養上清を含む第 3 の細胞培養培地中で約 1 1 日間培養することにより、急速な第 2 の増殖ステップを実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約 2 2 日間で完了する。

10

## 【 1 5 3 5 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、対象からの腫瘍組織の 1 ~ 約 1 0 個のコア生検から第 1 の T I L 集団を得ることを含む、( i i ) 方法が、第 1 の増殖のプライミングステップを実施する前に、約 3 日間、I L - 2 を含む第 1 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養するステップを実施することを含む、( i i i ) 方法が、I L - 2 ならびに I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された第 1 の抗原提示細胞 ( A P C ) の培養物から得た第 1 の培養上清を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養して、第 2 の T I L 集団を得ることにより、第 1 の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び ( i v ) 方法が、第 2 の T I L 集団を、I L - 2 ならびに I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された第 2 の A P C の培養物から得た第 2 の培養上清を含む第 3 の細胞培養培地中で約 1 1 日間培養することにより急速な第 2 の増殖ステップを実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約 2 2 日間で完了する。

20

## 【 1 5 3 6 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、対象からの腫瘍組織の 1 ~ 約 1 0 個のコア生検から第 1 の T I L 集団を得ることを含む、( i i ) 方法が、第 1 の増殖のプライミングステップを実施する前に、約 3 日間、I L - 2 を含む第 1 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養するステップを実施することを含む、( i i i ) 方法が、I L - 2、O K T - 3 及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養して、第 2 の T I L 集団を得ることにより、第 1 の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び ( i v ) 方法が、第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3 及び A P C を含む第 3 の細胞培養培地中で約 5 日間培養し、培養物を最大 5 つの継代培養物に分割し、各継代培養物を I L - 2 を含む第 4 の細胞培養培地中で約 6 日間培養することにより急速な第 2 の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、最大 5 つの継代培養物が、急速な第 2 の増殖において T I L の第 2 の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。前述の実施形態のいくつかでは、T I L の第 2 の集団の培養物は、最大 5 つの継代培養物に均等に分割される。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約 2 2 日間で完了する。

30

40

## 【 1 5 3 7 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、対象からの腫瘍組織の 1 ~ 約 1 0 個のコア生検から第 1 の T I L 集団を得ることを含む、( i i ) 方法が、第 1 の増殖のプライミングステップを実施する前に、約 3 日間、I L - 2 を含む第 1 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養するステップを実施することを含む、( i i i ) 方法が、I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された抗原提示細胞 ( A P C ) の培養物から得た第 1 の培養上清を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養し

50

て、第2のTIL集団を得ることにより、第1の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び(i v)方法が、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む第3の細胞培養培地中で約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、各継代培養物をIL-2を含む第4の細胞培養培地中で約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、最大5つの継代培養物が、急速な第2の増殖においてTILの第2の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。前述の実施形態のいくつかでは、TILの第2の集団の培養物は、最大5つの継代培養物に均等に分割される。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

10

## 【1538】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、IL-2を含む第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、IL-2、OKT-3及び抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地中で第1のTIL集団を約8日間培養して、第2のTIL集団を得ることにより、第1の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び(i v)方法が、第2のTIL集団の培養物を、IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養されたAPC培養物から得た培養上清を含む第3の細胞培養培地中で約5日間培養し、第2のTIL集団の培養物を最大5つの継代培養物に分割し、各継代培養物をIL-2を含む第4の細胞培養培地中で約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、最大5つの継代培養物が、急速な第2の増殖においてTILの第2の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。前述の実施形態のいくつかでは、TILの第2の集団の培養物は、最大5つの継代培養物に均等に分割される。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

20

## 【1539】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、IL-2を含む第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、IL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養した第1のAPCの培養物から得た第1の培養上清を含む第2の細胞培養培地中で第1のTIL集団を約8日間培養して、第2のTIL集団を得ることにより、第1の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び(i v)方法が、第2のTIL集団の培養物を、IL-2、ならびにIL-2及びOKT-3が補足された細胞培養培地中で培養された第2のAPC培養物から得た第2の培養上清を含む第3の細胞培養培地中で約5日間培養し、第2のTIL集団の培養物を最大5つの継代培養物に分割し、各継代培養物をIL-2を含む第4の細胞培養培地中で約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、最大5つの継代培養物が、急速な第2の増殖においてTILの第2の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。前述の実施形態のいくつかでは、TILの第2の集団の培養物は、最大5つの継代培養物に均等に分割される。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

30

40

## 【1540】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、G-Rex 100Mフラスコ内で、0.5L

50

のCM1培養培地中6000IU IL-2/mlを含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、6000IU/ml IL-2及び30ng/ml OKT-3、約 $10^8$ フィーダー細胞を含む0.5LのCM1培養培地を添加し、約8日間培養することにより、第1の増殖のプライミングを実施することを含む、及び(iv)方法が、(a)第2のTIL集団を、3000IU/ml IL-2、30ng/ml OKT-3及び $5 \times 10^9$ フィーダー細胞を有する5LのCM2培養培地を含有するG-Relx 500MCSフラスコに移し約5日間培養すること、(b)培養物を、 $10^9$ 個のTILを、3000IU/ml IL-2を有する5LのAIM-V培地を含有する最大5つのG-Relx 500MCSフラスコにそれぞれ移すことにより最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

10

#### 【1541】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、第1のG-Relx 100Mフラスコ内で、0.25LのDM1培養培地中6000IU IL-2/mlを含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)方法が、6000IU/ml IL-2及び30ng/ml OKT-3、 $2.5 \times 10^8$ PBMCフィーダー細胞を含む0.25LのDM1培養培地を添加し、約8日間培養することにより、第1の増殖のプライミングを実施することを含む、及び(iv)方法が、(a)6000IU/ml IL-2、30ng/ml OKT-3及び $5 \times 10^8$ PBMCフィーダー細胞を補足した0.5LのDM1培養培地を添加し、約5日間培養すること、(b)培養物を、培養物の5分の1を、3000IU/ml IL-2を有する5LのDM2を含有する最大5つのG-Relx 500MCSフラスコにそれぞれ移すことにより最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

20

#### 【1542】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、第1のG-Relx 100Mフラスコ内で、0.15LのDM1培養培地中6000IU IL-2/mlを含む第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを含む、(iii)第1のTIL集団の培養物に、6000IU/ml IL-2及び6000IU/ml IL-2及び30ng OKT-3/mlが補足された1LのDM1中で第2のG-Relx 100Mフラスコ内で約3日間培養された $5 \times 10^8$ PBMCの培養物から得た0.15Lの培養上清を第1のTIL集団の培養物に添加し、約8日間培養することにより第1の増殖のプライミングを実施することを含む、及び(iv)方法が、(a)6000IU IL-2/ml、30ng/ml OKT-3及び $5 \times 10^8$ PBMCフィーダー細胞を補足した0.5LのDM1培養培地を添加し、約5日間培養すること、(b)培養物を、培養物の5分の1を、3000IU/ml IL-2を有する5LのDM2を含有する最大5つのG-Relx 500MCSフラスコにそれぞれ移すことにより最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

30

40

#### 【1543】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含む、(ii)方法が、第1の増殖のプライミ

50

ングステップを実施する前に、約3日間、第1のG-Rex 100Mフラスコ内で、0.25LのDM1培養培地中6000IU IL-2/mlを含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを、(iii)方法が、6000IU/ml IL-2及び30ng/ml OKT-3、及び $2.5 \times 10^8$  PBMCフィーダー細胞を含む0.25LのDM1培養培地を添加し、約8日間培養することにより、第1の増殖のプライミングを実施することを、及び(iv)方法が、(a)6000IU/ml IL-2を有する0.25LのDM1培養培地、及び6000IU/ml IL-2及び30ng OKT-3/mlが補足された1LのDM1培養培地中で第2のG-Rex 100Mフラスコ内で約3日間培養された $5 \times 10^8$  PBMCの培養物から得た0.25Lの培養上清を第1のTIL集団の培養物に添加し、約5日間培養すること、(b)第2のTIL集団の培養物を、培養物の5分の1を、3000IU/ml IL-2を有する5LのDM2を含有する最大5つのG-Rex 500MCSフラスコにそれぞれ移すことにより最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを、及び修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

#### 【1544】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象からの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを、(ii)方法が、第1の増殖のプライミングステップを実施する前に、約3日間、第1のG-Rex 100Mフラスコ内で、0.15LのDM1培養培地中6000IU IL-2/mlを含む第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養するステップを実施することを、(iii)6000IU/ml IL-2を有する0.15LのDM1培養培地、及び6000IU/ml IL-2/ml及び30ng OKT-3/mlが補足された1LのDM1中で第2のG-Rex 100Mフラスコ内で約3日間培養された $5 \times 10^8$  PBMCの第1の培養物から得た0.15Lの培養上清を第1のTIL集団の培養物に添加し、約8日間培養することにより第1のTIL集団のプライミングを実施することを、及び(iv)方法が、(a)6000IU/ml IL-2を有する0.25LのDM1培養培地、及び6000IU/ml IL-2/ml及び30ng OKT-3/mlが補足された1LのDM1培養培地中で第2のG-Rex 100Mフラスコ内で約3日間培養された $5 \times 10^8$  PBMCの第2の培養物から得た0.25Lの第2の培養上清を第1のTIL集団の培養物に添加し、約5日間培養すること、(b)第2のTIL集団の培養物を、培養物の5分の1を、3000IU/ml IL-2を有する5LのDM2を含有する最大5つのG-Rex 500MCSフラスコにそれぞれ移すことにより最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することにより急速な第2の増殖を実施することを、及び修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のいくつかでは、方法のステップは約22日間で完了する。

#### 【1545】

他の実施形態では、本発明は、(a)第1のT細胞集団を培養して、増殖させる、及び第1のT細胞の集団の活性化をプライミングすることによって、ドナーから得た第1のT細胞集団の増殖のプライミングを実施することと、(b)ステップ(a)でプライミングされた第1のT細胞の集団の活性化が減衰し始めた後、第1のT細胞の集団を培養して、第1のT細胞の集団を培養させる、及び第1のT細胞の集団を活性化をブーストすることにより、第1のT細胞の集団の急速な第2の増殖を実施し第2のT細胞集団を得ることと、(c)第2のT細胞の集団を採取することと、を含む、T細胞を増殖させる方法を提供する。他の実施形態では、急速な第2の増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアップを達成する：(a)第1の容器、例えば、G-Rex 100MCS容器中の小規模培養物中の第1のT細胞集団を、約3~4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりも大きな第2の容器、例えば、G-Rex 500MCS容器に

移動させ、第2の容器中の大規模培養物中の小規模培養から第1のT細胞集団を、約4～7日間培養する。他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウトを達成する：(a)第1の容器、例えば、G - R E X 1 0 0 M C S 容器中の、第1の小規模培養物中の第1のT細胞集団を、約3～4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)第1の小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器とサイズが一緒である少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された第1の小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約4～7日間、第2の小規模培養物中で培養される。他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成する：(a)第1の容器、例えば、G - R E X 1 0 0 M C S 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、約3～4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G - R E X 5 0 0 M C S 容器)少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約4～7日間、大規模培養物中で培養される。他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成する：(a)第1の容器、例えば、G - R E X 1 0 0 M C S 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G - R E X 5 0 0 M C S 容器)2、3、または4個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約5日間、大規模培養物中で培養される。

10

20

30

40

50

#### 【1546】

他の実施形態では、急速な第2の増殖のステップが複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G - R E X 1 0 0 M C S 容器中の小規模培養物中の第1のT細胞集団を、約2～4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりも大きな第2の容器、例えば、G - R E X 5 0 0 M C S 容器に移動させ、第2の容器中の大規模培養物中の小規模培養から第1のT細胞集団を、約5～7日間培養する。

#### 【1547】

他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G - R E X 1 0 0 M C S 容器中の、第1の小規模培養物中の第1のT細胞集団を、約2～4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)第1の小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器とサイズが一緒である少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された第1の小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約5～7日間、第2の小規模培養物中で培養される。

#### 【1548】

他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G - R E X 1

00MCS 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、約2~4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G-REX 500MCS 容器)少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約5~7日間、大規模培養物中で培養される。

【1549】

他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G-REX 100MCS 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、3~4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G-REX 500MCS 容器)2、3、または4個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約5~6日間、大規模培養物中で培養される。

10

【1550】

他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G-REX 100MCS 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、3~4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G-REX 500MCS 容器)2、3、または4個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約5日間、大規模培養物中で培養される。

20

【1551】

他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G-REX 100MCS 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、3~4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G-REX 500MCS 容器)2、3、または4個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約6日間、大規模培養物中で培養される。

30

【1552】

他の実施形態では、急速増殖のステップは複数のステップに分割され、以下によって培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する：(a)第1の容器、例えば、G-REX 100MCS 容器中の、小規模培養物中の第1のT細胞集団を、3~4日間、培養することによって、急速な第2の増殖を実施し、次いで(b)小規模培養物からの第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい(例えば、G-REX 500MCS 容器)2、3、または4個の第2の容器中への移動及び割り当て、各第2の容器中で、係る第2の容器に移動された小規模培養物からの第1のT細胞集団の一部が、約7日間、大規模培養物中で培養される。

40

【1553】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)の第1の増殖のプライミングが最大7日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提

50

供する。

【 1 5 5 4 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 8 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 5 5 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 9 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 5 6 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 1 0 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する

10

【 1 5 5 7 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 1 1 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する

【 1 5 5 8 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) の第 1 の増殖のプライミングが最大 7 日間で実施され、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 9 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 5 9 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) の第 1 の増殖のプライミングが最大 7 日間で実施され、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 1 0 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【 1 5 6 0 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) の第 1 の増殖のプライミングが最大 7 日または 8 日間で実施され、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 9 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 6 1 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) の第 1 の増殖のプライミングが最大 7 日または 8 日間で実施され、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 1 0 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【 1 5 6 2 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) の第 1 の増殖のプライミングが最大 8 日間で実施され、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 9 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 6 3 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) の第 1 の増殖のプライミングが最大 8 日間で実施され、ステップ ( b ) の急速な第 2 の増殖が最大 8 日間で実施されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 6 4 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ ( a ) において、第 1 の T 細胞集団が、O K T - 3 及び I L - 2 を含む第 1 の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【 1 5 6 5 】

他の実施形態において、本発明は、第 1 の培養培地が 4 - 1 B B アゴニスト、O K T - 3 及び I L - 2 を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 5 6 6 】

他の実施形態において、本発明は、第 1 の培養培地が O K T - 3 、 I L - 2 、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載

50

の方法を提供する。

【1567】

他の実施形態において、本発明は、第1の培養培地が4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2、及び抗原提示細胞（APC）を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1568】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、OKT-3、IL-2、及び抗原提示細胞（APC）を含む第2の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1569】

他の実施形態において、本発明は、第2の培養培地が4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2、及び抗原提示細胞（APC）を含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1570】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞の集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され、第1の培養培地が、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養され、第2の培養培地が、OKT-3、IL-2及び第2のAPCの集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多くなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1571】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞の集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され、第1の培養培地は、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養され、第2の培養培地は、OKT-3、IL-2及び第2のAPCの集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多くなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1572】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞の集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され、第1の培養培地は、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養され、第2の培養培地は、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第2のAPCの集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多くなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1573】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞の集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され、第1の培養培地は、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）を含み、第

10

20

30

40

50

1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、ステップ(b)において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養され、第2の培養培地は、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第2のAPCの集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に積層され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多くなるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1574】

他の実施形態では、本発明は、第2のAPC集団中のAPCの数の第1のAPCの集団中のAPCの数に対する比が約2:1になるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1575】

他の実施形態では、本発明は、第1のAPC集団中のAPCの数が約 $2.5 \times 10^8$ であり、第2のAPCの集団中のAPCの数が約 $5 \times 10^8$ になるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1576】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において第1のAPC集団が第1のガス透過性表面領域上に2APC層の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1577】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において第2のAPC集団が第1のガス透過性表面領域上に4~8APC層の範囲の平均厚さで積層されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1578】

他の実施形態では、ステップ(b)で第1のガス透過性表面上に積層されるAPCの層の平均数の、ステップ(a)で第1のガス透過性表面上に積層されるAPCの層の平均数に対する比は、2:1であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1579】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $1.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup> ~  $4.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1580】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $1.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup> ~  $3.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1581】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $2.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup> ~  $3.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1582】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $2.0 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>、または約その密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1583】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第2のAPCの集団が、 $2.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup> ~  $7.5 \times 10^6$  APC/cm<sup>2</sup>、または約それらの範囲の密

50

度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1584】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第2のAPCの集団が、 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1585】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第2のAPCの集団が、 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1586】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第2のAPC集団が、 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約その密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1587】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように、ステップ(b)において、第2のAPC集団が、 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1588】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $1.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように、ステップ(b)において、第2のAPC集団が、 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1589】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 3.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように、ステップ(b)において、第2のAPC集団が、 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、または約それらの範囲の密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1590】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)において、第1のAPC集団が、 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ または約その密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように、ステップ(b)において、第2のAPC集団が、 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ または約その密度で第1のガス透過性表面上に播種されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1591】

他の実施形態において、本発明は、APCが末梢血単核細胞(PBMC)であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1592】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが照射され、第1のT細胞集団に対して外因的であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1593】

50

他の実施形態では、本発明は、T細胞が腫瘍浸潤リンパ球（TIL）であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1594】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が髄浸潤リンパ球（MIL）であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1595】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が末梢血リンパ球（PBL）であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1596】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーの全血からの分離によって得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。 10

【1597】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1598】

他の実施形態では、本発明は、T細胞表現型のポジティブ選択またはネガティブ選択によって、第1のT細胞集団がドナーの全血またはアフェレーシス産物からの分離によって得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。 20

【1599】

他の実施形態では、本発明は、T細胞表現型がCD3+及びCD45+であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1600】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団の第1の増殖のプライミングを実施する前に、T細胞がNK細胞から分離されるように、上記の該当する段落のいずれかに記載された方法を提供する。他の実施形態では、T細胞は、第1のT細胞の集団からCD3-CD56+細胞を除去することによって、第1のT細胞集団中のNK細胞から分離される。他の実施形態において、CD3-CD56+細胞は、第1のT細胞集団を、CD3-CD56+細胞画分を除去し、陰性画分を回収するゲーティング戦略を用いた細胞選別に供することによって、第1のT細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、NK細胞の割合（%）が高いことを特徴とする第1のT細胞集団におけるT細胞の増殖に利用される。他の実施形態では、前述の方法は、CD3-CD56+細胞の割合（%）が高いことを特徴とする第1のT細胞集団におけるT細胞の増殖に利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のNK細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の増殖に利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のCD3-CD56+細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の増殖に利用される。他の実施形態では、前述の方法は、腫瘍に罹患した患者由来の、多数のNK細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の増殖に利用される。他の実施形態では、前述の方法は、腫瘍に罹患した患者から得た多数のCD3-CD56+細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の増殖に利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から得た腫瘍組織におけるT細胞の増殖に利用される。 30 40

【1601】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団からの約 $1 \times 10^7$ 個のT細胞を容器に播種して一次第1増殖培養を開始するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1602】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が複数の容器に分配され、各容器中で第1のT細胞集団からの約 $1 \times 10^7$ 個のT細胞を容器に播種して一次第1増殖培養を開始するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。 50

## 【 1 6 0 3 】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)で採取された第2のT細胞集団が治療用TIL集団であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 6 0 4 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つまたは複数の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 6 0 5 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1~約20個の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

## 【 1 6 0 6 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1~約10個の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 6 0 7 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

20

## 【 1 6 0 8 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検または細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

30

## 【 1 6 0 9 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つまたは複数のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 6 1 0 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1~約20個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 6 1 1 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1~約10個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

40

## 【 1 6 1 2 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

## 【 1 6 1 3 】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のコア生検から得られるように修正された、上

50

記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1614】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つまたは複数の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1615】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～約20個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1616】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～約10個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1617】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1618】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の細針吸引から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1619】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つまたは複数の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1620】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1621】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1622】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1623】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1624】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1つまたは複数のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1625】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～約20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに

10

20

30

40

50

記載の方法を提供する。

【1626】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1～約10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1627】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1628】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナーからの腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1629】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、i) IL-2を含む第1の細胞培養培地中で約3日間腫瘍サンプルを培養することによって、対象における腫瘍の1つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルから第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、(ii) IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第1のガス透過性表面領域を含む容器内で実施され、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約7～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(iii) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の第2の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することによって急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖において添加されたAPCの数は、ステップ(ii)で添加されたAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約11日間の第2の期間実施され、第3のTIL集団は、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、急速な第2の増殖を実施することと、(iv) ステップ(iii)から得た治療用TIL集団を採取することと、(v) ステップ(iv)から採取したTIL集団を輸液バッグに移すことと、を含む。

20

30

【1630】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法を提供し、本方法は、i) IL-2を含む第1の細胞培養培地中で約3日間腫瘍サンプルを培養することによって、対象における腫瘍の1つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検から得られた腫瘍サンプルから第1のTIL集団を得る及び/または受け取ることと、(ii) IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む第2の細胞培養培地で第1のTIL集団を培養して第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは第2のTILの集団を得るために約7～8日間実施され、第2のTIL集団は、第1のTIL集団より数が多い、第1の増殖のプライミングを実施することと、(iii) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団をIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第3の細胞培養培地に接触させることによって急速な第2の増殖を実施することであって、急速な第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために約11日間の第2の期間実施され、第3のTIL集団は、治療用TIL集団である、急速な第2の増殖を実施することと、(iv) ステップ(iii)から得た治療用TIL集団を採取することと、を含む。

40

50

## 【 1 6 3 1 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、第 2 の T I L 集団を得るために、I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された抗原提示細胞 ( A P C ) の培養物から得た第 1 の培養上清を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養することにより、第 1 の増殖のプライミングステップを実施することであって、第 1 の T I L 集団の培養物は A P C が補足されていない、第 1 の増殖のプライミングステップ実施することを含む、及び ( i i ) 方法が、第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3 及び A P C を含む第 3 の細胞培養培地中で約 5 日間培養し、培養物を最大 5 つの継代培養物に分割し、各継代培養物を I L - 2 を含む第 4 の細胞培養培地中で約 6 日間培養することにより急速な第 2 の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの前述の実施形態では、最大 5 つの継代培養物が、急速な第 2 の増殖において T I L の第 2 の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。いくつかの前述の実施形態では、第 2 の T I L 集団の培養物は、最大 5 つの継代培養物に均等に分割される。いくつかの前述の実施形態では、方法のステップは約 2 2 日間で完了する。

10

## 【 1 6 3 2 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養して、第 2 の T I L 集団を得ることにより、第 1 の増殖のプライミングステップを実施することを含む、及び ( i i ) 方法が、第 2 の T I L 集団を、I L - 2 ならびに I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養した A P C の培養物から得た培養上清を含む第 3 の細胞培養培地中で約 5 日間培養し、第 2 の T I L 集団は A P C が補足されておらず、その後、第 2 の T I L 集団の培養物を最大 5 つの継代培養物に分割し、各継代培養物を I L - 2 を含む第 4 の細胞培養培地中で約 6 日間培養することによって急速な第 2 の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの前述の実施形態では、最大 5 つの継代培養物が、急速な第 2 の増殖において T I L の第 2 の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。いくつかの前述の実施形態では、第 2 の T I L 集団の培養物は、最大 5 つの継代培養物に均等に分割される。いくつかの前述の実施形態では、方法のステップは約 2 2 日間で完了する。

20

30

## 【 1 6 3 3 】

他の実施形態では、本発明は、( i ) 方法が、I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養された抗原提示細胞 ( A P C ) の培養物から得た第 1 の培養上清を含む第 2 の細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 8 日間培養して第 2 の T I L 集団を産生することにより、第 1 の増殖のプライミングステップを実施することであって、第 1 の T I L 集団の培養物は A P C が補足されていない、第 1 の増殖のプライミングステップ実施することを含む、及び ( i i i ) 方法が、第 2 の T I L 集団を、I L - 2 ならびに I L - 2 及び O K T - 3 が補足された細胞培養培地中で培養した第 2 の A P C 培養物から得た第 2 の培養上清を含む第 3 の細胞培養培地中で約 5 日間培養し、第 2 の T I L 集団は A P C が補足されておらず、その後、第 2 の T I L 集団の培養物を最大 5 つの継代培養物に分割し、各継代培養物を、I L - 2 を含む第 4 の細胞培養培地中で約 6 日間培養することによって急速な第 2 の増殖を実施することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの前述の実施形態では、最大 5 つの継代培養物が、急速な第 2 の増殖において T I L の第 2 の集団の培養が開始される容器と同じサイズまたはそれよりも大きい容器内でそれぞれ培養される。いくつかの前述の実施形態では、第 2 の T I L 集団の培養物は、最大 5 つの継代培養物に均等に分割される。いくつかの前述の実施形態では、方法のステップは約 2 2 日間で完了する。

40

## 【 1 6 3 4 】

他の実施形態では、本発明は、第 2 期間の 5 日目の後に培養物を 2 つ以上の継代培養物に分割し、各継代培養物に追加量の第 3 の培養培地を補足し、約 6 日間培養するように修

50

正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1635】

他の実施形態では、本発明は、第2期間の5日目の後に培養物を2つ以上の継代培養物に分割し、各継代培養物にIL-2を含む第4の培養培地を補足し、約6日間培養するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1636】

他の実施形態では、本発明は、第2期間の5日目の後に培養物を最大5つの継代培養に分割するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1637】

他の実施形態では、本発明は、方法のすべてのステップが約22日間で完了するように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1638】

他の実施形態では、本発明は、T細胞を増殖させる方法を提供し、本方法は、(i)第1のT細胞集団を培養して、増殖させる、及び第1のT細胞の集団の活性化をプライミングすることにより、1つまたは複数の小生検、コア生検、または針生検から得たドナーにおける腫瘍サンプルからの第1のT細胞集団の増殖をプライミングを実施することと、(ii)ステップ(a)でプライミングされた第1のT細胞の集団の活性化が減衰し始めた後、第1のT細胞の集団を培養させる、及び第1のT細胞の集団を活性化をブーストするために第1のT細胞の集団を培養することにより、第1のT細胞の集団の急速な第2の増殖を実施し第2のT細胞集団を得ることと、(iv)第2のT細胞の集団を採取することと、を含む。いくつかの実施形態では、腫瘍サンプルは、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、2、3、4、5、6、7、8、9、及び10のコア生検からなる群から選択される。

【1639】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は急速な第2の増殖中に、活性化II期間、その後の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む2つの期間として起こる。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~11日間にわたって起こる。いくつかの実施形態において、急速な第2の増殖は、1~10日間にわたって起こり、バルクTIL集団をもたらす。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~9日間にわたって起こる。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~8日間にわたって起こる。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~4日間の活性化II期間、その後1~7日間の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~3日間の活性化II期間、その後1~6日間の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~4日間の活性化II期間、その後1~6日間の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~7日間の活性化II期間、その後1~7日間の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1~3日間の活性化II期間、その後1~7日間の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1日、2日、3日、または4日の活性化II期間、その後1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日の分割または分裂及びさらなる増殖期間を含む。いくつかの実施形態では、分割または分裂は、容器(例えば、バッグ及び/またはGREX容器を含む)の数を増やしたスケールアップを含むこともできる。いくつかの実施形態では、分割または分裂は、活性化IIステップ中の容器数から、さらなる増殖期間中の増加した容器数まで。容器(例えば、バッグ及び/またはGREX容器を含む)の数を増やしたスケールアップを含むこともできる。

【1640】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に増殖させるための方法は、

10

20

30

40

50

(a) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することか、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

(b) 任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c) IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)、を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

10

(d) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1~5日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(e) 第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することによって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4~8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

20

(f) ステップ(e)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g) ステップ(g)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことと、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む。

30

#### 【1641】

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用の浸潤性リンパ球(TIL)集団を含む腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)組成物を提供し、TIL組成物は、

(a) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することか、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

(b) 任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

40

(c) IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)、を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養して、第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5~9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(d) 第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実

50

施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1～5日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

(e)第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4～8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

10

(f)ステップ(e)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g)ステップ(g)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、を含む、方法により産生される。

#### 【1642】

いくつかの実施形態では、TIL組成物は凍結保存された組成物であり、方法は、(h)凍結保存プロセスを使用して、ステップ(g)からの採取されたTIL集団を含む輸液バッグを凍結保存することをさらに含む。

20

#### 【1643】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法を提供し、本方法は、増殖した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を投与することを含み、投与は、(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することか、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

(b)任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

30

(c)IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)、を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養して第2のTIL集団を産生することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することであって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

(d)第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することであって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約1～5日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

40

(e)第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することであって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4～8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くこと

50

なく行われる、第3の増殖を実施することと、

(f)ステップ(e)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g)ステップ(g)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことと、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

(h)ステップ(g)の輸液バッグから治療有効量の第3のTIL集団を対象に投与することと、を含む。

#### 【1644】

いくつかの実施形態では、第1の増殖または第1の増殖のプライミング、急速な第2の増殖、第3の増殖、及び第3の増殖は、それぞれ約5~7日間、約5~6日間、または約6~7日間実施される。いくつかの実施形態では、第1の増殖または第1の増殖のプライミング、急速な第2の増殖、第3の増殖、及び第3の増殖は、それぞれ約5日間、約6日間、または約7日間実施される。いくつかの実施形態では、第1の増殖または第1の増殖のプライミング、急速な第2の増殖、第3の増殖、及び第3の増殖は、それぞれ約5日間実施される。いくつかの実施形態では、第1の増殖または第1の増殖のプライミング、急速な第2の増殖、第3の増殖、及び第3の増殖は、それぞれ約6日間実施される。いくつかの実施形態では、第1の増殖または第1の増殖のプライミング、急速な第2の増殖、第3の増殖、及び第3の増殖は、それぞれ約7日間実施される。いくつかの実施形態では、第1の複数の亜集団は、約2~10の亜集団、約2~9の亜集団、約2~8の亜集団、約2~7の亜集団、約2~6の亜集団、約2~5の亜集団、約2~4の亜集団、または約2~3の亜集団を含む。

#### 【1645】

III. 医薬組成物、投与量、及び投与計画

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して増殖されたTILを、薬学的組成物として患者に投与する。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、無菌緩衝液中のTILの懸濁液である。本開示のPBMICを使用して増殖させたTILは、当技術分野で周知の任意の適切な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、好ましくは約30~60分間持続する単一の動脈内または静脈内注入として投与される。他の適切な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

#### 【1646】

任意の適切なTILの用量を投与することができる。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、約 $2.3 \times 10^{10}$ ~約 $13.7 \times 10^{10}$ のTILが、平均で約 $7.8 \times 10^{10}$ のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 $1.2 \times 10^{10}$ ~約 $4.3 \times 10^{10}$ のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 $3 \times 10^{10}$ ~約 $12 \times 10^{10}$ のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 $4 \times 10^{10}$ ~約 $10 \times 10^{10}$ のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 $5 \times 10^{10}$ ~約 $8 \times 10^{10}$ のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 $6 \times 10^{10}$ ~約 $8 \times 10^{10}$ のTILが投与される。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $2.3 \times 10^{10}$ ~約 $13.7 \times 10^{10}$ である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $7.8 \times 10^{10}$ のTILであり、特にがんは黒色腫である。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $1.2 \times 10^{10}$ ~約 $4.3 \times 10^{10}$ のTILである。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $3 \times 10^{10}$ ~約 $12 \times 10^{10}$ のTILである。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $4 \times 10^{10}$ ~約 $10 \times 10^{10}$ のTILである。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $5 \times 10^{10}$ ~約 $8 \times 10^{10}$ のTILである。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $6 \times 10^{10}$ ~約 $8 \times 10^{10}$ のTILである。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、約 $7 \times 10^{10}$ ~約 $8 \times 10^{10}$ のTILである。

10

20

30

40

50

## 【1647】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物で提供されるTILの数は、約 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $8 \times 10^6$ 、 $9 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $6 \times 10^7$ 、 $7 \times 10^7$ 、 $8 \times 10^7$ 、 $9 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、 $9 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $4 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $2 \times 10^{13}$ 、 $3 \times 10^{13}$ 、 $4 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{13}$ 、 $6 \times 10^{13}$ 、 $7 \times 10^{13}$ 、 $8 \times 10^{13}$ 、及び $9 \times 10^{13}$ である。いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物で提供されるTILの数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲である。

10

## 【1648】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の、例えば、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%または0.0001% w/w、w/vまたはv/v未満である。

20

30

## 【1649】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%または0.0001% w/w、w/v、またはv/v超である。

40

50

## 【1650】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物で提供されるT I Lの濃度は、薬学的組成物の約0.0001%~50%、約0.001%~約40%、約0.01%~約30%、約0.02%~約29%、約0.03%~約28%、約0.04%~約27%、約0.05%~約26%、約0.06%~約25%、約0.07%~約24%、約0.08%~約23%、約0.09%~約22%、約0.1%~約21%、約0.2%~約20%、約0.3%~約19%、約0.4%~約18%、約0.5%~約17%、約0.6%~約16%、約0.7%~約15%、約0.8%~約14%、約0.9%から約12%または約1%~約10% w / w、w / v また v / v の範囲である。

## 【1651】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供されるT I Lの濃度は、薬学的組成物の約0.001%~10%、約0.01%~約5%、約0.02%~約4.5%、約0.03%~約4%、約0.04%~約3.5%、約0.05%~約3%、約0.06%~約2.5%、約0.07%~約2%、約0.08%~約1.5%、約0.09%~約1%、約0.1%~約0.9% w / w、w / v また v / v の範囲である。

## 【1652】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物で提供されるT I Lの量は、10g、9.5g、9.0g、8.5g、8.0g、7.5g、7.0g、6.5g、6.0g、5.5g、5.0g、4.5g、4.0g、3.5g、3.0g、2.5g、2.0g、1.5g、1.0g、0.95g、0.9g、0.85g、0.8g、0.75g、0.7g、0.65g、0.6g、0.55g、0.5g、0.45g、0.4g、0.35g、0.3g、0.25g、0.2g、0.15g、0.1g、0.09g、0.08g、0.07g、0.06g、0.05g、0.04g、0.03g、0.02g、0.01g、0.009g、0.008g、0.007g、0.006g、0.005g、0.004g、0.003g、0.002g、0.001g、0.0009g、0.0008g、0.0007g、0.0006g、0.0005g、0.0004g、0.0003g、0.0002g、または0.0001g以下である。

## 【1653】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物で提供されるT I Lの量は、0.0001g、0.0002g、0.0003g、0.0004g、0.0005g、0.0006g、0.0007g、0.0008g、0.0009g、0.001g、0.0015g、0.002g、0.0025g、0.003g、0.0035g、0.004g、0.0045g、0.005g、0.0055g、0.006g、0.0065g、0.007g、0.0075g、0.008g、0.0085g、0.009g、0.0095g、0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.035g、0.04g、0.045g、0.05g、0.055g、0.06g、0.065g、0.07g、0.075g、0.08g、0.085g、0.09g、0.095g、0.1g、0.15g、0.2g、0.25g、0.3g、0.35g、0.4g、0.45g、0.5g、0.55g、0.6g、0.65g、0.7g、0.75g、0.8g、0.85g、0.9g、0.95g、1g、1.5g、2g、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g、または10g超である。

## 【1654】

本発明の医薬組成物で提供されるT I Lは、広い用量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の好み及び経験に依存する。T I Lの臨床的に確立された投与量も、適切であれば使用することができる。T I Lの投薬量など、本明細書の方法を使用して投与される医薬組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、活性医薬成分の性質、及び処方医の裁量に依存する。

## 【1655】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、T I Lは単回用量で投与され得る。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態において、T I Lは複数回用量で投与され得る。投薬は、年に1回、2回、3回、4回、5回、6回または6回以上であり得る。投薬は、月に1回、2週間に1回、1週間に約1回、または1日おきであり得る。T I Lの投与は、必要な限り継続することができる。

【1656】

いくつかの実施形態では、T I Lの有効用量は、約 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $8 \times 10^6$ 、 $9 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $6 \times 10^7$ 、 $7 \times 10^7$ 、 $8 \times 10^7$ 、 $9 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、 $9 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $4 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $2 \times 10^{13}$ 、 $3 \times 10^{13}$ 、 $4 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{13}$ 、 $6 \times 10^{13}$ 、 $7 \times 10^{13}$ 、 $8 \times 10^{13}$ 、及び $9 \times 10^{13}$ である。いくつかの実施形態では、T I Lの有効用量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲である。

【1657】

いくつかの実施形態では、T I Lの有効用量は、約 $0.01 \text{ mg/kg}$ ～約 $4.3 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.15 \text{ mg/kg}$ ～約 $3.6 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.3 \text{ mg/kg}$ ～約 $3.2 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.35 \text{ mg/kg}$ ～約 $2.85 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.15 \text{ mg/kg}$ ～約 $2.85 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.3 \text{ mg/kg}$ ～約 $2.15 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.45 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.7 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.15 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.3 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.3 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.15 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.45 \text{ mg/kg}$ ～約 $1 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.55 \text{ mg/kg}$ ～約 $0.85 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.65 \text{ mg/kg}$ ～約 $0.8 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.7 \text{ mg/kg}$ ～約 $0.75 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.7 \text{ mg/kg}$ ～約 $2.15 \text{ mg/kg}$ 、約 $0.85 \text{ mg/kg}$ ～約 $2 \text{ mg/kg}$ 、約 $1 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.85 \text{ mg/kg}$ 、約 $1.15 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.7 \text{ mg/kg}$ 、約 $1.3 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.6 \text{ mg/kg}$ 、約 $1.35 \text{ mg/kg}$ ～約 $1.5 \text{ mg/kg}$ 、約 $2.15 \text{ mg/kg}$ ～約 $3.6 \text{ mg/kg}$ 、約 $2.3 \text{ mg/kg}$ ～約 $3.4 \text{ mg/kg}$ 、約 $2.4 \text{ mg/kg}$ ～約 $3.3 \text{ mg/kg}$ 、約 $2.6 \text{ mg/kg}$ ～約 $3.15 \text{ mg/kg}$ 、約 $2.7 \text{ mg/kg}$ ～約 $3 \text{ mg/kg}$ 、約 $2.8 \text{ mg/kg}$ ～約 $3 \text{ mg/kg}$ 、または約 $2.85 \text{ mg/kg}$ ～約 $2.95 \text{ mg/kg}$ の範囲である。

【1658】

いくつかの実施形態では、T I Lの有効用量は、約 $1 \text{ mg}$ ～約 $500 \text{ mg}$ 、約 $10 \text{ mg}$ ～約 $300 \text{ mg}$ 、約 $20 \text{ mg}$ ～約 $250 \text{ mg}$ 、約 $25 \text{ mg}$ ～約 $200 \text{ mg}$ 、約 $1 \text{ mg}$ ～約 $50 \text{ mg}$ 、約 $5 \text{ mg}$ ～約 $45 \text{ mg}$ 、約 $10 \text{ mg}$ ～約 $40 \text{ mg}$ 、約 $15 \text{ mg}$ ～約 $35 \text{ mg}$ 、約 $20 \text{ mg}$ ～約 $30 \text{ mg}$ 、約 $23 \text{ mg}$ ～約 $28 \text{ mg}$ 、約 $50 \text{ mg}$ ～約 $150 \text{ mg}$ 、約 $60 \text{ mg}$ ～約 $140 \text{ mg}$ 、約 $70 \text{ mg}$ ～約 $130 \text{ mg}$ 、約 $80 \text{ mg}$ ～約 $120 \text{ mg}$ 、約 $90 \text{ mg}$ ～約 $110 \text{ mg}$ 、or約 $95 \text{ mg}$ ～約 $105 \text{ mg}$ 、約 $98 \text{ mg}$ ～約 $102 \text{ mg}$ 、約 $150 \text{ mg}$ ～約 $250 \text{ mg}$ 、約 $160 \text{ mg}$ ～約 $240 \text{ mg}$ 、約 $170 \text{ mg}$ ～約 $230 \text{ mg}$ 、約 $180 \text{ mg}$ ～約 $220 \text{ mg}$ 、約 $190 \text{ mg}$ ～約 $210 \text{ mg}$ 、約 $195 \text{ mg}$ ～約 $205 \text{ mg}$ 、または約 $198 \text{ mg}$ ～約 $207 \text{ mg}$ の範囲である。

## 【 1 6 5 9 】

T I Lの有効用量は、鼻腔内及び経皮経路、動脈内注射、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所的、移植によって、または吸入によるものを含め、同様の有用性を有する薬剤の許容される投与様式のいずれかによって、単回または複数回用量で投与され得る。

## 【 1 6 6 0 】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載された治療用のT I L集団を含む輸液バッグを提供する。

## 【 1 6 6 1 】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の治療用のT I L集団、及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物を提供する。

10

## 【 1 6 6 2 】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載されたT I L組成物を含む輸液バッグを提供する。

## 【 1 6 6 3 】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載された治療用のT I L集団の凍結保存調製物を提供する。

## 【 1 6 6 4 】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の治療用のT I L集団を含む腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 組成物、及び凍結保存培地を提供する。

20

## 【 1 6 6 5 】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がD M S Oを含むように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のT I L組成物を提供する。

## 【 1 6 6 6 】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7 ~ 1 0 %のD M S Oを含むように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のT I L組成物を提供する。

## 【 1 6 6 7 】

いくつかの実施形態では、本発明は、無血清培地または限定培地中のT I Lを含むT I L組成物を提供する。いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。いくつかの実施形態において、無血清または限定培地は、血清含有培地のロット間の変動に一部起因する実験的変動を予防及び/または減少させるために使用される。

30

## 【 1 6 6 8 】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、基礎細胞培地、ならびに血清サプリメント及び/または血清置換物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、C T S ( 商標 ) O p T m i z e r ( 商標 ) T - c e l l E x p a n s i o n B a s a l M e d i u m、C T S ( 商標 ) O p T m i z e r ( 商標 ) T - C e l l E x p a n s i o n S F M、C T S ( 商標 ) A I M - V M e d i u m、C T S ( 商標 ) A I M - V S F M、L y m p h o O N E ( 商標 ) T - C e l l E x p a n s i o n X e n o - F r e e M e d i u m、D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m ( D M E M )、M i n i m a l E s s e n t i a l M e d i u m ( M E M )、B a s a l M e d i u m E a g l e ( B M E )、R P M I 1 6 4 0、F - 1 0、F - 1 2、M i n i m a l E s s e n t i a l M e d i u m ( M E M )、G l a s g o w ' s M i n i m a l E s s e n t i a l M e d i u m ( G - M E M )、R P M I 増殖用培地、及びI s c o v e ' s M o d i f i e d D u l b e c c o ' s M e d i u mが含まれる。

40

## 【 1 6 6 9 】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清置換物は、C T S ( 商標 ) O p T m i z e r T - C e l l E x p a n s i o n S e r u m S u p p l e m e n t

50

、CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化物、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の抗生物質、及び1つまたは複数の微量元素を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分  $Ag^+$ 、 $Al^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $CD^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cr^{3+}$ 、 $Ge^{4+}$ 、 $Se^{4+}$ 、 $Br$ 、 $T$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $P$ 、 $Si^{4+}$ 、 $V^{5+}$ 、 $Mo^{6+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Rb^+$ 、 $Sn^{2+}$  及び  $Zr^{4+}$  を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

#### 【1670】

いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Immune Cell Serum Replacementを、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium、CTS (商標) Optmizer (商標) T-Cell Expansion SFM、CTS (商標) AIM-V Medium、CTS (商標) AIM-V SFM、LymphoONE (商標) T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI 増殖用培地、及び Iscove's Modified Dulbecco's Medium が含まれるが、これらに限定されない、従来の増殖培地と一緒に使用する。

#### 【1671】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地中の総血清置換物濃度 (体積%) は、総無血清または限定培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清置換物濃度は、無血清または限定培地の総量の約10%である。

#### 【1672】

いくつかの実施形態では、無血清または限定培地は、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM (Thermo Fisher Scientific) である。任意のCTS (商標) Optmizer (商標) の製剤が、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、1LのCTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Mediumと26mLのCTS (商標) Optmizer (商標) T-Cell Expansion Supplementを組み合わせたもので、使用前に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (Thermo Fisher Scientific) が、55mMで2-メルカプトエタノールと一

緒に補充される。

【 1 6 7 3 】

いくつかの実施形態では、限定培地は、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。任意のCTS (商標) OpTmizer (商標) の製剤が、本発明において有用である。CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、1 L のCTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium と 26 mL のCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement を組み合わせたもので、使用前に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が、55 mM で 2 -メルカプトエタノールと一緒に補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L -グルタミンが補充される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L -グルタミンが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L -グルタミンが補充され、さらに約 3000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、55 mM の 2 -メルカプトエタノール、及び 2 mM の L -グルタミンが補充され、さらに約 6000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、及び 55 mM の 2 -メルカプトエタノールが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、及び 55 mM の 2 -メルカプトエタノールが補充され、さらに約 3000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、及び 55 mM の 2 -メルカプトエタノールが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 6000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 、及び 約 2 mM のグルタミンが補充され、さらに約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL - 2 を含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、約 3 % のCTS (商標) I

mmune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optimizer(商標)T-cell Expansion SFMは、約3%のCTS(商標)Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、及び約2mMのグルタミンが補充され、さらに約6000IU/mLのIL-2を含む。

【1674】

いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度のグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))が補充される。いくつかの実施形態において、無血清培地または限定培地は、約2mMの濃度でグルタミン(すなわち、GlutaMAX(登録商標))が補充される。

10

【1675】

いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM~約100mM、35mM~約95mM、40mM~約90mM、45mM~約85mMまで、50mM~約80mM、55mM~約75mM、60mM~約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充される。いくつかの実施形態では、無血清培地または限定培地は、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充される。

20

【1676】

いくつかの実施形態では、国際PCT公開第WO/1998/030679号に記載され、参照により本明細書に組み込まれる、限定培地が、本発明において有用である。その公開では、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地は、無血清培養における細胞の増殖を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地を含む。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化物質、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、1つまたは複数の微量元素、及び1つまたは複数の抗生物質からなる群から選択される1つまたは複数の成分を含むか、または組み合わせることによって得られる。いくつかの実施形態では、限定培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム及び/またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つまたは複数のアミノ酸、1つまたは複数のビタミン、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のコラーゲン前駆体、及び1つまたは複数の微量元素からなる群から選択される1つまたは複数の成分とを含む。いくつかの実施形態では、限定培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、及び微量元素部分Ag<sup>+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cr<sup>3+</sup>、Ge<sup>4+</sup>、Se<sup>4+</sup>、Br、T、Mn<sup>2+</sup>、P、Si<sup>4+</sup>、V<sup>5+</sup>、Mo<sup>6+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Rb<sup>+</sup>、Sn<sup>2+</sup>及びZr<sup>4+</sup>を含有する化合物からなる群から選択される1つまたは複数の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基本細胞培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、Minimal Essential Medium (MEM)、Glasgow's

30

40

50

Minimal Essential Medium (G-MEM)、RPMI増殖用培地、及びIscove's Modified Dulbecco's Mediumからなる群から選択される。

【1677】

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

【1678】

いくつかの実施形態では、限定培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1x培地の濃度範囲」という見出しの下の列に列挙された濃度範囲で存在する。他の実施形態では、限定培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1x培地の好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙された最終濃度で存在する。他の実施形態では、限定培地は、無血清培地を含む基礎細胞培地である。いくつかのこれらの実施形態では、無血清サプリメントは、表4の「サプリメントにおける好ましい実施形態」という見出しの下の列に列挙されたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【1679】

いくつかの実施形態では、限定培地のオスモル濃度は、約260~350mOsmolである。いくつかの実施形態では、オスモル濃度は約280~310mOsmolである。いくつかの実施形態では、限定培地は、最大約3.7g/L、または約2.2g/L重炭酸ナトリウムで補充される。限定培地はさらに、L-グルタミン(約2mMの最終濃度)、1つまたは複数の抗生物質、非必須アミノ酸(NEAA;約100μMの最終濃度)、2-メルカプトエタノール(約100μMの最終濃度)で補充され得る。

【1680】

いくつかの実施形態では、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)に記述される限定培地が、本発明において有用である。簡単に説明すると、RPMIまたはCTS(商標)Optimizer(商標)は基礎細胞培地として使用され、0、2%、5%、または10%のいずれかのCTS(商標)Immune Cell Serum Replacementで補充される。

【1681】

いくつかの実施形態では、第1及び/または第2のガス透過性容器中の細胞培地は濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞数を増やすために必要な手順を簡素化し得る。いくつかの実施形態では、第1及び/または第2のガス透過性容器中の細胞培地には、ベータ-メルカプトエタノール(BMEまたはME;2-メルカプトエタノール、CAS60-24-2としても知られている)が含まれていない。

【1682】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する先行段落のいずれかに記載された T I L 組成物の凍結保存調製物を提供する。

【 1 6 8 3 】

IV . 患者を治療する方法

治療する方法は、最初の T I L の収集及び T I L の培養から始まる。このような方法は両方とも、例えば、Jinet al . , J . Immunotherapy , 2 0 1 2 , 3 5 ( 3 ) : 2 8 3 - 2 9 2 に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。治療する方法の実施形態は、実施例を含む以下の節を通して記載される。

【 1 6 8 4 】

例えば、上記のステップ A ~ F に記載の、または上記のステップ A ~ F に従う（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）モノを含む、本明細書に記載の方法に従って産生された増殖された T I L は、がん患者の治療における特定の使用が見出される（例えば、Goff , et al . , J . Clinical Oncology , 2 0 1 6 , 3 4 ( 2 0 ) : 2 3 8 9 - 2 3 9 に記載のもの及び補足コンテンツは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、T I L は、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖される（Dudley , et al . , J Immunother . , 2 0 0 3 , 2 6 : 3 3 2 - 3 4 2 を参照し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。無菌条件下で新鮮な腫瘍を解剖することができる。代表的なサンプルを、正式な病理学的分析のために収集することができる。2 mm<sup>3</sup> ~ 3 mm<sup>3</sup> の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者あたり 5、10、15、20、25、または 30 個のサンプルを得る。いくつかの実施形態では、患者あたり 20、25、または 30 個のサンプルを得る。いくつかの実施形態では、患者あたり 20、22、24、26 または 28 個のサンプルを得る。いくつかの実施形態では、患者あたり 24 個のサンプルを得る。サンプルを 24 ウェルの個別ウェルに配置し、高用量の I L - 2 ( 6 , 0 0 0 I U / m L ) を有する増殖培地に維持し、腫瘍の破壊及び / または T I L の増殖を監視する。処理後に生存細胞が残っている腫瘍を、本明細書に記載のように、酵素的に消化して単一細胞懸濁液にし、凍結保存することができる。

【 1 6 8 5 】

いくつかの実施形態では、成功裏に増殖した T I L を表現型分析 ( C D 3、C D 4、C D 8、及び C D 5 6 ) のためにサンプリングし、入手可能であれば自己腫瘍に対して試験することができる。一晚の共培養でインターフェロン - ( I F N - ) レベル > 2 0 0 p g / m L 及び 2 回のバックラウンドが得られた場合、T I L は反応性があると見なすことができる。(Goff , et al . , J Immunother . , 2 0 1 0 , 3 3 : 8 4 0 - 8 4 7 ; その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な増殖パターンの証拠を有する培養物は、第 2 の増殖（例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）のステップ D）に従って提供される第 2 の増殖）のために選択され、これには急速な増殖 ( R E P ) 称されることもある第 2 の増殖が含まれる。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、第 2 の増殖中の高増殖）を有する増殖した T I L が、追加の第 2 の増殖のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性（例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）のステップ D で提供される第 2 の増殖中の高い増殖）を有する T I L が、図 1（特に、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G）のステップ D による追加の第 2 の増殖のために選択される。

【 1 6 8 6 】

いくつかの実施形態では、患者は、例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍採取後に A C T ( 養子細胞移植 ) に直接移されず、いくつかの実施形態では、細胞は腫瘍採取及び / または第 1 の増殖後すぐに利用されない。いくつかの実施形態では、T I L を凍結保存し

10

20

30

40

50

、患者への投与の2日前に解凍することができる。いくつかの実施形態では、TILを凍結保存し、患者への投与の1日前に解凍することができる。いくつかの実施形態では、TILを凍結保存し、患者への投与の直前に解凍することができる。

【1687】

輸液バッグTILの凍結保存サンプルの細胞表現型は、表面マーカーCD3、CD4、CD8、CCR7、及びCD45RA (BD Biosciences) についてのフローサイトメトリー (例えば、FlowJo)、ならびに本明細書に記載の方法のいずれかによって分析することができる。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用して測定することができる。血清IFN-gの上昇は、 $> 100 \text{ pg/mL}$ 及び血清IFN-gのベースラインレベルよりも少なくとも4倍または少なくとも3倍または少なくとも2倍または少なくとも1倍高いと定義することができる。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 1000 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 200 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 250 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 300 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 350 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 400 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 450 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 500 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 550 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 600 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 650 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 700 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 750 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 800 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 850 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 900 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 950 \text{ pg/mL}$ と定義される。いくつかの実施形態では、血清IFN-gの上昇は、 $> 1000 \text{ pg/mL}$ と定義される。

10

20

30

【1688】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法によって産生されるTIL、例えば、図1 (特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に例示されるもの、TILの臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、例えば、図1 (特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に例示される、本明細書で提供される方法によって産生されるTILは、例えば、図1 (特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に例示される方法以外の方法によって産生されたTILと比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載された方法以外の方法には、プロセス1C及び/またはジェネレーション1 (Gen1) と称される方法が含まれる。いくつかの実施形態では、増加した効果は、DCR、ORR、及び/またはその他の臨床反応によって測定される。いくつかの実施形態では、例えば、図1 (特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に例示される、本明細書で提供される方法によって産生されるTILは、例えば、図1 (特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G) に例示されるもの、例えば、Gen1プロセス以外の方法を含む、本明細書に例示される方法以外の方法によって産生されたTILと比較して、同様の反応時間及び安全性プロファイルを示す。

40

【1689】

いくつかの実施形態では、IFN-ガンマ (IFN- ) は治療効果及び/または増加

50

した臨床効果の指標である。いくつかの実施形態では、T I Lで治療された対象の血液中のI F N - は、活性T I Lの指標である。いくつかの実施形態では、I F N - 産生の効力アッセイが使用される。I F N - 産生は、細胞毒性の可能性の別の尺度である。I F N - 産生は、本発明の方法によって調製されたT I Lで治療された対象の血液、血清、またはT I LのエキスピボでのサイトカインI F N - のレベルを決定することによって測定することができ、これには、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）に記載されたものが含まれる。いくつかの実施形態では、I F N - の増加は、本発明の方法によって産生されたT I Lで治療された患者における治療効果を示す。いくつかの実施形態では、I F N - は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたT I Lで治療された患者と比較して、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたT I Lで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたT I Lで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたT I Lで治療された患者と比較して、3倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたT I Lで治療された患者と比較して、4倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - 分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたT I Lで治療された患者と比較して、5倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - は、Quantikine E L I S Aキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、I F N - は、例えば、図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）に記載されたものを含む、本発明の方法によって調製されたT I Lで治療された対象のエキスピボでのT I Lで測定される。いくつかの実施形態では、I F N - は、例えば、図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）に記載されたものを含む、本発明の方法によって調製されたT I Lで治療された対象の血液で測定される。いくつかの実施形態では、I F N - は、例えば、図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）に記載されたものを含む、本発明の方法によって調製されたT I Lで治療された対象の血清で測定される。

#### 【1690】

いくつかの実施形態では、例えば、図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）に例示される、本明細書で提供される方法によって産生されるT I Lは、例えば、図1（特に、例えば、図1 B及び/または図1 C及び/または図1 E及び/または図1 F及び/または図1 G）に例示されないもの、例えば、プロセス1 C方法などを含む、他の方法によって産生されたT I Lと比

較して、増加したポリクローナリティを示す。いくつかの実施形態では、大幅に改善されたポリクローナリティ及び/または増加したポリクローナリティは治療効果及び/または増加した臨床効果を示している。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、T細胞レパトリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティの増加は、本発明の方法によって生成されたTILの投与に関する治療効果を示し得る。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍、2倍、10倍、100倍、500倍、または1000倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、10倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、100倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、500倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1000倍増加する。

#### 【1691】

有効性の尺度には、当技術分野で知られているだけでなく本明細書に記載されているように、疾患制御率（DCR）及び全奏効率（ORR）が含まれ得る。

#### 【1692】

##### 1. がん及びその他の疾患の治療方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療する方法で使用することができる。いくつかの実施形態では、それらは過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらはまた、本明細書及び以下の段落に記載されるように、他の障害を治療する際にも使用され得る。

#### 【1693】

ある特定の実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。ある特定の実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、神経膠芽腫（GBM）、胃腸癌、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、腎癌、腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ球性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。

#### 【1694】

いくつかの実施形態、がんは、超異変型癌表現型である。超異変型癌は、Campbell, et al. (Cell, 171:1042-1056 (2017)) に広く記載されており、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 9 ~ 10 個の変異を含む。いくつかの実施形態では、小児超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 9.91 個の変異を含む。いくつかの実施形態では、成人超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 9 個の変異を含む。いくつかの実施形態では、促進された超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 10 ~ 100 個の変異を含む。いくつかの実施形態では、促進された小児超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 10 ~ 100 個の変異を含む。いくつかの実施形態では、促進された成人超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 10 ~ 100 個の変異を含む。いくつかの実施形態では、ウルトラ超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 100 を超える変異を含む。いくつかの実施形態では、小児ウルトラ超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 100 の変異を含む。いくつかの実施形態では、成人ウルトラ超異変型腫瘍は、メガベース (Mb) あたり 100 を超える変異を含む。

【1695】

10

いくつかの実施形態では、超異変型腫瘍は、複製修復経路に変異を有する。いくつかの実施形態では、超異変型腫瘍は、複製修復関連 DNA ポリメラーゼに変異を有する。いくつかの実施形態では、超異変型腫瘍はマイクロサテライト不安定性を有する。いくつかの実施形態では、ウルトラ超異変型腫瘍は、複製修復関連 DNA ポリメラーゼに変異を有し、マイクロサテライト不安定性を有する。いくつかの実施形態では、腫瘍における超変異は、免疫チェックポイント阻害剤に対する応答と相関する。いくつかの実施形態では、超異変型腫瘍は、免疫チェックポイント阻害剤による治療に耐性がある。いくつかの実施形態では、超異変型腫瘍は、本発明の TIL を使用して治療することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍における超変異は、環境因子 (外因性曝露) によって引き起こされる。例えば、UV 光は、悪性黒色腫における多数の突然変異の主な原因である可能性がある (例えば、Pfeifer, G. P., You, Y. H., and Besaratinia, A. (2005) Mutat. Res. 571, 19-31.; Sage, E. (1993). Photochem. Photobiol. 57, 163-174 を参照)。いくつかの実施形態では、腫瘍における超変異は、肺及び喉頭の腫瘍、ならびに他の腫瘍のタバコの煙に含まれる 60 を超える発癌物質によって引き起こされる可能性があり、これは、直接的な変異原への曝露によるものである (例えば、Pleasance, E. D., Stephens, P. J., O'Meara, S., McBride, D. J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M. L., Beare, D., Lau, K. W., Greenman, C., et al. (2010). Nature 463, 184-190) を参照) いくつかの実施形態では、腫瘍における超変異は、アポリタンパク質 BmRNA 編集酵素、触媒ポリペプチド様 (APOBEC) ファミリーメンバーの調節不全によって引き起こされ、広範囲のがんにおいて C から T への遷移のレベルの増加をもたらすことが示されている (例えば、Roberts, S. A., Lawrence, M. S., Klimczak, L. J., Grimm, S. A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G. V., Carter, S. L., Saksena, G., et al. (2013). Nat. Genet. 45, 970-976) を参照)。いくつかの実施形態では、腫瘍における超変異は、主要な複製酵素である Pol3 及び Pold1 によって実行される校正を損なう変異による DNA 複製修復の欠陥によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、腫瘍における超変異は、結腸直腸、子宮内膜、及び他の癌における超変異に関連する DNA ミスマッチ修復の欠陥によって引き起こされる (例えば、Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A. D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A. G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C. C., et al.; (2013). Nature 497, 67-73.; Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Chang, K., D

20

30

40

50

inh, H. H., Drummond, J. A., Fowler, G., Kovar, C. L., Lewis, L. R., Morgan, M. B., Newsham, I. F., et al.; (2012). Nature 487, 330 - 337)を参照)。いくつかの実施形態では、DNA複製修復変異は、体質的または二対立遺伝子ミスマッチ修復欠損症(CMMRD)、リンチ症候群、及びポリメラーゼ校正関連ポリポーシス(PPAP)などのがん素因症候群にも見られる。

【1696】

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、がんは超異変型癌である。いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、がんは促進された超異変型癌である。いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、がんはウルトラ超異変型癌である。

10

【1697】

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるTILの注入前に、非骨髄破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、非骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日を2日間(TIL注入前の27及び26日目)及びフルダラビン25mg/m<sup>2</sup>/日を5日間(TIL注入の27~23日目)である。いくつかの実施形態では、本開示による非骨髄破壊的化学療法及びTIL注入の後(0日目)、患者は、720,000IU/kgで生理的耐性まで8時間ごとに静脈内にIL-2の静脈内注入を受ける。

【1698】

指示された疾患または障害の治療、予防及び/または管理における本明細書に記載の化合物及び化合物の組み合わせの有効性は、当技術分野で知られている様々なモデルを使用して試験することができ、ヒト疾患の治療の指針を提供する。例えば、卵巣癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Mullany, et al., Endocrinology 2012, 153, 1585 - 92; 及びFong, et al., J. Ovarian Res. 2009, 2, 12に記載されている。膵臓癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、Herrerros-Villanueva, et al., World J. Gastroenterol. 2012, 18, 1286 - 1294に記載されている。乳癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Fantozzi, Breast Cancer Res. 2006, 8, 212に記載されている。メラノーマの治療の有効性を決定するためのモデルは、Damsky, et al., Pigment Cell & Melanoma Res. 2010, 23, 853 ~ 859に記載されている。肺癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えばMeuwissen, et al., Genes & Development, 2005, 19, 643 - 664に記載されている。肺癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Kim, Clin. Exp. Otorhinolaryngol. 2009, 2, 55 - 60; 及びSano, Head Neck Oncol. 2009, 1, 32に記載されている。

20

30

【1699】

いくつかの実施形態では、IFN-ガンマ(IFN- )は、過剰増殖性障害治療の治療効果を示す。いくつかの実施形態では、TILで治療された対象の血液中のIFN- は、活性TILを示す。いくつかの実施形態では、IFN- 産生の効力アッセイが使用される。IFN- 産生は、細胞毒性の可能性の別の尺度である。IFN- 産生は、本発明の方法によって調製されたTILで治療された対象の血液中のサイトカインIFN- のレベルを決定することによって測定することができ、これには、例えば図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)に記載されたものが含まれる。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたTILは、図1(特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G)及び本出願を通じて例示される、Gen3プロセスと称される方法を使用して調製されたTILで治療された被験者と比較して、本方法のTILで治療された対象の血液中のIFN- の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、

40

50

IFN- $\gamma$  の増加は、本発明の方法によって産生されたTILで治療された患者における治療効果を示す。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍またはそれ以上増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、3倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、4倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  分泌は、未治療の患者と比較して及び/または、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、5倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、Quantikine ELISAキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、Quantikine ELISAキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、本発明の方法によって産生されたTILで治療された患者からのエクスピボのTILで測定される。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、本発明の方法によって生成されたTILで治療された患者の血液で測定される。いくつかの実施形態では、IFN- $\gamma$  は、本発明の方法によって産生されたTILで治療された患者の血清で測定される。

#### 【1700】

いくつかの実施形態では、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に例示される、本明細書で提供される方法によって産生されるTILは、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に例示されないもの、例えば、プロセス1C方法などを含む、他の方法によって産生されたTILと比較して、増加したポリクローナリティを示す。いくつかの実施形態では、大幅に改善されたポリクローナリティ及び/または増加したポリクローナリティは、がん治療の治療効果及び/または増加した臨床効果を示している。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、T細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティの増加は、本発明の方法によって生成されたTILの投与に関する治療効果を示し得る。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍、2倍、10倍、100倍、500倍、または1000倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTIL

Lと比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、10倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、100倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、500倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローナリティは、例えば図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）で体现される方法以外を含む、本明細書で提供される方法以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1000倍増加する。

10

### 【1701】

#### 2. 同時投与の方法

20

いくつかの実施形態では、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）のステップA~Fに記載の方法に由来するTILを含む、本明細書に記載のように産生されたTILは、以下に説明する抗体などの1つまたは複数の免疫チェックポイント制御因子と組み合わせて投与することができる。例えば、PD-1を標的とし、本発明のTILと共投与することができる抗体には、例えば、ニボルマブ（BMS-936558、Bristol-Myers Squibb；Opdivo（登録商標））、ペムブロリズマブ（ランブロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck；Keytruda（登録商標））、ヒト化抗PD-1抗体JS001（ShangHai JunShi）、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042（Tesarro, Inc.）、ピディリズマブ（anti-PD-1 mAb CT-011、Medivation）、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317（BeiGene）、及び/または抗PD-1抗体SHR-1210（ShangHai HengRui）、ヒトモノクローナル抗体REGN2810（Regeneron）、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106（Bristol-Myers Squibb）、及び/またはヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001（Novartis）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PD-1抗体は、クローン：RMP1-14（ラットIgG）-BioXcell cat#BP0146に由来する。本明細書に記載のステップA~Fに従って産生されるTILとの同時投与方法での使用に適した他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,008,449号に開示される抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD-L1に特異的に結合し、PD-1とのその相互作用を阻害し、それによって免疫活性を増加させる。PD-L1に結合し、PD-1とPD-L1の間の相互作用を妨害し、抗腫瘍免疫応答を刺激する当技術分野で知られている任意の抗体は、本明細書に記載のステップA~Fに従って産生されたTILとの同時投与方法での使用に適している。例えば、PD-L1を標的し、臨床試験中の抗体は、BMS-936559（Bristol-Myers Squibb）及びMPDL3280A（Genentech）を含む。PD-L1を標的とする他の適切な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,943,743号に開示されている。PD-1またはPD-L1に結合し、PD-1とPD-L1の間の相互作用を妨害し、抗腫瘍免疫応答を刺激するいずれの抗体も、本明細書に記載のステップA~Fに従って産生されたTILと

30

40

50

の同時投与方法での使用に適していることが当業者には理解されよう。いくつかの実施形態では、患者が抗PD-1抗体担体の投与に抵抗性のがんタイプを有する場合、ステップA～Fに従って産生されたTILの組み合わせを投与される対象は、抗PD-1抗体と共に投与される。いくつかの実施形態では、患者が難治性黒色腫を有する場合、患者は抗PD-1と組み合わせてTILを投与される。いくつかの実施形態では、患者が非小細胞肺癌(NSCLC)を有する場合、患者は抗PD-1と組み合わせてTILを投与される。

【1702】

3. PD-1及びPD-L1阻害剤

いくつかの実施形態では、がん罹患した患者に提供されるTIL治療は、治療用のTIL集団のみによる治療を含み得るか、またはTILならびに1つ以上のPD-1及び/またはPD-L1阻害剤を含む併用治療を含み得る。 10

【1703】

プログラム死1(PD-1)は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)T細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される288アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。PD-1はCD279としても知られ、CD28ファミリーに属し、ヒトでは第2染色体上のPdcd1遺伝子によってコードされる。PD-1は、1つの免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリードメイン、膜貫通領域、及び免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ(ITSM)を含む細胞内ドメインからなる。PD-1及びそのリガンド((PD-L1及びPD-L2)は、Keir, et al., Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 677-704に記載されるように、免疫寛容に重要な役割を担うことが知られている。PD-1は、T細胞免疫応答を負に制御する抑制シグナルを提供する。PD-L1(B7-H1またはCD274としても知られる)及びPD-L2(B7-DCまたはCD273としても知られる)は、腫瘍細胞及び間質細胞で発現し、PD-1を発現する活性化T細胞に遭遇する可能性があり、T細胞を免疫抑制する。PD-L1は、ヒト9番染色体上のCd274遺伝子によってコードされる290アミノ酸の膜貫通タンパク質である。PD-1阻害剤、PD-L1阻害剤及び/またはPD-L2阻害剤を使用することによるPD-1とそのリガンドPD-L1及びPD-L2間の相互作用を遮断することは、Topalian, et al., N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443-54に記載されるものなど、最近の臨床研究で実証されるように免疫耐性を克服することができる。PD-L1は多くの腫瘍細胞株で発現するが、PD-L2は主に樹状細胞と少数の腫瘍細胞株で発現する。T細胞(活性化後にPD-1を誘導的に発現する)に加えて、PD-1はB細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、及び樹状細胞にも発現する。 20 30

【1704】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、当技術分野で知られている任意のPD-1阻害剤またはPD-1遮断剤であり得る。特に、これは、以下の段落でより詳細に説明するPD-1阻害剤または遮断剤の1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、PD-1阻害剤に関して、本明細書では交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるPD-1阻害剤に対する本明細書での言及は、化合物 40  
またはその抗原結合断片、変異体、コンジュゲート、またはバイオシミラーを指し得る。疑義を避けるために、本明細書におけるPD-1阻害剤への言及は、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、またはプロドラッグを指し得る。

【1705】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、抗体(すなわち、抗PD-1抗体)、Fab断片を含むその断片、またはその単鎖可変断片(scFv)である。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、PD-1との結合について競合する、及び/またはPD-1上のエピトープに結合する 50

。いくつかの実施形態では、抗体は、PD - 1との結合について競合する、及び/またはPD - 1上のエピトープに結合する。

【1706】

いくつかの実施形態では、PD - 1阻害剤は、ヒトPD - 1を約100 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約90 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約80 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約70 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約60 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約50 pMのKDで結合する、またはヒトPD - 1を約40 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約30 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約20 pM以下のKDで結合する、ヒトPD - 1を約10 pM以下のKDで結合する、または、ヒトPD - 1を約1 pM以下のKDで結合するものである。

10

【1707】

いくつかの実施形態では、PD - 1阻害剤は、約 $7.5 \times 10^5$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $7.5 \times 10^5$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $8 \times 10^5$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $8.5 \times 10^5$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $9 \times 10^5$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $9.5 \times 10^5$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合する、または、約 $1 \times 10^6$  l / M · s以上の速さのk a s s o cでヒトPD - 1に結合するものである。

20

【1708】

いくつかの実施形態では、PD - 1阻害剤は、約 $2 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.1 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.2 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.3 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.4 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.5 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.6 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.7 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.8 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $2.9 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合する、約 $3 \times 10^{-5}$  l / s以下の速さのk d i s s o cでヒトPD - 1に結合するものである。

30

【1709】

いくつかの実施形態では、PD - 1阻害剤は、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約10 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約9 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約8 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約7 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約6 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約5 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約4 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約3 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約2 nM以下のIC50で遮断または阻害する、ヒトPD - L1またはヒトPD - L2のヒトPD - 1への結合を約1 nM以下のIC50で遮断または阻害するものである。

40

【1710】

いくつかの実施形態では、PD - 1阻害剤は、ニボルマブ ( B r i s t o l - M y e r

50

s Squibb Co. から OPDIVO として市販されている)、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは変異体である。ニボルマブは、PD-1 受容体を遮断する完全ヒト IgG4 抗体である。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体は、免疫グロブリン G4 kappa、抗(ヒト CD274) 抗体である。ニボルマブは、Chemical Abstracts Service (CAS) 登録番号 946414-94-4 が割り当てられており、5C4、BMS-936558、MDX-1106、及び ONO-4538 としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第 8,008,449 号及び国際特許公開番号 WO2006/121168 に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Wang, et al., Cancer Immunol Res. 2014, 2, 846-56; Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202 及び Weber, et al., J. Clin. Oncology, 2013, 31, 4311-4318 に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表 19 に示す。ニボルマブは、22~96、140~196、254~314、360~418、22''~96''、140''~196''、254''~314''、及び 360''~418'' に重鎖間ジスルフィド結合、23''~88''、134''~194''、23''''~88''''、及び 34''''~194'''' に軽鎖間ジスルフィド結合、127~214'、127''~214''、219~219'' 及び 222~222'' に重鎖間ジスルフィド結合、ならびに 290、290'' に N-グリコシル化部位 (H C H 2 8 4 . 4) を有する。

10

30

40

50

#### 【1711】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 によって与えられる重鎖、及び配列番号 464 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 及び配列番号 464 にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、単鎖可変断片 (scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 及び配列番号 464 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 及び配列番号 464 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 及び配列番号 464 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 及び配列番号 464 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 463 及び配列番号 464 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

#### 【1712】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 465 に示される配列を含み、PD-1 阻害剤軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 466 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 465 及び配列番号 466 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 465 及び配列番号 466 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 465 及び配列番号 466 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 465 及び配列番号 466 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、

PD - 1 阻害剤は、配列番号 465 及び配列番号 466 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1713】

いくつかの実施形態では、PD - 1 阻害剤は、配列番号 467、配列番号 468、及び配列番号 469 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびに、配列番号 470、配列番号 471、及び配列番号 472 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じ PD - 1 上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

10

【1714】

いくつかの実施形態では、PD - 1 阻害剤は、ニボルマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗 PD - 1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗 PD - 1 抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して 1 つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はニボルマブである。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗 PD - 1 抗体であり、抗 PD - 1 抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はニボルマブである。抗 PD - 1 抗体は、米国 FDA 及び/または欧州連合の EMA などの医薬品規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はニボルマブである。

20

30

40

50

## 【表 19】

表 19.ニボルマブに関連するPD-1阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)		
配列番号 463 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWDGSKRYY	60	
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLVT VSSASTKGFS	120	
	VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SCVHTFPAVL QSSGLYSLSS	180	
	VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KFSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP	240	
	KDTLMSRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVSVLT	300	
	VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC	360	
	LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV	420	
	MHEALHNNHT QKSLSLSLGK	440	
	配列番号 464 ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPPERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTEFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFFP	120	
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSITL	180		
LSKADYKHKH VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RCEC	214		
配列番号 465 ニボルマブ可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWDGSKRYY	60	
	ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLLVT VSS	113	
配列番号 466 ニボルマブ可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPPERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA	60	
	RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTEFGQ GTKVEIK	107	
配列番号 467 ニボルマブ重鎖 CDR1	NSGMH	5	
配列番号 468 ニボルマブ重鎖 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG	17	
配列番号 469 ニボルマブ重鎖 CDR3	NDDY	4	
配列番号 470 ニボルマブ軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11	
配列番号 471 ニボルマブ軽鎖 CDR2	DASNRAT	7	
配列番号 472 ニボルマブ軽鎖 CDR3	QQSSNWPRT	9	

10

20

30

## 【1715】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは約0.5mg/kg～約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは約0.5mg/kg、約1mg/kg、約1.5mg/kg、約2mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約3.5mg/kg、約4mg/kg、約4.5mg/kg、約5mg/kg、約5.5mg/kg、約6mg/kg、約6.5mg/kg、約7mg/kg、約7.5mg/kg、約8mg/kg、約8.5mg/kg、約9mg/kg、約9.5mg/kg、または約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

40

## 【1716】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はニボルマブまたはそのバイオシミラーであ

50

り、ニボルマブは約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

10

## 【1717】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、または6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

20

## 【1718】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、2週間ごとに約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、4週間ごとに約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、約1mg/kgで投与した後に同じ日にイピリムマブ3mg/kgを3週間ごとに4回、その後240mgを2週間ごとに、または480mgを4週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

30

## 【1719】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、2週間ごとに約240mg投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、4週間ごとに約480mg投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

40

## 【1720】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与さ

50

れる。いくつかの実施形態では、ニボルマブを、転移性非小細胞肺癌を治療するために  $3 \text{ mg / kg}$  で2週間ごとに、加えてイピリムマブを約  $1 \text{ mg / kg}$  で6週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブを、転移性非小細胞肺癌を治療するために  $360 \text{ mg}$  で3週間ごとに、加えてイピリムマブを約  $1 \text{ mg / kg}$  で6週間ごと、及び2サイクルのプラチナダブルット化学療法で投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、約  $240 \text{ mg}$  で2週間ごとにまたは  $480 \text{ mg}$  で4週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

#### 【1721】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、約  $240 \text{ mg}$  で2週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

#### 【1722】

いくつかの実施形態では、ニボルマブを、悪性胸膜中皮腫を治療するために  $360 \text{ mg}$  で3週間ごとに、加えてイピリムマブを約  $1 \text{ mg / kg}$  で6週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

#### 【1723】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行腎細胞癌を治療するために、約  $240 \text{ mg}$  で2週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行腎細胞癌を治療するために、約  $480 \text{ mg}$  で4週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行腎細胞癌を治療するために約  $3 \text{ mg / kg}$  で投与され、続いて同じ日にイピリムマブを  $1 \text{ mg / kg}$  で3週間ごとに4回、その後  $240 \text{ mg}$  で2週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行腎細胞癌を治療するために約  $3 \text{ mg / kg}$  で投与され、続いて同じ日にイピリムマブを  $1 \text{ mg / kg}$  で3週間ごとに4回、その後  $240 \text{ mg}$  で2週間ごとに、その後  $480 \text{ mg}$  で4週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

## 【 1 7 2 4 】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために約 2 4 0 m g で 2 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために約 4 8 0 m g で 4 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

10

## 【 1 7 2 5 】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、約 2 4 0 m g で 2 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、約 4 8 0 m g で 4 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

20

## 【 1 7 2 6 】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、約 2 4 0 m g で 2 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、約 4 8 0 m g で 4 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

30

## 【 1 7 2 7 】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高マイクロサテライト不安定性（M S I - H）またはミスマッチ修復欠損（d M M R）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者の高マイクロサテライト不安定性（M S I - H）またはミスマッチ修復欠損（d M M R）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び 4 0 k g の小児患者の高マイクロサテライト不安定性（M S I - H）またはミスマッチ修復欠損（d M M R）転移性結腸直腸癌を治療するために、約 2 4 0 m g で 2 週間投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、I L - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつか

40

50

かの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

【1728】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40 kg未満の小児患者の高マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで2週間投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び40 kg以上の小児患者の高マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブを1 mg/kgで3週間ごとに4回、その後240 mgで2週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び40 kg以上の小児患者の高マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブを1 mg/kgで3週間ごとに4回、その後480 mgで4週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

10

20

【1729】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約240 mgで2週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約480 mgで4週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために約1 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブを3 mg/kgで3週間ごとに4回、その後240 mgで2週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために約1 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブを3 mg/kgで3週間ごとに4回、その後480 mgで4週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

30

【1730】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、約240 mgで2週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、約480 mgで4週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

40

【1731】

他の実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ（KEYTRUDAとしてMerck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USAから市販されている

50

)、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、または変異体である。ペムプロリズマブにはC A S登録番号1374853-91-4が割り当てられており、ランプロリズマブ、MK-3475、及びSCH-900475としても知られている。ペムプロリズマブは、免疫グロブリンG4、抗(ヒトタンパク質PDCD1(プログラム細胞死1))(ヒト-ハツカネズミモノクローナル重鎖)、ヒト-ハツカネズミモノクローナル軽鎖とのジスルフィド、二量体構造を有する。ペムプロリズマブの構造は、免疫グロブリンG4、抗(ヒトプログラム細胞死1)ヒト化マウスモノクローナル[228-L-プロリン(H10-S>P)]4重鎖(134-218')-ジスルフィドとヒト化マウスモノクローナル軽鎖二量体(226-226':229-229')-ジスルフィドとも表現できる。ペムプロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第WO2008/156712A1号、米国特許第8,354,509号及び米国特許出願公開第US2010/0266617A1号、同第US2013/0108651A1号、及び同第US2013/0109843A2号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムプロリズマブの臨床的安全性と有効性は、Fuerst, Oncology Times, 2014, 36, 35-36; Robert, et al., Lancet, 2014, 384, 1109-17; 及びThomas, et al., Exp. Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 1061-1064に記載されている。ペムプロリズマブのアミノ酸配列を表20に示す。ペムプロリズマブには、次のジスルフィド架橋: 22~96、22'~96'、23'~92'、23''~92''、134~218'、134''~218''、138'~198'、138''~198''、147~203、147''~203''、226~226'、229~229'、261~321、261''~321''、367~425、及び367''~425''、ならびに次のグリコシル化部位(N): Asn-297及びAsn-297''が含まれる。ペムプロリズマブは、Fc領域に安定化S228P変異を有するIgG4/kappaアイソタイプであり、この変異をIgG4ヒンジ領域に挿入すると、IgG4抗体で通常観察される半分子の形成が妨げられる。ペムプロリズマブは、各重鎖のFcドメイン内のAsn297で不均一にグリコシル化されており、インタクトな抗体のおよそ149kDaの分子量を得る。ペムプロリズマブの主なグリコフォームは、フコシル化アガラクト二岐グリカンフォーム(GOF)である。

#### 【1732】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473によって与えられる重鎖、及び配列番号474によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473及び配列番号474にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473及び配列番号474にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473及び配列番号474にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473及び配列番号474にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473及び配列番号474にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473及び配列番号474にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

#### 【1733】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムプロリズマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号475に示される配列を含み、PD-1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号476に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの

30

40

50

実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号475及び配列番号476にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号475及び配列番号476にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号475及び配列番号476にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号475及び配列番号476にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号475及び配列番号476にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

10

**【1734】**

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号477、配列番号478、及び配列番号479にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号480、配列番号481、及び配列番号482にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じPD-1上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

**【1735】**

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムプロリズマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗PD-1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗PD-1抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はペムプロリズマブである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗PD-1抗体であり、抗PD-1抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はペムプロリズマブである。抗PD-1抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はペムプロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はペムプロリズマブである。

20

30

40

50

## 【表 20 - 1】

表 20. ペムブロリズマブに関連する PD-1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 473 ペムブロリ ズマブ重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTFN 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPEKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPSSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
配列番号 474 ペムブロリ ズマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSLGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLAAYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL 180 STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218
配列番号 475 ペムブロリ ズマブ可変 重鎖	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTFN 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
配列番号 476 ペムブロリ ズマブ可変 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSLGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLAAYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 477 ペムブロリ ズマブ重鎖 CDR1	NYMY 5
配列番号 478 ペムブロリ ズマブ重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEKFK 16

10

20

30

40

50

【表 20 - 2】

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 479 ペムブロリ ズマブ重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y 11
配列番号 480 ペムブロリ ズマブ軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
配列番号 481 ペムブロリ ズマブ軽鎖 CDR2	LASYLES 7
配列番号 482 ペムブロリ ズマブ軽鎖 CDR3	QHSRDLPLT 9

10

20

## 【1736】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤はペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤はペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

30

40

## 【1737】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤はペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは約 200 mg ~ 約 500 mg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤はペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約 200 mg、約 220 mg、約 240 mg、約 260 mg、約 280 mg、約 300 mg、約 320 mg、約 340 mg、約 360 mg、約 380 mg、約 400 mg、約 420 mg、約 440 mg、約 460 mg、約 480 mg、または約 500 mg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、

50

ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

【1738】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤はペムプロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムプロリズマブは2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、または6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

10

【1739】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、黒色腫を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、黒色腫を治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

20

【1740】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはNSCLCを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、NSCLCを治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、NSCLCを治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

30

【1741】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、小細胞肺癌（SCLC）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、SCLCを治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、SCLCを治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを

40

50

得る前に)投与することもできる。

【1742】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

10

【1743】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫(cHL)または原発性縦隔大B細胞リンパ腫(PMBCL)を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫(cHL)または原発性縦隔大B細胞リンパ腫(PMBCL)を治療するために、成人に対して約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫(cHL)または原発性縦隔大B細胞リンパ腫(PMBCL)を治療するために、小児に対して約2mg/kg(最大200mg)で3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

20

【1744】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

30

【1745】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、マイクロサテライト不安定性が高い(MSI-H)癌またはミスマッチ修復欠損(dMMR)癌を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-HまたはdMMR癌を治療するために、成人に対して約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-HまたはdMMR癌を治療するために、小児に対して2mg/kg(最大200mg)で3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者か

40

50

ら腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

10

【1746】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、マイクロサテライト不安定性が高い(MSI-H)癌またはミスマッチ修復欠損大腸癌(dMMRCRC)を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、MSI-HまたはdMMRCRCを治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

20

【1747】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、胃癌を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、胃癌を治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

30

【1748】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、食道癌を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、食道癌を治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

40

【1749】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、また

50

は3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

【1750】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（HCC）を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HCCを治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

10

【1751】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（MCC）を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、小児に対して2mg/kg（最大200mg）で3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

20

30

【1752】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（RCC）を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、RCCを治療するために、アキシチニブ5mgの1日2回経口投与と一緒に、約400mgで6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、3、4、または5日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブの投与は、IL-2投与の1、2、または3日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、3、4、または5週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

40

【1753】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、約200mgで3週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、MSI-HまたはdMMRではない腫瘍に対して、レンパチニ

50

ブ 20 mg の 1 日 1 回経口投与と一緒に、約 400 mg で 6 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。

【 1 7 5 4 】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、腫瘍変異負担高（TMB - H）癌を治療するために、成人に対して約 200 mg で 3 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、TMB - H 癌を治療するために、約 400 mg で 6 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、TMB - H 癌を治療するために、小児に対して 2 mg / kg（最大 200 mg）で 3 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サン

10

20

【 1 7 5 5 】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、有棘細胞癌（cSCC）を治療するために、約 200 mg で 3 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、cSCC を治療するために、約 400 mg で 6 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サン

30

【 1 7 5 6 】

いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）を治療するために、約 200 mg で 3 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブは、TNBC を治療するために、約 400 mg で 6 週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に）投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、または 3 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サン

40

【 1 7 5 7 】

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人、すなわち、成人適応症の治療である場合、400 mg で 6 週間ごとの追加の投薬レジメンを採用することができる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、3、4、または 5 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブの投与は、IL - 2 投与の 1、2、または 3 日後に開始される。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の 1、2、3、4、または 5 週間前に（すなわち、対象または患者から腫瘍サン

50

ブルを得る前に)投与することもできる。いくつかの実施形態では、ペムプロリズマブはまた、切除の1、2、または3週間前に(すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前に)投与することもできる。

【1758】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、抗m-PD-1クローンJ43(Cat#BE0033-2)及びRMP1-14(Cat#BE0146)(BioXCell, Inc., West Lebanon, NH, USA)などの市販される抗PD-1モノクローナル抗体である。多くの市販の抗PD-1抗体が当業者に既知である。

【1759】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,354,509号または米国特許出願公開第2010/0266617A1号、同2013/0108651A1号、同2013/0109843A2号に記載され、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、抗PD-1抗体、米国特許第8,287,856号、同第8,580,247号、及び同第8,168,757号、ならびに米国特許出願公開第2009/0028857A1号、同第2010/0285013A1号、同第2013/0022600A1号、及び同第2011/0008369A1号に記載され、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,735,553B1号に開示される抗PD-1抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,686,119号に記載されるCT-011としても知られるピディリズマブであり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1760】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,907,053号、同第9,096,642号及び同第9,044,442号ならびに米国特許出願公開第US2015/0087581号に記載のものなどの小分子またはペプチド、またはペプチド誘導体；例えば、米国特許出願公開第2015/0073024号に記載されるものなどの1,2,4-オキサジアゾール化合物及び誘導体；例えば、米国特許出願公開第US2015/0073042号に記載されるものなどの環状ペプチドミメティック化合物及び誘導体；米国特許出願公開第US2015/0125491号に記載のものなどの環状化合物及び誘導体；例えば国際特許出願公開第WO2015/033301号に記載されるものなどの1,3,4-オキサジアゾール及び1,3,4-チアジアゾール化合物及び誘導体；国際特許出願公開第WO2015/036927及びWO2015/04490に記載のものなどのペプチドベースの化合物及び誘導体、または、米国特許出願公開第US2014/0294898号に記載されるものなどの大環状ペプチドベースの化合物及び誘導体であり得、これらのそれぞれの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【1761】

いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、当技術分野で既知である任意のPD-L1またはPD-L2阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、これは、以下の段落でより詳細に説明するPD-L1またはPD-L2阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤の1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、PD-L1またはPD-L2阻害剤に関して、本明細書では交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるPD-L1またはPD-L2阻害剤に対する本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、変異体、コンジュゲート、またはバイオシミラーを指し得る。疑義を避けるために、本明細書におけるPD-L1またはPD-L2阻害剤への言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、またはプロドラッグを指し得る。

【1762】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス及び方法は、PD-L1またはPD-L2阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2

阻害剤は小分子である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、抗体（すなわち、抗PD-1抗体）、Fab断片を含むその断片、またはその単鎖可変断片（scFv）である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤はポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、PD-L1またはPD-L2との結合について競合し、及び/またはPD-L1またはPD-L2上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、PD-L1またはPD-L2との結合について競合する、及び/またはPD-L1またはPD-L2上のエピトープに結合する。

#### 【1763】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L1阻害剤は、化合物が、PD-L2受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でPD-L1と結合または相互作用するという点で、PD-L1に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、PD-L2受容体に結合するよりも、少なくとも約2倍高い濃度、約3倍高い濃度、約5倍高い濃度、約10倍高い濃度、約20倍高い濃度、約30倍高濃度、約50倍高濃度、約100倍高濃度、約200倍高い濃度、約300倍高い濃度、または約500倍高い濃度である結合定数でPD-L1受容体に結合する。

#### 【1764】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L2阻害剤は、化合物が、PD-L2受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でPD-L1と結合または相互作用するという点で、PD-L2に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、PD-L1受容体に結合するよりも、少なくとも約2倍高い濃度、約3倍高い濃度、約5倍高い濃度、約10倍高い濃度、約20倍高い濃度、約30倍高濃度、約50倍高濃度、約100倍高濃度、約200倍高い濃度、約300倍高い濃度、または約500倍高い濃度である結合定数でPD-L2受容体に結合する。

#### 【1765】

いかなる理論にも拘束されるものではないが、腫瘍細胞はPD-L1を発現し、T細胞はPD-1を発現すると考えられている。ただし、腫瘍細胞によるPD-L1発現は、PD-1またはPD-L1阻害剤または遮断剤の有効性に必要ではない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、PD-L1を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞はPD-L1を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、TILと組み合わせた、本明細書に記載のものなどのPD-1及びPD-L1抗体の組み合わせを含むことができる。PD-1及びPD-L1抗体とTILの組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

#### 【1766】

いくつかの実施形態では、PD-L1及び/またはPD-L2阻害剤は、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約100 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約90 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約80 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約70 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約60 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約50 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約40 pM以下のKDで結合する、ヒトPD-L1及び/またはPD-L2を約30 pM以下のKDで結合するものである。

#### 【1767】

いくつかの実施形態では、PD-L1及び/またはPD-L2阻害剤は、約 $7.5 \times 10^5$  1/M・s以上の速さのkassocでヒトPD-L1及び/またはPD-L2に結合する、約 $8 \times 10^5$  1/M・s以上の速さのkassocでヒトPD-L1及び/またはPD-L2に結合する、約 $8.5 \times 10^5$  1/M・s以上の速さのkassocでヒトPD-L1及び/またはPD-L2に結合する、約 $9 \times 10^5$  1/M・s以上の速さのkassocでヒトPD-L1及び/またはPD-L2に結合する、約 $9.5 \times 10^5$  1/M・s以上の速さのkassocでヒトPD-L1及び/またはPD-L2に結合する、

10

20

30

40

50

約  $1 \times 10^6$  / M · s 以上の速さの *k* *a* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - L 1 及び / または PD - L 2 に結合するものである。

【 1 7 6 8 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 及び / または PD - L 2 阻害剤は、約  $2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.1 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.2 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.3 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.4 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.5 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.6$  10  
 $2 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $2.7$   
 $7 \times 2 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合する、約  $3$   
 $3 \times 10^{-5}$  / s 以下の速さの *k* *d* *i* *s* *s* *o* *c* でヒト PD - 1 に結合するものである。

【 1 7 6 9 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 及び / または PD - L 2 阻害剤は、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 10 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 9 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 8 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 7 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 6 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 5 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 4 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 3 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、ヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 2 nM 以下の IC 50 で遮断または阻害する、またはヒト PD - L 1 を遮断する、またはヒト PD - L 1 またはヒト PD - L 2 のヒト PD - 1 への結合を約 1 nM 以下の IC 50 で遮断するものである。 20

【 1 7 7 0 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 阻害剤は、MED I 4 7 3 6 としても知られるデュルバルマブ (これは、A s t r a Z e n e c a p l c . の子会社である M e d i m m u n e , L L C 、 G a i t h e r s b u r g 、 M a r y l a n d から市販されている)、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは変異体である。いくつかの実施形態では、PD - L 1 阻害剤は、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号または米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 3 4 5 5 9 号に記載される抗体であり、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床効果は、Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185 - 202; Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (supplement, abstract 8021); 及び McDermott, et al., Cancer Treatment Rev., 2014, 40, 1056 - 64 に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第 8 , 7 7 9 , 1 0 8 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表 2 1 に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、2 2 ~ 9 6、2 2 ' ' ~ 9 6 ' '、2 3 ' ~ 8 9 '、2 3 ' ' ' ~ 8 9 ' ' '、1 3 5 ' ~ 1 9 5 '、1 3 5 ' ' ' ~ 1 9 5 ' ' '、1 4 8 - 2 0 4、1 4 8 ' ' - 2 0 4 2 1 5 ' - 2 2 4、2 1 5 ' ' ' - 2 2 4 ' '、2 3 0 - 2 3 0 ' '、2 3 3 - 2 3 3 ' '、2 6 5 3 2 5、2 6 5 ' ' - 3 2 5 ' '、3 7 1 - 4 2 9、及び 3 7 1 ' ' - 4 2 9 ' ' ジスルフィド結合; A s n - 3 0 1 及び A s n - 3 0 1 ' ' に N - グリコシル化部位を含む。 40

【 1 7 7 1 】

いくつかの実施形態では、PD - L 1 阻害剤は、配列番号 4 8 3 によって与えられる重 50

鎖、及び配列番号484によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483及び配列番号484にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483及び配列番号484にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483及び配列番号484にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483及び配列番号484にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483及び配列番号484にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483及び配列番号484にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

#### 【1772】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号485に示される配列を含み、PD-L1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号486に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号485及び配列番号486にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号485及び配列番号486にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号485及び配列番号486にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号485及び配列番号486にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号485及び配列番号486にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

20

30

#### 【1773】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号487、配列番号488、及び配列番号489にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号490、配列番号491、及び配列番号492にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じPD-L1上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

#### 【1774】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、デュルバルマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗PD-L1抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はデュルバルマブである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤

40

50

はデュルバルマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はデュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はデュルバルマブである。

## 【表21-1】

表21. デュルバルマブに関連するPD-L1阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 483 デュルバル マブ重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGESEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEGLAFDY WQQTGLVTVS 120 SASTKGFSEVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFFAVLQS 180 SGLYSLSSTV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKE SNTKVDKRVE FKSCDKTHTC PFCPEPEFEG 240 GPSVFLFFPK FKDTILMISRT FEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIEKTI SKARGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSPFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 484 デュルバル マブ 軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLLPWFQ QGTRKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNFF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265
配列番号 485 デュルバル マブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGESEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEGLAFDY WQQTGLVTVS 120 S 121
配列番号 486 デュルバル マブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLLPWFQ QGTRKVEIK 108
配列番号 487 デュルバル マブ 重鎖 CDR1	RYWMS 5
配列番号 488 デュルバル マブ 重鎖 CDR2	NIKQDGESEKY YVDSVKG 17

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 489 デュルバル マブ 重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY	12
配列番号 490 デュルバル マブ 軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA	12
配列番号 491 デュルバル マブ 軽鎖 CDR2	DASSRAT	7
配列番号 492 デュルバル マブ 軽鎖 CDR3	QQYGSLPWT	9

10

20

## 【1775】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MSB0010718Cとしても知られるアベルマブ (Merck KGaA / EMD Serono から市販されている)、またはその抗原結合断片、コンジュゲート、または変異体である。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第US2014/0341917A1に記載されており、その開示は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表22に示す。アベルマブは、22~96、147~203、264~324、370~428、22'~96''、147''~203''、264''~324''、及び370''~428''重鎖間ジスルフィド結合 (C23~C104)；22''~90''、138''~197''、22''~90''、及び138''~197''軽鎖間ジスルフィド結合 (C23~C104)；223~215'及び223''~215''に重軽鎖間ジスルフィド結合 (h5-CL126)；229~229''及び232-232''に重重鎖間ジスルフィド結合 (h11、h14)；300、300''にN-グリコシル化部位 (HCH2N84.4)、フコシル化複合バイアンテナCHO型グリカン；ならびに450及び450'にHCHSK2C末端リジンクリッピングを有する。

30

42

42

42

40

40

## 【1776】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号493によって与えられる重鎖、及び配列番号494によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号493及び配列番号494にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片 (scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号493及び配列番号494にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列

50

番号 493 及び配列番号 494 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 493 及び配列番号 494 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 493 及び配列番号 494 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 493 及び配列番号 494 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1777】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖の CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 495 に示される配列を含み、PD-L1 阻害剤軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 496 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 495 及び配列番号 496 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 496 及び配列番号 496 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 495 及び配列番号 496 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 495 及び配列番号 496 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 96% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 495 及び配列番号 496 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 95% 同一である VH 及び VL 領域を含む。

【1778】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 497、配列番号 498、及び配列番号 499 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびに、配列番号 500、配列番号 501、及び配列番号 502 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じ PD-L1 上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

【1779】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、アベルマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗 PD-L1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗 PD-L1 抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して 1 つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はアベルマブである。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗 PD-L1 抗体であり、抗 PD-L1 抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はアベルマブである。抗 PD-L1 抗体は、米国 FDA 及び/または欧州連合の EMA などの医薬品規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はアベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬

10

20

30

40

50

品または参照生物学的製剤はアベルマブである。

【表 2 2 - 1】

表 2 2. アベルマブに関連する P D - L 1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 493 アベルマブ 重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 240 PSVFLFPPKPK KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 494 アベルマブ 軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLM IYDVSNRPSGV 60 SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPSSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVT AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
配列番号 495 アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120
配列番号 496 アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLM IYDVSNRPSGV 60 SNRFGSKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGKVTVL 110
配列番号 497 アベルマブ 重鎖 CDR1	SYIMM 5
配列番号 498 アベルマブ 重鎖 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG 17
配列番号 499 アベルマブ 重鎖 CDR3	IKLGTVTTVD Y 11

10

20

30

40

50

【表 2 2 - 2】

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 500 アベルマブ 軽鎖 CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号 501 アベルマブ 軽鎖 CDR2	DVSNRPS	7
配列番号 502 アベルマブ 軽鎖 CDR3	SSYTSSSTRV	10

10

## 【1780】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MPDL3280AまたはRG7446としても知られるアテゾリズマブ (Roche Holding AGの子会社 Genentech, Inc. Basel, Switzerland から TECENTRIQ として市販されている)、または抗原結合断片、結合体、もしくはその変種である。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許第 8,217,149号に開示されている抗体であり、その開示は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許出願公開第 2010/0203056A1号、同第 2013/0045200A1号、同第 2013/0045201A1号、同第 2013/0045202A1号、または同第 2014/0065135A1号に開示された抗体であり、それらの開示は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第 8,217,149号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表 23 に示す。アテゾリズマブは、22~96、145~201、262~322、368~426、22'~96'、145'~201'、262'~322'、及び 368'~426'、ジスルフィド結合 (C23~C104)、23'~88'、134'~194'、23'''~88'''、及び 134'''~194''' に軽鎖間ジスルフィド結合 (C23~C104) ; 221~214' 及び 221'''~214''' に重軽鎖間ジスルフィド結合 (h5-CL126) ; 227~227' 及び 230~230' に重重鎖間ジスルフィド結合 (h11、h14) )、ならびに 298 及び 298' に N-グリコシル化部位 (HCH2N84.4>A) を有する。

20

30

40

## 【1781】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号 503 によって与えられる重鎖、及び配列番号 504 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号 503 及び配列番号 504 にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片 (scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号 503 及び配列番号 504 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号 503 及び配列番号 504 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号 503 及び配列番号 504 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 97% 同

50

一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号503及び配列番号504にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号503及び配列番号504にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

#### 【1782】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号505に示される配列を含み、PD-L1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号506に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号505及び配列番号506にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号505及び配列番号506にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号505及び配列番号506にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号505及び配列番号506にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号505及び配列番号506にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。

#### 【1783】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号507、配列番号508、及び配列番号509にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号510、配列番号511、及び配列番号512にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じPD-L1上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

#### 【1784】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アテゾリズマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗PD-L1抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はアテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はアテゾリズマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はアテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はアテゾリズマブである。

10

20

30

40

50

## 【表 2 3 - 1】

表 2 3. アテゾリズマブに関連する PD-L1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 503 アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
配列番号 504 アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYQCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIIPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY BREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
配列番号 505 アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLTVSA 118
配列番号 506 アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYQCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
配列番号 507 アテゾリズマブ 重鎖 CDR1	GFTFSDSWIH 10
配列番号 508 アテゾリズマブ 重鎖 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号 509 アテゾリズマブ 重鎖 CDR3	RHWPGGFDY 9

10

20

30

40

50

【表 2 3 - 2】

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)	
配列番号 510 アテゾリズマ ブ 軽鎖 CDR1	RASQDVSTAV A	11
配列番号 511 アテゾリズマ ブ 軽鎖 CDR2	SASFLYS	7
配列番号 512 アテゾリズマ ブ 軽鎖 CDR3	QQYLYHPAT	9

10

## 【1785】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許出願公開第US2014/0341917A1号に記載される抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、PD-L1への結合についてこれらの抗体のいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、BMS-935559としても知られるMDX-1105であり、これは米国特許第7,943,743号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,943,743号に開示される抗PD-L1抗体から選択される。

20

## 【1786】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、INVIVOMAB抗-m-PD-L1 clone 10F.9G2 (カタログ#BE0101, BioXCell, Inc., West Lebanon, NH, USA)などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、AFFYMETRIX EBIO SCIENCE (MIH1)などの市販のモノクローナル抗体である。多くの市販の抗PD-L1抗体が当業者に既知である。

30

## 【1787】

いくつかの実施形態では、PD-L2阻害剤は、BIOLEGEND 24F.10C12マウスIgG2a、アイソタイプ (カタログ#329602 Biolegend, Inc., San Diego, CA)、SIGMA抗PD-L2抗体 (カタログ#SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)、または当業者に既知の他の市販の抗PD-L2抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

40

## 【1788】

## 4. CTLA-4阻害剤

いくつかの実施形態では、がん罹患した患者に提供されるTIL治療は、治療用のTIL集団のみによる治療を含み得るか、またはTIL及び1つまたは複数のCTLA-4阻害剤を含む併用治療を含み得る。

## 【1789】

細胞傷害性Tリンパ球抗原4 (CTLA-4) は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーT細胞の表面に発現する。CTLA-4は、CD28依存性T細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。T細胞共刺激タンパク質CD28と同様に、CTLA-4結合抗原は細胞上にCD80と

50

CD86を提示す。CTLA-4は抑制シグナルをT細胞に伝達し、CD28は刺激シグナルを伝達する。ヒトCTLA-4に対するヒト抗体は、ウイルス感染や細菌感染の治療や予防、癌の治療など、多くの疾患状態における免疫刺激モジュレーターとして記載されている(WO01/14424及びWO00/37504)。様々な前臨床研究で、モノクローナル抗体などのCTLA-4阻害剤によるCTLA-4遮断が、免疫原性腫瘍に対する宿主の免疫応答を増強し、確立された腫瘍を除外することさえできることが示されている。多くの完全ヒト抗ヒトCTLA-4モノクローナル抗体(mAbs)が、イピリムマブ(MDX-010)及びトレメリムマブ(CP-675,206)を含むがこれらに限定される様々なタイプの個体腫瘍の治療に関する臨床試験が研究されている。

#### 【1790】

10

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、当技術分野で知られている任意のCTLA-4阻害剤またはCTLA-4遮断剤であり得る。特に、これは、以下の段落でより詳細に説明するCTLA-4阻害剤または遮断剤の1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、CTLA-4阻害剤に関して、本明細書では交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるCTLA-4阻害剤に対する本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、変異体、コンジュゲート、またはバイオシミラーを指し得る。疑義を避けるために、本明細書におけるCTLA-4阻害剤への言及は、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、またはプロドラッグを指し得る。

#### 【1791】

20

本発明の方法での使用に適したCTLA-4阻害剤には、抗CTLA-4抗体、ヒト抗CTLA-4抗体、マウス抗CTLA-4抗体、哺乳動物抗CTLA-4抗体、ヒト化抗CTLA-4抗体、モノクローナル抗CTLA-4抗体、ポリクローナル抗CTLA-4抗体、キメラ抗CTLA-4抗体、MDX-010(イピリムマブ)、トレメリムマブ、抗CD28抗体、抗CTLA-44アドネクチン、抗CTLA-4ドメイン抗体、単鎖抗CTLA-4断片、重鎖抗CTLA-4断片、軽鎖抗CTLA-4断片、共刺激経路を刺激するCTLA-4の阻害剤、PCT公開第WO2001/014424号に開示される抗体、PCT公開第WO2004/035607号に開示される抗体、米国公開第2005/0201994号に開示される抗体、付与された欧州特許第EP1212422B1号に開示される抗体を含むがこれらに限定されず、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。追加のCTLA-4抗体は、米国特許第5,811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号、及び同第6,984,720号；PCT公開第WO01/14424号及び同第WO00/37504号；及び米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086014号に記載され、それぞれの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で使用できる他の抗CTLA-4抗体には、例えば、WO98/42752；米国特許第6,682,736号及び第6,207,156号；Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071(1998)；Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505(2004)(antibody CP-675206)；Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304(1998)、及び米国特許第5,977,318号、同第6,682,736号、同第7,109,003及び同第7,132,281号に開示されるものが含まれ、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

#### 【1792】

追加のCTLA-4阻害剤には以下が含まれるが、これらに限定されない：CD28抗原のその同族リガンドに結合する能力、CTLA-4のその同族リガンドに結合する能力、共刺激経路を介してT細胞応答を増強する、B7のCD28及び/またはCTLA-4に結合する能力を妨害する、B7の共刺激経路を活性化する能力を妨害する、CD80のCD28及び/またはCTLA-4に結合する能力を妨害する、CD80の共刺激経路を

50

活性化する能力を妨害する、CD86のCD28及び/またはCTLA-4に結合する能力を妨害する、CD86の共刺激経路を活性化する能力を妨害する、及び、共刺激経路を一般に活性化から妨害することが可能である任意の阻害剤。これには、共刺激経路の他のメンバーの中でも、CD28、CD80、CD86、CTLA-4の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーの中でも特に、CD28、CD80、CD86、CTLA-4に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーの中でも特に、CD28、CD80、CD86、CTLA-4に対するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーの中でも特にCD28、CD80、CD86、CTLA-4に対するアドネクチン、共刺激経路の他のメンバー、他のCTLA-4阻害剤の中でも特にCD28、CD80、CD86、CTLA-4のRNAi阻害剤（一本鎖及び二本鎖の両方）を必ず含む。

10

#### 【1793】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、約 $10^{-6}$ M以下、 $10^{-7}$ M以下、 $10^{-8}$ M以下、 $10^{-9}$ M以下、 $10^{-10}$ M以下、 $10^{-11}$ M以下、 $10^{-12}$ M以下、例えば、 $10^{-13}$ M~ $10^{-16}$ M、またはエンドポイントとして前述の値の任意の2つを有する任意の範囲内のKdでCTLA-4に結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのKdの10倍以下のKdでCTLA-4に結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのKdとほぼ同じかそれ以下（例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い）のKdでCTLA-4に結合する。いくつかの実施形態では、同じアッセイを使用して比較した場合、CD80またはCD86へのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、それぞれCD80またはCD86へのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介阻害のIC50値より10倍以下大きい。いくつかの実施形態では、同じアッセイを使用して比較した場合、CD80またはCD86へのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、それぞれCD80またはCD86へのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介阻害のIC50値とほぼ同じであるか、それ以下である（例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い）。

20

#### 【1794】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、発現を阻害するのに十分な量及び/またはCTLA-4の生物学的活性を、適切な対象と比較して、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%、例えば50%~75%、75%~90%、または90%~100%減少させる量で使用される。いくつかの実施形態では、CTLA-4経路阻害剤は、CTLA-4のCD80、CD86、またはその両方への結合を、適切な対象と比較して、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または100%、例えば50%~75%、75%~90%、または90%~100%減少させることによって、CTLA-4の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象の薬剤の効果を評価または定量化する状況における適切な対照は、典型的には、対象の薬剤、例えばCTLA-4経路阻害剤によって暴露または治療されていない（またはごくわずかな量に暴露された、または治療された）同等の生体系（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生体系は、それ自体の対照として機能し得る（例えば生体系は、薬剤によって暴露または治療される前に評価され、暴露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。一部の実施形態では、履歴対照を使用することができる）。

30

40

#### 【1795】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブ（Bristol-Myers Squibb Co. からYervoyとして市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは変異体である。当技術分野で既知であるように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するために重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒトIgG1抗体である抗CTLA-4抗体を指す。イピリムマブは、CAS登録番号4772

50

02-00-9及びPCT公開番号WO01/14424でも参照でき、これは、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。これは抗体10DIとして開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号516を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号515を含む重鎖可変領域を有する）を含む。CTLA-4に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部位を表す。イピリムマブの医薬組成物には、イピリムマブ及び1つまたは複数の希釈剤、ビヒクル及び/または賦形剤を含むすべての薬学的に受容される組成物を含む。イピリムマブを含有する医薬組成物の例は、PCT公開番号WO2007/67959に記載されている。イピリムマブは静脈内（IV）に投与することができる。

【1796】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513によって与えられる重鎖、及び配列番号514によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513及び配列番号514にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片（scFv）、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513及び配列番号514にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513及び配列番号514にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513及び配列番号514にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513及び配列番号514にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513及び配列番号514にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1797】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤重鎖可変領域（VH）は、配列番号515に示される配列を含み、CTLA-4阻害剤軽鎖可変領域（VL）は、配列番号516に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号515及び配列番号516にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号515及び配列番号516にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号515及び配列番号516にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号515及び配列番号516にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号515及び配列番号516にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

【1798】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号517、配列番号518、及び配列番号519にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号520、配列番号521、及び配列番号522にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じCTLA-4上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

【1799】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗CTLA-4バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗CTLA-4抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はイピリムマブである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗CTLA-4抗体であり、抗CTLA-4抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はイピリムマブである。抗CTLA-4アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はイピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はイピリムマブである。

10

20

30

40

50

## 【表 2 4】

表 2 4. イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 513 イピリムマブ 重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNKKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFYDWGQ GTLVTVSSAS 121 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 181 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTH
配列番号 514 イピリムマブ 軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP 121 PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL 181 TLSKADYEKH KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC
配列番号 515 イピリムマブ 可変重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF ISYDGNKKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG WLGPFYDWGQ GTLVTVSS
配列番号 516 イピリムマブ 可変軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG QGTKVEIK
配列番号 517 イピリムマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYT 8
配列番号 518 イピリムマブ 重鎖 CDR2	TFISYDGNKK 10
配列番号 519 イピリムマブ 重鎖 CDR3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号 520 イピリムマブ 軽鎖 CDR1	QSVGSSY 7
配列番号 521 イピリムマブ 軽鎖 CDR2	GAF 3
配列番号 522 イピリムマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT 9

10

20

30

40

## 【1800】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤はイピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤はイピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与

50

される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

【1801】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤はイピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤はイピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

10

【1802】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤はイピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、または6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

20

【1803】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、mg/kgで3週間ごとに最大4用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

30

【1804】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために約10mg/kgで3週間ごとに4回、その後10mg/kgで12週間ごとに最長3年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

【1805】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行腎細胞癌を治療するために、同日のニボルマブ3mg/kgの直後に約1mg/kgで3週間ごとに4回投与される。いくつかの実施形態では、組み合わせの4回の投与を完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び/または腎細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与することができる。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

40

【1806】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高マイクロサテライト不安定性(MSI-

50

H) またはミスマッチ修復欠損 (dMMR) 転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) またはミスマッチ修復欠損 (dMMR) 転移性結腸直腸癌を治療するために、同日に30分かけて静脈内投与されるニボルマブ3mg/kgの直後に、約1mg/kgで3週間ごとに4回、30分かけて静脈内投与される。いくつかの実施形態では、組み合わせの4回の投与を完了した後、ニボルマブを、高マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) またはミスマッチ修復欠損 (dMMR) 転移性結腸直腸癌のための標準的な投薬レジメンで推奨される単剤として投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。

10

## 【1807】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、同日に30分かけて静脈内投与されるニボルマブ3mg/kgの直後に、約1mg/kgで3週間ごとに4回、30分かけて静脈内投与される。いくつかの実施形態では、組み合わせの4回の投与が完了した後、ニボルマブを、肝細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。

20

## 【1808】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、約1mg/kgで6週間ごとに、一緒にニボルマブを3mg/kgで2週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために1mg/kgで6週間ごとに、一緒にニボルマブを360mgで3週間ごと、及び2サイクルのプラチナダブレット化学療法で投与するいくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。

30

## 【1809】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために1mg/kgで6週間ごとに、一緒にニボルマブを360mgで3週間ごとに投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前 (すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前) に開始される。

40

## 【1810】

トレメリムマブ (CP-675, 206としても知られる) は、完全ヒトIgG2モノクローナル抗体であり、CAS番号745013-59-6を有する。トレメリムマブは、米国特許第6,682,736号 (参照により本明細書に組み込まれる) において抗体11.2.1として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、配列番号: N O s : x x 及び x x、それぞれ示す。トレメリムマブは、メラノーマや乳癌を含む様々な腫瘍の治療の臨床試験で調査されており、そこでは、トレメリムマブは、0.01~15mg/kgの用量範囲で、4週間または12週間ごとに単回または複数回静脈内投与されている。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは局所的

50

に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下に投与されるトレメリムマブの有効量は、通常、1人当たり5～200mg/1回分の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、1人当たり10～150mg/1回分の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、1人当たり約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175、または200mg/1回分である。

#### 【1811】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523によって与えられる重鎖、及び配列番号524によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523及び配列番号524にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523及び配列番号524にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523及び配列番号524にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523及び配列番号524にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523及び配列番号524にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523及び配列番号524にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

20

#### 【1812】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のCDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号525に示される配列を含み、CTLA-4阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号526に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号525及び配列番号526にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号525及び配列番号526にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号525及び配列番号526にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号525及び配列番号526にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号525及び配列番号526にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

30

#### 【1813】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号527、配列番号528、及び配列番号529にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびに、配列番号530、配列番号531、及び配列番号532にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じCTLA-4上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

40

#### 【1814】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗CTLA-4バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配

50

列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗CTLA-4抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して1つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はトレメリムマブである。いくつかの実施形態では、1つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗CTLA-4抗体であり、抗CTLA-4抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はトレメリムマブである。抗CTLA-4アゴニスト抗体は、米国FDA及び/または欧州連合のEMAなどの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はトレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はトレメリムマブである。

10

20

30

40

50

## 【表 2 5】

表 2 5. トレメリムマブの amino 酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 523 トレメリムマブ 重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY 61 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT 121 VIVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 181 VLQSSGLYSL SSVVTVFSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVERKCCVE CPPCPAPPVA 241 GESVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 301 NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 361 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPE MLDSDSGFFL YSKLTVDKSR 421 WQQGNVFCSS VMHEALHNYH TQKSLSLSPG K
配列番号 524 トレメリムマブ 軽鎖	1 DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQIN SYLDWYQQK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 61 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVPFIFFP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
配列番号 525 トレメリムマブ 可変重鎖	1 GVVQPGRSLR LSCAASGFTF SSYGMHWVRQ AFGKLEWVA VIWYDGSNKY YADSVKGRFT 61 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 121 GESVFLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH
配列番号 526 トレメリムマブ 可変軽鎖	1 PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFSGSGS 61 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 121 GTASVVCLLN NFYPREAKV
配列番号 527 トレメリムマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYGMH 10
配列番号 528 トレメリムマブ 重鎖 CDR2	VIWYDGSNKY YADSV 15
配列番号 529 トレメリムマブ 重鎖 CDR3	DPRGATLYYY YGMDV 16
配列番号 530 トレメリムマブ 軽鎖 CDR1	RASQSINSYL D 11
配列番号 531 トレメリムマブ 軽鎖 CDR2	AASSLQS 7
配列番号 532 トレメリムマブ 軽鎖 CDR3	QQYYSTPFT 9

10

20

30

40

## 【1 8 1 5】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤はトレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤はトレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用

50

量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

【1816】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤はトレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤はトレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの投与は、切除の1、2、3または週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

10

【1817】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤はトレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは2週間ごと、3週間ごと、4週間ごと、5週間ごと、または6週間ごとに投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの投与は、切除の1、2、3、4、または5週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブの投与は、切除の1、2、または3週間前（すなわち、対象または患者から腫瘍サンプルを得る前）に開始される。

20

【1818】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、Adgenus由来のザリフレリマブ(zalifrelimab)、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、コンジュゲート、もしくは変異体である。ザリフレリマブは完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Chemical Abstracts Service(CAS)登録番号2148321-69-9が割り当てられており、AGEN1884としても知られる。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第10,144,779号及び米国特許出願公開第US2020/0024350 A1に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【1819】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533によって与えられる重鎖、及び配列番号534によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533及び配列番号534にそれぞれ示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、変異体、またはコンジュゲートを含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533及び配列番号534にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533及び配列番号534にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533及び配列番号534にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533及び配列番号534にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533及び配列番号534にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

40

【1820】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のC

50

D R または可変領域 ( V R ) を含む。いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤重鎖可変領域 ( V H ) は、配列番号 5 3 5 に示される配列を含み、 C T L A - 4 阻害剤軽鎖可変領域 ( V L ) は、配列番号 5 3 6 に示される配列及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、配列番号 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 9 9 % 同一である V H 及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、配列番号 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 9 8 % 同一である V H 及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、配列番号 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 9 7 % 同一である V H 及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、配列番号 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 9 6 % 同一である V H 及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、配列番号 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 にそれぞれ示される配列に対して各々が少なくとも 9 5 % 同一である V H 及び V L 領域を含む。

10

#### 【 1 8 2 1 】

いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、及び配列番号 5 3 9 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、ならびに、配列番号 5 4 0、配列番号 5 4 1、及び配列番号 5 4 2 にそれぞれ示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のいずれかと同じ C T L A - 4 上のエピトープと一緒に結合することを競合する、及び/またはそれに結合する。

20

#### 【 1 8 2 2 】

いくつかの実施形態では、 C T L A - 4 阻害剤は、ザリフレリマブに関して医薬品規制当局によって承認された抗 C T L A - 4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照生物学的製剤のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、抗 C T L A - 4 抗体を含み、それは参照医薬品または参照生物学的製剤と比較して 1 つまたは複数の翻訳後修飾を含み、参照医薬品または参照生物学的製剤はザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、1 つまたは複数の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つまたは複数から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、承認された、または承認のために提出された抗 C T L A - 4 抗体であり、抗 C T L A - 4 抗体は、参照医薬品または参照生物学的製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照生物学的製剤はザリフレリマブである。抗 C T L A - 4 アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び/または欧州連合の E M A などの医薬品規制当局によって承認されている場合がある。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つまたは複数の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つまたは複数の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的製剤に含まれる賦形剤と同じかまたは異なり、参照医薬品または参照生物学的製剤はザリフレリマブである。

30

40

## 【表 2 6】

表 2 6. ザリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列 (一文字アミノ酸記号)
配列番号 533 ザリフレリマブ重鎖	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSSAS 121 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 181 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKRVFPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 241 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 301 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 361 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 421 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
配列番号 534 ザリフレリマブ軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQK QAPRLLIYG ASTRATGIPD 61 RFGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWFPGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT 181 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK
配列番号 535 ザリフレリマブ可変重鎖	1 EVOLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVG LMGPFDIWGQ GTMVTVSS
配列番号 536 ザリフレリマブ可変軽鎖	1 EIVLTOSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLGWYQQK QAPRLLIYG ASTRATGIPD 61 RFGSGSGTD FTLTITRLEP EDFAVYYCQQ YGSSPWFPGQ GTKVEIK
配列番号 537 ザリフレリマブ重鎖 CDR1	GFTFSSYS 8
配列番号 538 ザリフレリマブ重鎖 CDR2	ISSSSSYI 8
配列番号 539 ザリフレリマブ重鎖 CDR3	ARVGLMGPFDI 11
配列番号 540 ザリフレリマブ軽鎖 CDR1	QSVSRV 6
配列番号 541 ザリフレリマブ軽鎖 CDR2	GAS 3
配列番号 542 ザリフレリマブ軽鎖 CDR3	QOYGSSPWT 9

10

20

30

40

## 【1 8 2 3】

追加の抗 CTLA - 4 抗体の例には、当業者に既知である A G E N 1 1 8 1、B M S - 9 8 6 2 1 8、B C D - 1 4 5、O N C - 3 9 2、C S 1 0 0 2、R E G N 4 6 5 9、及び A D G 1 1 6 が含まれるが、これらに限定されない。

## 【1 8 2 4】

いくつかの実施形態では、抗 CTLA - 4 抗体は、以下の特許公開 (参照により本明細書に組み込まれる) のいずれかに開示される抗 CTLA - 4 抗体である: U S 2 0 1 9 / 0 0 4 8 0 9 6 A 1 ; U S 2 0 2 0 / 0 2 2 3 9 0 7 ; U S 2 0 1 9 / 0 2 0 1 3 3 4 ; U S 2 0 1 9 / 0 2 0 1 3 3 4 ; U S 2 0 0 5 / 0 2 0 1 9 9 4 ; E P 1 2 1 2 4 2 2 B

50

1 ; WO 2 0 1 8 2 0 4 7 6 0 ; WO 2 0 1 8 2 0 4 7 6 0 ; WO 2 0 0 1 0 1 4 4 2 4 ; WO 2 0 0 4 0 3 5 6 0 7 ; WO 2 0 0 3 0 8 6 4 5 9 ; WO 2 0 1 2 1 2 0 1 2 5 ; WO 2 0 0 0 0 3 7 5 0 4 ; WO 2 0 0 9 1 0 0 1 4 0 ; WO 2 0 0 6 0 9 6 4 9 ; WO 2 0 0 5 0 9 2 3 8 0 ; WO 2 0 0 7 1 2 3 7 3 7 ; WO 2 0 0 6 0 2 9 2 1 9 ; WO 2 0 1 0 0 9 7 9 5 9 7 ; WO 2 0 0 6 1 2 1 6 8 ; 及び WO 1 9 9 7 0 2 0 5 7 4 。 追 加 の C T L A - 4 抗 体 は、 米 国 特 許 第 5 , 8 1 1 , 0 9 7 号、 同 第 5 , 8 5 5 , 8 8 7 号、 同 第 6 , 0 5 1 , 2 2 7 号、 及 び 同 第 6 , 9 8 4 , 7 2 0 号 ; P C T 公 開 第 W O 0 1 / 1 4 4 2 4 号 及 び 同 第 W O 0 0 / 3 7 5 0 4 号 ; 及 び 米 国 公 開 第 2 0 0 2 / 0 0 3 9 5 8 1 号 及 び 同 第 2 0 0 2 / 0 8 6 0 1 4 号 ; 及 び / ま た は 米 国 特 許 第 5 , 9 7 7 , 3 1 8 号、 同 第 6 , 6 8 2 , 7 3 6 号、 同 第 7 , 1 0 9 , 0 0 3 号、 及 び 同 第 7 , 1 3 2 , 2 8 1 号 に 記 載 さ れ て お り、 参 照 に よ り 組 み 込 ま れ る。 いく つか の 実 施 形 態 で は、 抗 C T L A - 4 抗 体 は、 例 え ば、 W O 9 8 / 4 2 7 5 2 ; 米 国 特 許 第 6 , 6 8 2 , 7 3 6 号 及 び 第 6 , 2 0 7 , 1 5 6 号 ; H u r w i t z e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 5 ( 1 7 ) : 1 0 0 6 7 - 1 0 0 7 1 ( 1 9 9 8 ) ; C a m a c h o e t a l . , J . C l i n . O n c o l . , 2 2 ( 1 4 5 ) : A b s t r a c t N o . 2 5 0 5 ( 2 0 0 4 ) ( a n t i b o d y C P - 6 7 5 2 0 6 ) ; M o k y r e t a l . , C a n c e r R e s . , 5 8 : 5 3 0 1 - 5 3 0 4 ( 1 9 9 8 ) に 開 示 さ れ る も の で あ る ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) 。

#### 【 1 8 2 5 】

いく つか の 実 施 形 態 で は、 C T L A - 4 阻 害 剤 は、 W O 1 9 9 6 0 4 0 9 1 5 ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) に 開 示 さ れ る C T L A - 4 リ ガ ン ド で あ る。

#### 【 1 8 2 6 】

いく つか の 実 施 形 態 で は、 C T L A - 4 阻 害 剤 は、 C T L A - 4 発 現 の 核 酸 阻 害 剤 で あ る。 例 え ば、 抗 C T L A - 4 R N A i 分 子 は、 P C T 公 開 第 W O 1 9 9 9 / 0 3 2 6 1 9 及 び W O 2 0 0 1 / 0 2 9 0 5 8 ; 米 国 公 開 第 2 0 0 3 / 0 0 5 1 2 6 3 号、 同 第 2 0 0 3 / 0 0 5 5 0 2 0 号、 同 第 2 0 0 3 / 0 0 5 6 2 3 5 号、 同 第 2 0 0 4 / 2 6 5 8 3 9 号、 同 第 2 0 0 5 / 0 1 0 0 9 1 3 号、 同 第 2 0 0 6 / 0 0 2 4 7 9 8 号、 同 第 2 0 0 8 / 0 0 5 0 3 4 2 号、 同 第 2 0 0 8 / 0 0 8 1 3 7 3 号、 同 第 2 0 0 8 / 0 2 4 8 5 7 6 号、 及 び 同 第 2 0 0 8 / 0 5 5 4 4 3 ; 及 び / ま た は 米 国 特 許 第 6 , 5 0 6 , 5 5 9 号、 同 第 7 , 2 8 2 , 5 6 4 号、 同 第 7 , 5 3 8 , 0 9 5 号、 及 び 同 第 7 , 5 6 0 , 4 3 8 号 ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) に お い て M e l l o 及 び F i r e に よ っ て 記 載 さ れ た 分 子 の 形 態 を と り 得 る。 場 合 に よ っ て は、 抗 C T L A - 4 R N A i 分 子 は、 欧 州 特 許 第 E P 1 3 0 9 7 2 6 号 ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) に お い て T u s c h l に よ っ て 記 載 さ れ た 二 本 鎖 R N A i 分 子 の 形 態 を と る。 場 合 に よ っ て は、 抗 C T L A - 4 R N A i 分 子 は、 米 国 特 許 第 7 , 0 5 6 , 7 0 4 号 及 び 第 7 , 0 7 8 , 1 9 6 号 ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) に お い て T u s c h l に よ っ て 記 載 さ れ た 二 本 鎖 R N A i 分 子 の 形 態 を と る。 いく つか の 実 施 形 態 で は、 C T L A - 4 阻 害 剤 は、 P C T 公 開 番 号 W O 2 0 0 4 0 8 1 0 2 1 ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) に 記 載 さ れ る ア プ タ マ ー で あ る。

#### 【 1 8 2 7 】

他 の 実 施 形 態 で は、 本 発 明 の 抗 C T L A - 4 R N A i 分 子 は、 米 国 特 許 第 5 , 8 9 8 , 0 3 1 号、 同 第 6 , 1 0 7 , 0 9 4 号、 同 第 7 , 4 3 2 , 2 4 9 号、 及 び 同 第 7 , 4 3 2 , 2 5 0 号、 な ら び に 欧 州 出 願 第 E P 0 9 2 8 2 9 0 号 ( 参 照 に よ り 本 明 細 書 に 組 み 込 ま れ る ) に お い て C r o o k e に よ っ て 記 載 さ れ た R N A 分 子 で あ る。

#### 【 1 8 2 8 】

### 5 . 患 者 の リ ン パ 球 枯 渇 プ レ コ ン デ ィ シ ョ ニ ン グ

いく つか の 実 施 形 態 で は、 本 発 明 は、 T I L 集 団 で が ん を 治 療 す る 方 法 を 含 み、 患 者 は、 本 開 示 に よ る T I L の 注 入 前 に、 非 骨 髄 破 壊 的 化 学 療 法 で 前 治 療 さ れ る。 いく つか の 実 施 形 態 で は、 本 発 明 は、 非 骨 髄 破 壊 的 化 学 療 法 で 前 治 療 さ れ た 患 者 の が ん の 治 療 に 使 用 す る た め の T I L 集 団 を 含 む。 いく つか の 実 施 形 態 で は、 T I L 集 団 は、 注 入 に よ る 投 与 用

である。いくつかの実施形態では、非骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド  $60 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  を2日間（TIL注入前の27及び26日目）及びフルダラビン  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  を5日間（TIL注入の27～23日目）である。いくつかの実施形態では、本開示による非骨髄破壊的化学療法及びTIL注入の後（0日目）、患者は、 $720, 000 \text{ IU} / \text{kg}$  で生理耐性まで8時間ごとに静脈内にIL-2（アルデスロイキン、PROLEUKINとして市販される）の静脈内注入を受ける。特定の実施形態では、TIL集団は、IL-2と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、IL-2は、TIL集団の後に投与される。

#### 【1829】

実験結果は、腫瘍特異的Tリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性T細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することにより、治療効果を高める上で重要な役割を果たすことを示している。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のTILを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」とも称される）を利用する。

#### 【1830】

一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（活性型はマホスファミドと称される）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。そのような方法は、Gassner, et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85, Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681, Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239, 及びDudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357に記載されており、それらはすべて参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【1831】

いくつかの実施形態では、フルダラビンは  $0.5 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 10 \mu\text{g} / \text{mL}$  フルダラビンの濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  フルダラビンの濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上にわたって投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、 $10 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $15 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $25 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $30 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $35 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、 $40 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、または  $45 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  の用量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、 $35 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  で2～7日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、 $35 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  で4～5日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、 $25 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  で4～5日間投与される。

#### 【1832】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性型であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 10 \mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度で得られる。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性型であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  の濃度で得られる。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上にわたって投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、 $100 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、 $150 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、 $175 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、 $200 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、 $225 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、 $250 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、 $275 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ 、または  $300 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは静脈内投与（すなわち、i.v.）される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $35 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  で2～7日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は  $250 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  i.v. で、4～5日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 $250 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  i.v. で4日間投与される。

#### 【1833】

いくつかの実施形態では、フルダラビンとシクロホスファミドと一緒に患者に投与する

ことによって、リンパ球枯渇を実施する。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、 $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日 i.v.}$  で投与され、シクロホスファミドは  $250 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日 i.v.}$  で4日にわたり投与される。

【1834】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを  $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間、次いでフルダラビンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で5日間投与することにより実施される。

【1835】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを  $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間、次いでフルダラビンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で5日間投与することにより実施され、シクロホスファミド及びフルダラビンの両方が最初の2日間に投与され、シクロホスファミドは合計5日間で実施される。

10

【1836】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを約  $50 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間、次いでフルダラビンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で5日間投与することにより実施され、シクロホスファミド及びフルダラビンの両方が最初の2日間に投与され、シクロホスファミドは合計5日間で実施される。

【1837】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを約  $50 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間、次いでフルダラビンを  $20 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で5日間投与することにより実施され、シクロホスファミド及びフルダラビンの両方が最初の2日間に投与され、シクロホスファミドは合計5日間で実施される。

20

【1838】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを約  $40 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間、次いでフルダラビンを  $20 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で5日間投与することにより実施され、シクロホスファミド及びフルダラビンの両方が最初の2日間に投与され、シクロホスファミドは合計5日間で実施される。

【1839】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを約  $40 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間、次いでフルダラビンを  $15 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で5日間投与することにより実施され、シクロホスファミド及びフルダラビンの両方が最初の2日間に投与され、シクロホスファミドは合計5日間で実施される。

30

【1840】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、シクロホスファミドを  $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量、及びフルダラビンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で2日間投与し、その後、フルダラビンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で3日間投与することにより実施される。

【1841】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドはメスナと一緒に投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、 $15 \text{ mg} / \text{kg}$  で投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナはシクロホスファミドと共に約2時間にわたり(-5日及び/または-4日)、その後24時間の残り22時間にわたり  $3 \text{ mg} / \text{kg} / \text{時}$  の速度でシクロホスファミドの各投与に付随して注入することができる。

40

【1842】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者に第3のTIL集団を投与した翌日から開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップを含む。

【1843】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者に第3のTIL集団を投与したその日から開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップを含む。

【1844】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、5日間のプレコンディショニング治療を含

50

む。いくつかの実施形態では、期間は、- 5日～ - 1日、または0日目～ 4日目として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、- 5日及び - 4日（すなわち、0日目及び1日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、- 5日及び - 4日（すなわち、0日目及び1日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、- 5日及び - 4日（すなわち、0日目及び1日目）に60 mg / kgの静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドはメスナと一緒に投与される。いくつかの実施形態では、レジメンはフルダラピンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラピンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、25 mg / m<sup>2</sup>の静脈内フルダラピンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、25 mg / m<sup>2</sup>の静脈内フルダラピンを、- 5日及び - 1日（すなわち、0日目～ 4日目）にさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、25 mg / m<sup>2</sup>の静脈内フルダラピンを、- 5日及び - 1日（すなわち、0日目～ 4日目）にさらに含む。

10

## 【1845】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、60 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のシクロホスファミド及び25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のフルダラピンを2日間投与した後に、25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量でフルダラピンを5日間投与するステップを含む。

## 【1846】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、60 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のシクロホスファミドを2日間、次いで25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のフルダラピンを5日間投与するステップを含む。

20

## 【1847】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、60 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のシクロホスファミド及び25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のフルダラピンを2日間投与した後に、25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量でフルダラピンを3日間投与するステップを含む。

## 【1848】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、60 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のシクロホスファミドを2日間、次いで25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のフルダラピンを3日間投与するステップを含む。

## 【1849】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、60 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のシクロホスファミド及び25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量のフルダラピンを2日間投与した後に、25 mg / m<sup>2</sup> / 日の用量でフルダラピンを1日間投与するステップを含む。

30

## 【1850】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表27に従って投与される。

## 【表27】

表27. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日目	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラピン 25mg/m <sup>2</sup> /日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

40

## 【1851】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表28に従って投与される。

50

## 【表 2 8】

表 2 8. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X							
メスナ (必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 25mg/m <sup>2</sup> /日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

10

## 【1 8 5 2】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 2 9 に従って投与される。

## 【表 2 9】

表 2 9. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ (必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25mg/m <sup>2</sup> /日	X	X	X					
TIL 注入				X				

20

## 【1 8 5 3】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 0 に従って投与される。

## 【表 3 0】

表 3 0. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ (必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m <sup>2</sup> /日			X	X	X					
TIL 注入						X				

30

## 【1 8 5 4】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 1 に従って投与される。

40

50

## 【表 3 1】

表 3 1. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日目	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m <sup>2</sup> /日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

10

## 【1 8 5 5】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 2 に従って投与される。

## 【表 3 2】

表 3 2. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日目	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30mg/m <sup>2</sup> /日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

20

## 【1 8 5 6】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 3 に従って投与される。

## 【表 3 3】

表 3 3. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日目	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 30mg/m <sup>2</sup> /日	X	X	X					
TIL 注入				X				

30

## 【1 8 5 7】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 4 に従って投与される。

40

50

## 【表 3 4】

表 3 4. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日目	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m <sup>2</sup> /日			X	X	X					
TIL 注入						X				

10

## 【1858】

## 6. IL-2 レジメン

いくつかの実施形態では、IL-2 レジメンは、高用量 IL-2 レジメンを含み、高用量 IL-2 レジメンは、治療用の TIL 集団の治療有効部分を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは変異体を含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくは変異体が  $0.037 \text{ mg/kg}$  または  $0.044 \text{ mg/kg IU/kg}$  (患者の体重) の用量で、耐性まで 8 時間ごとに最大 14 用量にわたって 15 分間のボラス静脈内注入を使用して投与される。9 日間の休息の後、このスケジュールをさらに 14 回、合計で最大 28 回まで繰り返すことができる。いくつかの実施形態では、IL-2 は、1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、または 6 回の用量で投与される。

20

## 【1859】

いくつかの実施形態では、IL-2 は、最大 6 用量の最大用量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量 IL-2 レジメンは、小児用に適合される。いくつかの実施形態では、600,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。いくつかの実施形態では、500,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。いくつかの実施形態では、400,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。いくつかの実施形態では、500,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。いくつかの実施形態では、300,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。いくつかの実施形態では、200,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。いくつかの実施形態では、100,000 国際単位の用量 (IU) / kg のアルデスロイキンを 8 ~ 12 時間ごとに最大 6 回まで使用する。

30

## 【1860】

いくつかの実施形態では、IL-2 レジメンは、デクレッシェンド IL-2 レジメンを含む。デクレッシェンド IL-2 レジメンは、O' Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61 及び Eton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9 に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンド IL-2 レジメンは、 $18 \times 10^6 \text{ IU/m}^2$  を 6 時間かけて静脈内投与し、続いて  $18 \times 10^6 \text{ IU/m}^2$  を 12 時間かけて静脈内投与し、続いて  $18 \times 10^6 \text{ IU/m}^2$  を 24 時間かけて静脈内投与し、続いて  $4.5 \times 10^6 \text{ IU/m}^2$  を 72 時間かけて静脈内投与することを含む。この治療サイクルは、28 日ごとに最大 4 サイクルまで繰り返すことができる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンド IL-2 レジメンは、18,000,000 IU/m<sup>2</sup> を 1 日目に、9,000,000 IU/m<sup>2</sup> を 2 日目に、4,500,000 IU/m<sup>2</sup> を 3 日目及び 4 日目に含む。

40

## 【1861】

50

一実施形態では、IL-2レジメンは、低用量IL-2レジメンを含む。Dominguez-Villar and Hafler, Nat. Immunology 2000, 19, 665-673; Hartemann, et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1, 295-305; 及び Rosenzweig, et al., Ann. Rheum. Dis. 2019, 78, 209-217に記載される(その開示内容は参照により本明細書に組み込まれる)低用量IL-2レジメンを含む、当技術分野で既知の任意の低用量IL-2レジメンが使用され得る。一実施形態では、低用量IL-2レジメンは、24時間あたり、1m<sup>2</sup>あたり18×10<sup>6</sup>IUのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは変異体を含み、5日間の持続注入として投与され、続いて2~6日間IL-2療法なしで、任意に、その後24時間あたり、1m<sup>2</sup>あたり18×10<sup>6</sup>IUの持続注入としてアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーまたは変異体の静脈内投与をさらに5日間、任意に、その後3週間IL-2療法なしで投与することを含み、これらの後に追加のサイクルが投与され得る。

#### 【1862】

いくつかの実施形態では、IL-2は、最大6用量の最大用量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量IL-2レジメンは、小児用に適合される。いくつかの実施形態では、600,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。いくつかの実施形態では、500,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。いくつかの実施形態では、400,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。いくつかの実施形態では、500,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。いくつかの実施形態では、300,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。いくつかの実施形態では、200,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。いくつかの実施形態では、100,000国際単位の用量(IU)/kgのアルデスロイキンを8~12時間ごとに最大6用量まで使用する。

#### 【1863】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、1、2、4、6、7、14、または21日ごとに、0.10mg/日~50mg/日の用量でペグ化IL-2を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、1、2、4、6、7、14、または21日ごとに、0.10mg/日~50mg/日の用量でベンペガルデスロイキン、またはその断片、変異体、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

#### 【1864】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、1、2、4、6、7、14、または21日ごとに、0.10mg/日~50mg/日の用量でTHOR-707、またはその断片、変異体、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

#### 【1865】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、1、2、4、6、7、14、または21日ごとに、0.10mg/日~50mg/日の用量でnemvaleukinalfa、またはその断片、変異体、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

#### 【1866】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、抗体骨格に移植されたIL-2断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、IL-2低親和性受容体に結合する抗体-サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HC DR1、HC DR2、HC DR3を含む、重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含む抗体サイトカイン移植タンパク質と、LC DR1、LC DR2、LC DR3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)と、V<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>のC DRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に増殖させる。いくつかの実施形態では、

抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)を含む抗体サイトカイン移植タンパク質と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)と、V<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>のCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、IL-2分子はムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に増殖させる。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、配列番号559及び配列番号568からなる群から選択される重鎖、配列番号567及び配列番号569からなる群から選択される軽鎖、またはその断片、変異体、またはバイオシミラーを、1、2、4、6、7、14、または21日ごとに0.10mg/日~50mg/日の用量で投与することを含む。

10

## 【1867】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン(Proleukin(登録商標))または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型IL-2分子よりも長い血清半減期を有する。

## 【1868】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるTIL注入は、本明細書に記載の任意のTIL組成物であり得、かつTIL注入の代わりにMIL及びPBLの注入、ならびに本明細書に記載のIL-2レジメン及び併用療法(PD-1及び/またはPD-L1阻害剤及び/またはCTLA-4阻害剤など)の添加を含み得る。

20

## 【1869】

## 7. 治療の追加的方法

他の実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法であって、対象に上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療的TIL集団の治療有効用量を投与することを含む方法を提供する。

## 【1870】

他の実施形態では、本発明は、がん罹患した対象を治療するための方法であって、対象に上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された、TIL組成物の治療有効用量を投与することを含む方法を提供する。

## 【1871】

他の実施形態では、本発明は、対象に上記の該当する先行段落のいずれかに記載の治療的TIL集団の治療有効用量を投与する、または上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された、TIL組成物の治療有効用量を投与することを含む方法を提供する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

30

## 【1872】

他の実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、60mg/m<sup>2</sup>/日の用量のシクロホスファミドを2日間、次いで25mg/m<sup>2</sup>/日の用量のフルダラピンを5日間投与するステップを含むように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

40

## 【1873】

他の実施形態では、本発明は、TIL細胞を対象へ投与した翌日から開始される、高用量IL-2レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

## 【1874】

他の実施形態では、本発明は、高用量IL-2レジメンが600,000または720,000IU/kgを耐性まで8時間ごとに15分間のボラス静脈内注入として投与されるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれかに記載の癌を有する対象を治療するための方法を提供する。

## 【1875】

50

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1876】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1877】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

10

【1878】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。他の実施形態では、本発明は、がんが、難治性または切除不能な黒色腫であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1879】

他の実施形態では、本発明は、がんが、HNSCCであるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

20

【1880】

他の実施形態では、本発明は、がんが、子宮頸癌であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1881】

他の実施形態では、本発明は、がんが、NSCLCであるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1882】

他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽腫（GBMを含む）であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

30

【1883】

他の実施形態では、本発明は、がんが、胃腸癌であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1884】

他の実施形態では、本発明は、がんが、超異変型癌であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

【1885】

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児超異変型癌であるように修正された、上記の該当する段落のいずれかに記載のがんに罹患した対象を治療するための方法を提供する。

40

【1886】

他の実施形態では、本発明は、治療有効用量の治療用のTIL集団を対象に投与することを含む、がんを罹患した対象を治療するための方法で使用するための、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団を提供する。

【1887】

他の実施形態では、本発明は、治療有効用量のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを罹患した対象を治療するための方法で使用するための、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

【1888】

50

他の実施形態では、本発明は、治療有効用量の上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されているように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

【1889】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、 $60\text{ mg/m}^2$  /日の用量のシクロホスファミドを2日間、次いで $25\text{ mg/m}^2$  /日の用量のフルダラピンを5日間投与するステップを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

10

【1890】

他の実施形態では、本発明は、TIL細胞を対象へ投与した翌日から開始される、高用量IL-2レジメンで患者を治療するステップさらに含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

【1891】

他の実施形態では、本発明は、高用量IL-2レジメンが $600,000$ または $720,000\text{ IU/kg}$ を耐性まで8時間ごとに15分間のボラス静脈内注入として投与することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

20

【1892】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

【1893】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、神経膠芽腫(GBMを含む)、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

30

【1894】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽腫(GBMを含む)、及び胃腸癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

【1895】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を提供する。

40

【1896】

他の実施形態では、本発明は、がんが、HNSCCであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1897】

他の実施形態では、本発明は、がんが、子宮頸癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1898】

50

他の実施形態では、本発明は、がんが、NSCLCであるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1899】

他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽腫（GBMを含む）であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1900】

他の実施形態では、本発明は、がんが、胃腸癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

10

【1901】

他の実施形態では、本発明は、がんが、超異変型癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1902】

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児超異変型癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1903】

他の実施形態では、本発明は、治療有効用量の治療用のTIL集団を対象に投与することを含む、対象のがんを治療するための方法における上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団の使用を提供する。

20

【1904】

他の実施形態では、本発明は、治療有効用量のTIL組成物を対象に投与することを含む、対象のがんを治療するための方法における上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物の使用を提供する。

【1905】

他の実施形態では、本発明は、対象に非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンを投与し、次いで、対象に治療有効用量の上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物を投与することを含む、対象のがんを治療するための方法における上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団、または、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物の使用を提供する。

30

【1906】

他の実施形態では、本発明は、治療有効用量の治療用のTIL集団、または、治療有効用量のTIL組成物を対象に投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されているように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1907】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、 $60\text{ mg/m}^2$  /日の用量のシクロホスファミドを2日間、次いで $25\text{ mg/m}^2$  /日の用量のフルダラピンを5日間投与するステップを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

40

【1908】

他の実施形態では、本発明は、TIL細胞を対象へ投与した翌日から開始される、高用量IL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載された治療用のTIL集団の使用、または上記の該当する先行段落のいずれか1つに記載されたTIL組成物の使用を提供する。

【1909】

50

他の実施形態では、本発明は、高用量 I L - 2 レジメンが 6 0 0 , 0 0 0 または 7 2 0 , 0 0 0 I U / k g を耐性まで 8 時間ごとに 1 5 分間のボラス静脈内注入として投与することを含むように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 1 0 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、固形腫瘍であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 1 1 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルス由来の癌、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、腎細胞癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

10

【 1 9 1 2 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、神経膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

20

【 1 9 1 3 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、黒色腫であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 1 4 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、H N S C C であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 1 5 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、子宮頸癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

30

【 1 9 1 6 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、N S C L C であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 1 7 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽腫 ( G B M を含む ) であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

40

【 1 9 1 8 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、胃腸癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 1 9 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、超異変型癌であるように修正された、上記の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 2 0 】

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児超異変型癌であるように修正された、上記

50

の該当する先行段落のいずれか 1 つに記載された治療用の T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【 1 9 2 1 】

転移性黒色腫を含む切除不能及び/または二重難治性黒色腫の治療を必要とする患者/対象におけるそれを治療する方法であって、本方法は、

( a ) 対象から得た腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得る及び/または受け取ることと、

( b ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、任意に O K T - 3、ならびに、任意に抗原提示細胞 ( A P C ) 及び/または O K T - 3 を含む A P C の第 1 の培養物からの培養上清のいずれかを含む細胞培養培地中に、第 1 の T I L 集団を培養することによって、第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で実施され、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために約 1 ~ 7 日または 1 ~ 8 日の期間実施される、プライミングを実施することと、

( c ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に追加の I L - 2、O K T - 3、ならびに、抗原提示細胞 ( A P C ) 及び/または O K T - 3 を含む第 2 の A P C の培養物からの培養上清いずれかを補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、急速な第 2 の増殖で添加される A P C の数は、ステップ ( b ) で添加される A P C の数の少なくとも 2 倍であり、急速な第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために約 1 ~ 1 1 日間行われ、第 3 の T I L 集団は、治療的 T I L 集団であり、急速な第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( d ) ステップ ( c ) から得られた治療用 T I L 集団を採取することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取した T I L 集団を輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) からの T I L の治療有効用量を対象に投与することと、を含む。

【 1 9 2 2 】

転移性黒色腫を含む切除不能及び/または二重難治性黒色腫の治療を必要とする患者/対象におけるそれを治療する方法であって、本方法は、

( a ) 患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることが、または、患者から得られた腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を得ることと、

( b ) 任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

( c ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、 I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C )、を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

( d ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( c ) からステップ ( d ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( e ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することにより第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、 I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより

10

20

30

40

50

、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4～8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

(f)ステップ(e)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g)ステップ(g)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことと、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

(h)ステップ(g)の輸液バッグから治療有効用量の第3のTIL集団を患者/対象に投与することと、を含む。

10

#### 【1923】

転移性黒色腫を含む切除不能及び/または二重難治性黒色腫の治療を必要とする患者/対象におけるそれを治療する方法であって、本方法は、

(a)患者から得られた腫瘍サンプルを複数の腫瘍断片に処理することによって患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることが、または腫瘍サンプルを腫瘍消化物に処理することによって患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を得ることと、

(b)任意に、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖システムに加えることと、

(c)第2のTIL集団を産生するために、IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)、を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することによって、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(b)からステップ(c)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

20

(d)第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することによって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

30

(e)第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することによって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ(d)からステップ(e)への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

40

(f)ステップ(f)から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することによって、ステップ(e)からステップ(f)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

(g)ステップ(g)から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すことと、ステップ(f)から(g)への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

(h)ステップ(g)の輸液バッグから治療有効用量の第3のTIL集団を患者/対象に投与することと、を含む。

#### 【1924】

50

転移性黒色腫を含む切除不能及び／または二重難治性黒色腫の治療を必要とする患者／対象におけるそれを治療する方法であって、本方法は、

( a ) ( i ) 対象から切断され、切断後に消化され、消化後に凍結保存された腫瘍からの第 1 の T I L 集団を含む凍結保存された腫瘍消化物を解凍すること、及び ( i i ) I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地で第 1 の T I L 集団を培養して、第 2 の T I L 集団を産生すること、によって、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に実施される、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

10

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ ( a ) からステップ ( b ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第 2 の増殖を実施することと、

( c ) 第 3 の T I L 集団を、第 1 の複数の T I L 亜集団に分割することによって第 3 の増殖を実施することであって、第 1 の複数の T I L 亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、I L - 2、任意に O K T - 3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第 2 の複数の T I L 亜集団を産生し、第 3 の増殖は、約 5 ~ 9 日間行われ、任意に、各別個の容器は、第 3 のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ ( b ) からステップ ( c ) への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第 3 の増殖を実施することと、

20

( d ) ステップ ( c ) から得られた、第 2 の複数の T I L 亜集団を採取することであって、ステップ ( d ) からステップ ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第 2 の複数の T I L 亜集団を収集することと、

( e ) ステップ ( d ) から採取された T I L 亜集団を、1 つ以上の輸液バッグに移すことであって、ステップ ( d ) から ( e ) への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

( f ) ステップ ( e ) の輸液バッグから治療有効用量の採取された T I L 集団を対象に投与することと、を含む。

30

#### 【 1 9 2 5 】

いくつかの実施形態では、ステップ ( a ) ( i ) は、解凍された腫瘍を産生するために、対象から切除され、切除後に凍結保存された腫瘍からの第 1 の T I L 集団を含む凍結保存された腫瘍を解凍すること、及び、解凍された腫瘍を複数の腫瘍に断片化することを含み、( a ) ( i i ) は、第 1 の T I L 集団を含む複数の腫瘍断片を培養することを含む。

#### 【 1 9 2 6 】

転移性黒色腫を含む切除不能及び／または二重難治性黒色腫の治療を必要とする患者／対象におけるそれを治療する方法であって、本方法は、

( a ) 第 2 の T I L 集団を産生するために、I L - 2、及び任意に O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第 1 の T I L 集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することであって、第 1 の増殖のプライミングは、第 2 の T I L 集団を得るために、約 5 ~ 9 日間行われ、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングは、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングを実施することと、

40

( b ) 第 3 の T I L 集団を産生するために、第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に、追加の I L - 2、任意に O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を実施することであって、第 2 の増殖は、第 3 の T I L 集団を得るために、約 1 ~ 5 日間行われ、第 2 の増殖は、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステ

50

ップ（a）からステップ（b）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

（c）第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することにより第3の増殖を実施することとあって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約4～8日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ（b）からステップ（c）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

（d）ステップ（c）から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することとあって、ステップ（c）からステップ（d）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

（e）ステップ（d）から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すこととあって、ステップ（d）から（e）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

（f）治療有効用量の第3のTIL集団を、ステップ（e）の輸液バッグから対象に投与することと、を含む。ステップ（a）で培養する前に、腫瘍サンプルは第1のTIL集団を含む複数の腫瘍断片に断片化している、請求項376～379の方法。

#### 【1927】

転移性黒色腫を含む切除不能及び/または二重難治性黒色腫の治療を必要とする患者/対象におけるそれを治療する方法とあって、本方法は、

（a）第2のTIL集団を産生するために、IL-2、及び任意にOKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で、患者から切断された第1のTIL集団を含む腫瘍サンプルを培養することにより、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することとあって、第1の増殖のプライミングは、第2のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第1の増殖または第1の増殖のプライミングは、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われる、第1の増殖または第1の増殖のプライミングを実施することと、

（b）第3のTIL集団を産生するために、第2のTIL集団の細胞培養培地に、追加のIL-2、任意にOKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を実施することとあって、第2の増殖は、第3のTIL集団を得るために、約5～9日間行われ、第2の増殖は、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で任意に行われ、ステップ（a）からステップ（b）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、急速な第2の増殖を実施することと、

（c）第3のTIL集団を、第1の複数のTIL亜集団に分割することによって第3の増殖を実施することとあって、第1の複数のTIL亜集団の各亜集団を別個の容器に播種し、IL-2、任意にOKT-3、及び培養物を補充した細胞培養培地を添加することにより、第2の複数のTIL亜集団を産生し、第3の増殖は、約5～9日間行われ、任意に、各別個の容器は、第3のガス透過性表面積を提供する閉鎖容器であり、ステップ（b）からステップ（c）への移行は、任意に閉鎖システムで実施される場合、システムを開くことなく行われる、第3の増殖を実施することと、

（d）ステップ（c）から得られた、第2の複数のTIL亜集団を採取することとあって、ステップ（c）からステップ（d）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、第2の複数のTIL亜集団を収集することと、

（e）ステップ（d）から採取されたTIL亜集団を、1つ以上の輸液バッグに移すこととあって、ステップ（d）から（e）への移行は、閉鎖システムで任意に実行される場合、システムを開くことなく行われる、輸液バッグに移すことと、

（f）ステップ（e）の輸液バッグから治療有効用量の第3のTIL集団を患者/対象に投与することと、を含む。

#### 【1928】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、患者 / 対象は、以前に P D - 1 阻害剤またはそのバイオシミラーで治療されている。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、及びそのバイオシミラーからなる群から選択される。

【 1 9 2 9 】

いくつかの実施形態では、患者 / 対象は、以前に P D - L 1 阻害剤またはそのバイオシミラーで治療されている。いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。

【 1 9 3 0 】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤またはそのバイオシミラーは、C T L A - 4 阻害剤またはそのバイオシミラーと同時投与される。いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤またはそのバイオシミラーは、C T L A - 4 阻害剤またはそのバイオシミラーと同時投与される。

【 1 9 3 1 】

いくつかの実施形態では、患者は、以前に全身療法の 1 つの追加の先行ラインで治療されている。いくつかの実施形態では、全身療法の 1 つの追加の先行ラインは、B R A F 阻害剤またはその薬学的に許容される塩である。いくつかの実施形態では、B R A F 阻害剤は、ベムラフェニブ、ダブルフェニブ、またはその薬学的に許容される塩から成る群から選択される。いくつかの実施形態では、全身療法の 1 つの追加の先行ラインは、M E K 阻害剤またはその薬学的に許容される塩または溶媒和物である。いくつかの実施形態では、M E K 阻害剤は、トラメチニブ、コビメチニブ、及びその薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、全身療法の 1 つの追加の先行ラインは、B R A F 阻害剤またはその薬学的に許容される塩と、M E K 阻害剤またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物の組み合わせである。いくつかの実施形態では、B R A F 阻害剤は、ベムラフェニブ、ダブルフェニブ、及びその薬学的に許容される塩からなる群から選択され、M E K 阻害剤は、トラメチニブ、コビメチニブ、及びその薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、全身療法の 1 つの追加の先行ラインは、C T L A - 4 阻害剤またはそのバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、イピルムマブ、トレメリムマブ、及びそれらのバイオシミラーからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、全身療法の 1 つの追加の先行ラインは、化学療法レジメンである。いくつかの実施形態では、化学療法レジメンは、ダカルバジンまたはテモゾリミドを含む。

【 1 9 3 2 】

いくつかの実施形態では、I L - 2 は、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングステップの細胞培養培地中に、1 0 0 0 I U / m L ~ 6 0 0 0 I U / m L の初期濃度で存在する。

【 1 9 3 3 】

いくつかの実施形態では、第 2 の増殖ステップ ( d ) において、I L - 2 は 1 0 0 0 I U / m L ~ 6 0 0 0 I U / m L の初期濃度で存在し、O K T - 3 抗体は約 3 0 n g / m L の初期濃度で存在する。

【 1 9 3 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 の増殖または第 1 の増殖のプライミングステップにおける細胞培養培地は、I L - 4、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【 1 9 3 5 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖及び第 3 の増殖における細胞培養培地は、I L - 4、I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【 1 9 3 6 】

いくつかの実施形態では、方法は、T I L を患者に投与する前に、骨髓非破壊的リンパ

球枯渴レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渴レジメンは、 $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量のシクロホスファミドを2日間、次いで $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量のフルダラビを5日間投与するステップを含む。

【1937】

いくつかの実施形態では、方法は、患者にTILを投与した翌日から開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、高用量IL-2レジメンであり、される600,000または720,000 IU/kgのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくは変異体を含み、耐性まで8時間ごとに15分間のボラス静脈内注入として投与される。

【1938】

いくつかの実施形態では、治療的に有効なTIL集団は、約 $2.3 \times 10^{10}$  ~ 約 $13.7 \times 10^{10}$ のTILである。

【1939】

養子細胞移植：養子細胞移植（ACT）は免疫療法の効果的な形態であり、抗腫瘍活性を持つ免疫細胞をがん患者に移植することを含む。ACTは、抗腫瘍活性を有するリンパ球のインビトロでの同定、これらの細胞のインビトロでの多数への増殖、及びがんを有する宿主へのそれらの注入を含む治療アプローチである。養子移入に使用されるリンパ球は、切除された腫瘍の間質（腫瘍浸潤リンパ球またはTIL）に由来し得る。ACT用のTILは、本明細書に記載されているように調製することができる。いくつかの実施形態では、TILは、図1（特に、例えば、図1B及び/または図1C及び/または図1E及び/または図1F及び/または図1G）に記載の方法に従って調製される。それらは、抗腫瘍T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子操作されている場合、混合リンパ球腫瘍細胞培養（MLTC）で濃縮されている場合、または自己抗原提示細胞及び腫瘍由来ペプチドを使用してクローン化されている場合、血液に由来することもできる。リンパ球が担癌宿主に由来する、注入されるACTは、自家ACTと呼ばれる。米国公開第2011/0052530は、主に転移性黒色腫に罹患している患者の治療のために、がんの退縮を促進するための養子細胞療法を実施する方法に関し、これらの方法についてその全体が参照により組み込まれる。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載されるように投与することができる。いくつかの実施形態では、TILは単回用量で投与することができる。そのような投与は、注射、例えば静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、TIL及び/または細胞傷害性リンパ球は複数回用量で投与され得る。投薬は、年に1回、2回、3回、4回、5回、6回または6回以上であり得る。投薬は、月に1回、2週間に1回、1週間に約1回、または1日おきであり得る。TIL及び/または細胞傷害性リンパ球の投与は、必要な限り継続することができる。

【実施例】

【1940】

本明細書に包含される実施形態は、以下の実施例を参照して記述される。これらの実施例は、例示の目的のために提供されるにすぎず、決して以下の例に限定されるように解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになる任意かつすべての変形例を包含するように解釈されるべきである。

【1941】

実施例1：PRE-REP及びREPプロセス用の培地の調製

この実施例は、転移性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）、卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び肺腺癌を含むがこれらに限定されない様々な腫瘍タイプに由来する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製手順を説明する。この培地は、本出願及び実施例に記載のTILのうちのいずれかの調製に使用することができる。

【1942】

CM1の調製

10

20

30

40

50

次の試薬を冷蔵庫から取り出し、37 の水浴で加温した：（RPMI 1640、ヒト AB 血清、200mML - グルタミン）。濾過する容量に適した0.2µmフィルターユニットの上部に各成分を添加することにより、以下の表35に従ってCM1培地を調製した。4 で保存する。

【表35】

表35：CM1の調製

成分	最終濃度	最終容量 500ml	最終容量
RPMI1640	該当なし	450ml	900ml
ヒト AB 血清、熱不活化 10%	50ml	100ml	
200mML-グルタミン	2mM	5ml	10ml
55mMBME	55µM	0.5ml	1ml
50mg/ml 硫酸ゲンタマイシン	50µg/ml	0.5ml	1ml

10

【1943】

使用日に、必要量のCM1を37 の水浴で予熱し、6000IU/ml IL-2を添加した。

20

【1944】

追加の補足 - 表36に従って必要に応じて。

【表36】

表36：必要に応じてCM1の追加の補足。

補足物	濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200mM	1:100	2mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/ml ペニシリン 10,000µg/ml ストレプトマイシン	1:100	100U/ml ペニシリン 100µg/ml ストレプトマイシン
アムホテリシン B	250µg/ml	1:100	2.5µg/ml

30

【1945】

CM2の調製

調製したCM1を冷蔵庫から取り出すか、上記の表35に従って新鮮なCM1を調製する。冷蔵庫からAIM-V（登録商標）を取り出し、調製したCM1を無菌培地ボトル内で等量のAIM-V（登録商標）と混合することにより、必要な量のCM2を調製した。使用日に、3000IU/ml IL-2をCM2培地に添加した。使用日に、3000IU/ml IL-2を含む十分な量のCM2を作製した。CM2培地ボトルに、その名前、調製者のイニシャル、濾過/調整日、2週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要なまで4 で保存した。

40

【1946】

CM3の調製

使用が必要な日にCM3を調製した。CM3はAIM-V（登録商標）培地と同じであり、使用日に3000IU/mlのIL-2で補足した。AIM-Vのボトルまたはバッグに直接IL-2ストック溶液を添加することによって、実験に必要なとする十分な量のCM3を調製した。軽く振ってよく混ぜた。AIM-Vに添加した直後に、ボトルに「3000IU/ml IL-2」のラベルを付ける。過剰のCM3が存在する場合は、培地名、

50

調製者のイニシャル、培地調製日、及びその有効期限（調製後7日）のラベルを付けたボトル内で4で保存した。4で7日間保存した後、IL-2で補足された培地を廃棄した。

## 【1947】

## CM4の調製

CM4はCM3と同じであり、2mM Glutamax（商標）（最終濃度）が追加で補足された。1LのCM3ごとに、10mLの200mM Glutamax（商標）を添加した。AIM-Vのボトルまたはバッグに、IL-2ストック溶液及びGlutamax（商標）ストック溶液を直接添加することによって、実験に必要とする十分な量のCM4を調製した。軽く振ってよく混ぜた。AIM-Vに追加した直後にボトル「3000 IL/nil IL-2及びGlutamax」のラベルを付けた。過剰のCM4が存在する場合は、培地名「Glutamax」、及びその使用期限（調製後7日）のラベルを付けたボトル内で4で保存した。4で7日間保存した後、IL-2で補足された培地を廃棄した。

10

## 【1948】

## 実施例2：IL-2ストック溶液（CELLGENIX）の調製

この実施例は、rhIL-2の使用を伴うものを含め、本出願及び実施例に記載されているものすべてを含む、さらなる組織培養プロトコルでの使用に適したストックサンプルに、精製され、凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン-2を溶解するプロセスに記載する。

20

## 【1949】

## 手順

0.2%酢酸溶液（HAc）を調製した。滅菌水29mLを50mLコニカルチューブに移した。1mL 1N酢酸を50mLコニカルチューブに加えた。チューブを2~3回反転させてよく混合した。Steri-Flipフィルターを使用した濾過によるHAc溶液の滅菌

## 【1950】

PBS中に1%のHSAを調製した。150mL滅菌フィルターユニット内の96mL PBSに4mLの25% HSAストック溶液を添加した。濾過された溶液4で保存した。調製したrhIL-2の各バイアルについて、フォームに記入した。

30

## 【1951】

調製したrhIL-2ストック溶液（ $6 \times 10^6$  IU/mL最終濃度）。rhIL-2の各ロットは異なり、次のような必要な情報は製造元の分析証明書（COA）に記載されている：1）バイアルあたりのrhIL-2の質量（mg）、2）rhIL-2の（IU/mg）の比活性及び3）推奨される0.2% HAc再構成量（mL）。

## 【1952】

以下の式を使用してrhIL-2ロットに必要な1% HSAの量を計算した。

## 【数1】

$$\left( \frac{\text{バイアル質量 (mg)} \times \text{生物学的活性} \left( \frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAcの量 (mL)} = 1\% \text{ HSAの量 (mL)}$$

40

## 【1953】

例えば、CellGenixのrhIL-2ロット10200121COAによると、1mgバイアルの比活性は $25 \times 10^6$  IU/mgである。2mLの0.2% HAcでrhIL-2を再構成することが推奨される。

## 【数2】

50

$$\left( \frac{1\text{mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2\text{mL} = 2.167\text{mL HSA}$$

## 【1954】

アルコールワイプでIL-2バイアルのゴム栓を拭いた。3 mLシリンジに取り付けられた16 G針を使用して、推奨量の0.2% HAcをバイアルに注入する。針を引き抜くときにストッパーを外さないように注意した。バイアルを3回逆さにして、すべての粉末が溶解するまでかき混ぜた。ストッパーを慎重に取り外し、アルコールワイプの上に置いた。計算した1% HSAをバイアルへ追加した。 10

## 【1955】

rhIL-2溶液の保管。短期保管では(<72時間)、バイアルを4°Cで保存した。長期保管では(>72hrs)、バイアルを小容量に分注し、使用するまで-20°Cでクライオバイアルに保存した。凍結/融解サイクルを避ける。調整日から6ヶ月の有効期限を記録した。Rh-IL-2ラベルには、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、アリコートの濃度と量を含む。 20

## 【1956】

## 実施例3：凍結保存プロセス

この実施例では、CryoMed Controlled Rate Freezer、Model 7454 (Thermo Scientific)を使用して、実施例12で説明した簡略化されたクローズド手順で調製されたTILの凍結保存プロセス方法について説明する。

## 【1957】

使用した機器は次のとおりであった：アルミカセットホルダーラック(CS750フリーザーバッグに対応)、750 mLバッグ用凍結保存カセット、低圧(22 psi)液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー(バッグ用リボンタイプ)、及びCryoStore CS750凍結バッグ(Origin Scientific)。 30

## 【1958】

凍結プロセスは、核形成から-20°Cまで0.5°C/分の速度、及び-80°Cの最終温度まで毎分1°C/分の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは次のとおりである：ステップ1-4で待機、ステップ2：-4°Cまで1.0°C/分(サンプル温度)ステップ3：-45°Cまで20.0°C/分(チャンバー温度)ステップ4：-10.0°Cまで10.0°C/分(チャンバー温度)；ステップ5：-20°Cまで0.5°C/分(チャンバー温度)；及びステップ6：-80°Cまで1.0°C/分(サンプル温度)。

## 【1959】

実施例4：CLL患者におけるPBMCからのPBLの選択及び増殖の例示的な実施形態。 40

PBMCは患者から収集され、後で使用するために凍結するか、新鮮な状態で使用した。本発明の方法における出発材料として、少なくとも約400,000,000(400 × 10<sup>6</sup>)のPBMCを得るのに十分な量の末梢血を収集した。方法の0日目に、6 × 10<sup>6</sup> IU/mLのIL-2新鮮な状態または解凍した状態で調製し、使用するまで4°Cまたは氷上で保存する。CM2培地200 mLを、CM1培地(Glutamax(登録商標)含有)100 mLを混合し、CM2を作るためAIM-Vで100 mL(1:1)で希釈して調製した。CM2は光から保護され、使用しないときは密閉した。

## 【1960】

次のすべての手順を、無菌細胞培養条件下で実施した。CM2のアリコートは、解凍に 50

使用するために37℃の水浴で50 mLコニカルチューブ内で加温する及び/または凍結PBMCSAMPLEを洗浄した。凍結したPBMCSAMPLEを使用する場合、サンプルを冷凍庫から取り出し、解凍するまでドライアイス上に置いた。PBMCKRYOBIYALを解凍する準備ができたなら、5 mLのCM2培地を滅菌50 mLコニカルチューブに入れた。PBMCSAMPLEKRYOBIYALを、氷の結晶がわずかに残るまで37℃の水浴に入れた。加温したCM2培地をサンプルバイアルに1:1の体積比サンプル:培地(約1 mL)で滴下した。内容物全体をクライオバイアルから取り出し、50 mLコニカルチューブ内の残りのCM2培地に移した。追加の1~2 mLのCM2培地を使用してクライオバイアルをすすぎ、クライオバイアルの内容物全体を取り出して50 mLコニカルチューブに移した。コニカルチューブ内の量を、追加のCM2培地で15 mLに調整し、細胞をす

10

#### 【1961】

ペレットから上清を除去し、コニカルチューブに蓋をして、例えば粗い表面に沿ってチューブをこすることによって細胞ペレットを破碎した。細胞ペレットに約1 mLのCM2培地を添加し、ペレットと培地をピペットで5~10回上下に吸引して細胞ペレットを砕いた。さらに3~5 mLのCM2培地をチューブに添加し、ピペットで混合して細胞を懸濁した。この時点で、細胞懸濁液の量を記録した。Nexcelom Cellometer K2などの自動細胞カウンターを使用して細胞を計数するために、チューブから100 µLの細胞懸濁液を取り出した。サンプル内の生細胞の数を決定し、記録した。

20

#### 【1962】

表現型解析やその他の特性解析実験のために、最低 $5 \times 10^6$ 個の細胞を保存した。保存した細胞を室温で400 gで5分間遠心して、細胞ペレットを収集した。凍結培地(20% DMSOを含む無菌、熱不活性化FBS)で細胞ペレットを再懸濁した。保存した細胞の1つまたは2つのアリコートで凍結培地で凍結し、細胞フリーザー(Mr. Frosty(商標))内のアリコートを-80℃の冷凍庫でゆっくりと凍結させた。-80℃で最低24時間経過後、液体窒素貯蔵庫に移した。

#### 【1963】

次の手順では、事前に冷却された溶液を使用し、迅速に作業し、セルを低温に保つ。次のステップは、PBMCSAMPLEのT細胞分画を精製することである。これはPanT-cell Isolation Kit(Miltenyi、カタログ#130-096-535)を使用して実施した。PBS、0.5%BSA、及びpH7.2の2 mM EDTAを含む無菌フィルター洗浄バッファーで細胞を洗浄することにより、精製の細胞を調製した。PBMCSAMPLEを400 gで5分間遠心分離して、細胞ペレットを収集した。上清を吸引除去し、細胞ペレットを、 $10^7$ 細胞ごとに40 µLの洗浄緩衝液に再懸濁した。 $10^7$ 細胞ごとに10 µLのPanT細胞ビオチン抗体カクテルを添加した。よく混合し、冷蔵庫または氷上で5分間インキュベートした。 $10^7$ 細胞ごとに30 µLの洗浄バッファーを添加した。 $10^7$ 細胞ごとに20 µLのPanT-cell Micro Bead Cocktailを添加した。よく混合し、冷蔵庫または氷上で10分間インキュベートした。LSカラムを準備し、マイクロビーズから細胞を磁氣的に分離させた。LSカラムを、Quadromacs磁場内に配置した。LSカラムを3 mLの冷洗浄バッファーで洗浄し、洗浄液を収集して廃棄した。細胞懸濁液をカラムに適用し、フロースルー(標識されていない細胞)を収集した。このフロースルーは濃縮T細胞分画(PBL)である。3 mLの洗浄バッファーでカラムを洗浄し、最初のフロースルーと同じチューブにフロースルーを収集した。チューブに蓋をして氷上に配置した。これはT細胞分画、またはPBLである。磁場からLS列を取り外し、5 mLの洗浄バッファーで列を洗浄し、非T細胞分画(磁気標識細胞)を別のチューブに収集した。両方の画分を400 gで5分間遠心分離し、細胞ペレットを収集した。両方のサンプルから上清を吸引し、ペレットを破壊し、各ペレットに3000 IU/mL IL-2を補充したCM2培地1 mLで細胞を再懸濁し、5~10回ピペティングしてペレットを分解した。CM2の1-2 m

30

40

50

Lを各サンプルに追加し、各サンプルをよく混ぜて、次のステップのために組織培養インキュベーターに保した。各サンプルから約50 $\mu$ Lのアリコートを取り出し、細胞を数え、数と生存率を記録した。

【1964】

次に、T細胞(PBL)をDunabeads(商標)HumanT-ExpanderCD3/CD28で培養した。Dunabeadsのストックバイアルを中速で30秒間ボルテックスした。必要なビーズのアリコートをストックバイアルから取り出し、滅菌1.5mLマイクロチューブに移した。ビーズが入った1.5mLマイクロチューブに1mLのビーズ洗浄液を加えることにより、ビーズをビーズ洗浄液で洗浄した。やさしく混ぜた。チューブをDynaMag(商標)-2磁石の上に置き、ビーズが磁石に向かって引き寄せられるまで30分間放置した。ビーズから洗浄液を吸引し、磁石からチューブを取り外した。3000IU/mLIL-2を補充したCM2培地1mLをビーズに添加した。マイクロチューブの全内容物を15または50mLコニカルチューブに移した。IL-2を含むCM2培地を使用してビーズを最終濃度約500,000/mLにした。

10

【1965】

T細胞(PBL)及びビーズを、次のように一緒に培養した。0日目:G-Rex24ウェルプレート中に、ウェルあたり合計7mLで、500,000のT細胞、500,000のCD3/CD28Dunabeads、及びIL-2を補充したCM2を添加した。G-Rexプレートを加湿した37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターにプロセスの次のステップまで置いた(4日目)。Mr.Frosty(商標)細胞フリーザーを使用して、残りの細胞をCS10凍結保存培地で凍結した。Mr.Frosty細胞フリーザーを使用して、細胞の非T細胞分画をCS10凍結保存培地で凍結した。4日目に、培地を交換した。培地の半分(約3.5mL)をG-Rexプレートの各ウェルから取り除いた。37 $^{\circ}$ Cまで加温した3000IU/mLIL-2を補充したCM4培地の十分な量(約3.5mL)を加え、各サンプルウェルから取り出した培地を交換した。G-レックスプレートを、インキュベーターに戻した。

20

【1966】

7日目に、REPによる増殖のために細胞を調製した。G-レックスプレートをインキュベーターから取り出し、培地の半分を各ウェルから取り出して廃棄した。細胞を残りの培地に再懸濁し、15mLコニカルチューブに移した。ウェルは、37 $^{\circ}$ Cまで加温した3000IU/mLIL-2が補充された1mLの各CM4で洗い、洗浄培地を細胞と同じ15mLチューブに移した。細胞の代表的なサンプルを取り出し、自動細胞カウンターを使用して計数した。生細胞が $1 \times 10^6$ 未満の場合は、0日目のDunabead増殖プロセスを繰り返した。細胞の残りの部分は、バックアップ増殖または表現型解析やその他の特徴付け研究のために凍結した。 $1 \times 10^6$ 以上の生細胞がある場合は、0日目からプロトコルに従ってREP増殖を反復してセットアップする。あるいは、十分な細胞がある場合は、フラスコあたり $10 - 15 \times 10^6$ PBLを使用して、G-Rex10M培養フラスコで増殖をセットアップすることができる。100mL/ウェルの最終体積の3000IU/mLIL-2を補充したCM4培地中1:1の比率Dunabeads:PBLを使用して増殖をセットアップすることができる。プレート及び/またはフラスコをインキュベーターに戻した。過剰なPBLを分注し、-80 $^{\circ}$ Cの冷凍庫内のMr.Frosty(商標)細胞フリーザーでゆっくりと凍結し、-80 $^{\circ}$ Cで最低24時間後に液体窒素貯蔵に移すことができる。これらのPBLは、増殖、表現型解析、またはその他の特性解析のためのバックアップサンプルとして使用することができる。

30

40

【1967】

11日目に、培地を交換した。G-Rexプレートまたはフラスコの各ウェルから培地の半分を取り除き、37 $^{\circ}$ Cで3000IU/mLIL-2を補充した同量の新鮮なCM4培地と交換した。

【1968】

14日目に、PBLを採取した。G-Rexプレートを使用する場合は、プレートの各

50

ウェルから約半分の培地を取り除き、廃棄する。P B Lとビーズを残りの培地に懸濁し、無菌の15 mLコニカルチューブ(チューブ1)に移した。ウェルを37℃まで加温した1~2 mLの新鮮なA I M - V培地で洗浄し、洗浄物をチューブ1に移す。チューブ1に蓋をしてD y n a M a g (商標) - 15 M a g n e tに1分間置き、ビーズを磁気に引き寄せさせた。細胞懸濁液を新しい15 mLチューブ(チューブ2)に移し、ビーズを2 mLの新鮮なA I M - Vで37℃で洗浄した。チューブ1を磁石の中に戻し、さらに1分間置いた後、洗浄培地をチューブ2に移す。必要に応じて、最後の洗浄ステップの後にウェルを組み合わせることができる。細胞の代表的なサンプルを取り出して計数し、数と生存率を記録した。計数中にチューブをインキュベーターに入れることができる。細胞が非常に密集しているように見える場合は、追加のA I M - V培地をチューブ2に追加することができる。フラスコを使用する場合は、フラスコ中の容量を約10 mLに減らさなければならない。フラスコの内容物を混合し、15 mLコニカルチューブ(チューブA)に移した。上記のようにフラスコを2 mLのA I M - V培地で洗浄し、洗浄培地もチューブAに移す。チューブAに蓋をしてD y n a M a g (商標) - 15 M a g n e tに1分間置き、ビーズを磁気に引き寄せさせた。細胞懸濁液を新しい15 mLチューブ(チューブB)に移し、ビーズを2 mLの新鮮なA I M - Vで37℃で洗浄した。チューブAを磁石の中に戻し、さらに1分間置いた後、洗浄培地をチューブBに移す。必要に応じて、最後の洗浄ステップの後にウェルを組み合わせることができる。代表的な細胞のサンプルを取り出して計数し、数と生存率を記録した。計数中にチューブをインキュベーターに入れることができる。細胞が非常に密集しているように見える場合は、追加のA I M - V培地をチューブBに追加することができる。細胞は、C S 10保存培地で所望の濃度で新鮮または凍結して使用することができる。

10

20

【1969】

実施例5：G E N 3増殖プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からT細胞を増殖する例示的な実施形態。

0日目に、T細胞分画(C D 3 +、C D 4 5 +)を、ポジティブまたはネガティブ選別法、すなわち、T細胞マーカーを使用してT細胞を除去する(C D 2、C D 3など、またはT細胞を残す他の細胞を除去する)、または勾配遠心分離を使用して、リンパ球、全血、または腫瘍消化物(新鮮または解凍)が濃縮されたアフエーシス産物から分離させた。

30

【1970】

G e n 3 . 1プロセスを、本明細書に記載のG e n 3プロセスによる約 $1 \times 10^7$ 細胞/フラスコを播種することにより開始した。

【1971】

7日目に、G e n 3 . 1プロセスに従って細胞を再活性化した。

【1972】

9~11日目に、G e n 3 . 1プロセスに従って細胞をスケールアップした。

【1973】

14~16日目に、G e n 3 . 1プロセスに従って細胞を採取した。

【1974】

図21は、G e n 3プロセスを使用して造血器悪性腫瘍からT I Lを増殖するための例示的な実施形態の概略図を提供する。

40

【1975】

実施例6：限定培地を用いた腫瘍増殖プロセス。

実施例5~12に開示されるプロセスは、C M 1及びC M 2培地を本発明による限定培地(例えば、C T S (商標) O p T m i z e r (商標) T - C e l l E x p a n s i o n S F M、T h e r m o F i s h e r、例えばD M 1及びD M 2を含む)で置換して実施される。

【1976】

実施例7：膵臓癌に罹患した患者の組織コア生検からの腫瘍浸潤リンパ球の増殖

50

この実施例では、患者から得た膵臓癌腫瘍コア生検から T I L を増殖するために実施された研究について説明する。本実施例は、組織コア生検のサンプルから T I L を増殖するための方法の例示的な実施形態を提供する。

【 1 9 7 7 】

3つの腫瘍断片を含む膵臓腫瘍コア生検を得て、以下に概説する G e n 2 様腫瘍処理方法に従って処理した。図 1 A は、例示的な G e n 2 様プロトコルのプロセスステップを示す。

【 1 9 7 8 】

0 日目 - 腫瘍処理

腫瘍コア生検を、本方法の 0 日目に、本明細書に記載されるように受け取り、洗浄した。10  
。定規を使用して、組織コアの長さと同理論上の質量を測定し、記録した。

【 1 9 7 9 】

0 日目 - G e n 2 様 ( プレ R E P )

G - R e x 1 0 0 M に、「腫瘍 I D、G e n 2、イニシャル、培地処方、及び日付」をラベル付けした。(少なくとも 2 4 ~ 3 0 時間) 3 7 °C まで加温した 0 . 5 L の C M 1 + 6 0 0 0 I U / m L I L - 2 を G - R e x 1 0 0 M に添加した。6 ウェルプレートを使用し、5 m L の腫瘍洗浄バッファを、「# 1」、「# 2」、「# 3」とラベル付けされた 3 つのウェルに加えた。簡潔にコア生検容器溶液のすべての内容物をペトリ皿 ( 1 0 0 m m または 1 5 0 m m など ) に移した。

【 1 9 8 0 】

20  
パストールピペットを使用してコア生検材料をウェル 1 に移すことにより、サンプルを 3 回洗浄した。サンプルを 3 分間インキュベートした。次いで、材料をウェル # 2 に 3 分間移し、その後、材料をウェル # 3 に 3 分間移した。

【 1 9 8 1 】

トランスファーピペットまたは鉗子を使用して、生検材料をウェル # 3 から直接上記のステップで調製した 0 . 5 L の C M 1 + 6 0 0 0 I U / m L I L - 2 を含有するラベルの付いた G - R e x 1 0 0 M に追加した。G - R e x 1 0 0 M を 1 1 日目まで 3 7 °C / 5 % C O 2 インキュベーターに置いた。

【 1 9 8 2 】

3 日目 - G e n 2 様 ( プレ R E P 採取 / 活性化 )

30  
G e n 2 様プロセスの 3 日目を、次のように実施した。フィーダー細胞 ( 同種 P B M C フィーダー細胞 ) は、2 人以上の異なるドナーからの P B M C のプールされた集団から調製した。フィーダー細胞は最小限に操作され、必要になるまで凍結した。フィーダー ( 同種 P B M C フィーダー細胞 ) の 2 x 1 m L バイアルを解凍し、3 7 °C まで加温した 4 8 m L の C M - 1 + 6 0 0 0 I U / m L I L - 2 にピペティングした。

【 1 9 8 3 】

P B M C フィーダーを血清学的ピペットを使用してよく混合し、4 x 1 m L のアリコートを取り出した。当業者に周知の標準的な手順に従って、解凍したフィーダーを無希釈でカウントした。次に、1 0 0 e 6 P B M C フィーダーに必要な量を次の式に従って計算した：1 0 0 e 6 / 平均生細胞濃度 = 1 0 0 e 6 P B M C に必要な量。

【 1 9 8 4 】

40  
P r e - R E P 培養物を含む G - R e x 1 0 0 M フラスコをインキュベーターから取り出し、生物学的安全キャビネット ( B S C ) に入れた。

【 1 9 8 5 】

上記から計算された量及び 3 0 μ L のストック O K T 3 ( 3 0 n g / m L ) を、5 0 0 m L の C M 1 + 6 0 0 0 I U / m L I L - 2 を含む各 G - R e x 1 0 0 M フラスコに加えた。必要量 ( Q S ) 総量を 1 L : 5 0 0 m L - 各フラスコに追加された P P B M C の計算量 = C M 1 + 6 0 0 0 I U / m L I L - 2 の総量をフラスコに加えた。

【 1 9 8 6 】

1 1 日目 - G e n 2 様 ( R E P )

50

Gen 2 様プロセスの 11 日目を、次のように実施した。Pre-REP TIL 採取では、オープンシステムフラスコを使用した。培養物を含む G-Rep 100 M フラスコをインキュベーターから取り出し、代謝物分析のために上清の 2 x 1 mL アリコートを取り出し、-80 で保存した。無菌の 150 mL ボトルを秤量し、重量を記録した。G-Rep 100 M フラスコから約 900 mL の上清を吸引した。血清学的ピペットを使用して、Pre-REP TIL 培養物を秤量した滅菌 150 mL フラスコに移した。

【1987】

Pre-REP TIL 培養液を血清学的ピペットでよく混合し、4 x 1 mL のアリコートを細胞計数用に収集した。当業者に周知の標準的な手順に従って、希釈なしで 4 回の細胞計数を行った。計数が行われている間、Pre-REP TIL 培養物をインキュベーターに置いた。

10

【1988】

REP 培養に播種する最大量 (200 e6 TIL) を超える細胞を、100 mL シリンジとアシュトンピペットを使用して Pre-REP TIL 培養から除去した。200 e6 TIL を、青いNISポート経由で EV-1000 N バッグに移した。

【1989】

Pre-REP TIL を含む EV-1000 N バッグを G-Rep 500 MCS の RED ラインに滅菌溶接し、TIL を重力でフラスコに排出した。水気を切った後、赤い線をヒートシールした。

【1990】

5e9 P BMC フィーダー細胞を上記のように解凍した。細胞計数を 4 回実施した後、5e9 フィーダー細胞を EV 1000 N フィーダーバッグに追加するために、細胞計数に基づいてフィーダー培養の量を調整した。フィーダー細胞を追加した後、150 µL の OKT3 をフィーダーバッグに追加した。フィーダーバッグは G-Rep 500 MCS の赤い線に滅菌溶接され、5e9 フィーダーセルを G-Rep に重力で排出した。4.5 L の CM2 及び 3, 000 IU/mL IL-2 を G-Rep 500 MCS に追加した。

20

【1991】

Gen 2 様プロセスの 16 日目を、Gen 2 16 日目方法に従って実施した。

【1992】

16 日目 - Gen 2 様 (分割)

最初に、代謝物分析のために 2 x 1 mL の上清を採取し、-80 で保存した。簡潔に、容量を減らし、REP 細胞培養物を最大 5 個の G-REP 500 MCS に分割した。各 G-REP 500 MCS 中、培養物容量は 4.5 L CM4 培地 + IL-2 (3000 IU/mL) かつ  $1 \times 10^9$  TVC / フラスコである。

30

【1993】

22 日目 - Gen 2 様 (採取)

Gen 2 様プロセスの 22 日目を、Gen 2 22 日目方法に従って実施した。

【1994】

22 日目の細胞を採取し、LOVO (TIL Harvest 2 cy) で処理し、30 x 1 mL クライオバイアルで凍結した (1:1 CS10 / PLLA 1% HSA) CRF プログラム # 1 を使用。場合によっては、1 つのフラスコのみが存在し、追加の娘フラスコがあれば、仮定の収量を推定した。

40

【1995】

10e6 ポスト LOVO 細胞は、凍結前に識別染色のために保存した。上澄み廃棄物を廃棄する前に、上澄みの 2 x 1 mL アリコートを代謝物分析のために取り出し、-80 で保存した。

【1996】

結果

11 日目 (活性化) の TVC 数は、47.3 e6 細胞であった。22 日目 (REP) ポスト LOVO の TVC 数は、93% の生存率で 10.4 e9 セルであった。そのため、G

50

Gen 2 様プロセスの 1 1 日目から 2 2 日目までに 8 . 4 細胞の倍加があった。

【 1 9 9 7 】

実施例 8 : 組織コア生検からの腫瘍浸潤リンパ球の増殖のための Gen 2 様及び Gen 3 プロセス

この実施例では、Gen 2 様プロセス及び Gen 3 のプロセスを使用して、膵臓癌腫瘍コア生検サンプルからの T I L 増殖を比較する研究について記載する。この研究では、膵臓癌 ( P 7 0 5 7 ) に罹患した患者の腫瘍コア生検を利用する。この腫瘍サンプルは 3 つのコアを含み、T I L 産物を、本明細書に記載の Gen 2 様プロセスに従って産生する。この研究では、膵臓癌 ( P 7 0 5 8 ) に罹患した患者の腫瘍コア生検も利用する。この腫瘍サンプルは 8 つのコアを含み、T I L 産物を、Gen 2 様プロセスに従った 4 つのコア、Gen 3 プロセスに従った 4 つのコアから産生する。

【 1 9 9 8 】

序文

コア針生検は、がんの診断時に異常な組織増殖をサンプリングするために使用される標準的な予備診断手順である。この手順では、大きなゲージ ( 1 8 、 1 6 、 1 4 など ) の針を経皮的に使用して疑わしい領域をサンプリングし、それをさらに分析及び検査して、組織ががん性であるかどうかを判断する。コア針生検は切開や手術を必要としないため、腫瘍サンプルを採取する際の負担がはるかに少ない手段である。したがって、概説した T I L 製造プロセスでの出発材料のための切除腫瘍の代替としてコア生検を使用できるかどうかを確認することが望ましい。

背景技術

【 1 9 9 9 】

新たに切除された腫瘍に由来する自己腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) のエクスピボ増殖のために、2 つの製造プロセス ( Gen 2 及び Gen 3 ) が開発され、臨床製造で使用されている。Gen 2 及び Gen 3 プロセスは、同じバイオリアクター ( G - R e x 1 0 0 M C S 及び G - R e x 5 0 0 M C S ) を利用する。Gen 2 プロセスにはプレ急速増殖プロトコル ( p r e - R E P ) ステップが含まれており、このステップは Gen 3 プロセスの活性化ステップに置き換えられている。Gen 2 と Gen 3 の両方の細胞培養増殖プロセスにおける T I L 培養物の急速な増殖 ( R E P ) とスケールアップは、インターロイキン - 2 ( I L - 2 ) 、モノクローナル抗体 O K T 3 、及び照射された末梢血単核細胞の存在下で行われ、これらはすべて T I L 増殖を促進する。Gen 3 は、Gen 2 プロセスよりも短いプロセス期間を有する。Gen 2 及び Gen 3 プロセスを、コア針生検プロセスの設計基準として使用した。

【 2 0 0 0 】

目的

この研究のこの目的は、出発材料としてコア生検材料を使用して T I L 製造プロセスを開発することである。この製造プロセスの設計は、本明細書で概説されている Gen 2 様及び Gen 3 臨床製造プロセスの設計に基づいている。

【 2 0 0 1 】

範囲

Gen 2 様プロセス及び Gen 3 プロセスを使用して本格的な研究を実施する ( 例えば、上記の実施例を参照 ) 。 Gen 2 プロセスと比較して、Gen 2 様プロセスには 2 つの変更点があり、変更点には 3 日間のプレ R E P ( Gen 2 では 1 1 日 ) 、及び 3 日目にフィーダーと O K T - 3 とを追加することによる 3 日目の活性化ステップを含む。

【 2 0 0 2 】

Gen 2 様と Gen 3 の主なプロセス設計の違いは次のとおりである。I L - 2 は存在するが、O K T - 3 及びフィーダー細胞は不在の下、3 日間のインキュベーション期間にわたってコア組織または生検から細胞が血管外遊出する Gen 2 様プロセスにおける、プレ急速増殖プロトコル ( P r e - R E P ) が存在する。Gen 3 プロセスの対応するステップでは、腫瘍からの T I L の血管外遊出と、0 日目の O K T - 3 、及びフィーダー細胞

10

20

30

40

50

の添加によるその活性化とを併用して組み合わせている。

【2003】

Gen 2 プロセスの急速増殖プロトコルには、OKT3、フィーダーをプレREP TILに11日間にわたり追加し、16日目に分割することを使用した単一の活性化を含む。Gen 3 プロセスの対応するREPでも、7/8日目にOKT3とフィーダーを追加し、11日目にスケールアップすることを使用する。

【2004】

Gen 2 プロセスは、プレREPにG-Rex100MCSを使用し、REPにG-Rex500MCSを使用する。Gen 3 プロセスは、活性化と再活性化にG-Rex100MCSを使用し、スケールアップにG-Rex500MCSを使用する。

10

【2005】

Gen 3 プロセスの期間は、Gen 2 プロセスの22日に対して16~17日である（例えば、Gen 3はGen 2よりも5~6日短い）。

【2006】

Gen 3 プロセスは、限定培地（すなわち、ヒトAB血清なし）を使用するが、Gen 2 プロセスはヒトAB血清を含む完全培地を使用する。

【2007】

図1Aは、本明細書に記載のGen 2 様プロセスとGen 3 プロセスとの比較を提供する。

【2008】

手順

実施例のこのセクションでは、膵臓腫瘍コア生検サンプルP7057からのコアからTIL産物を産生するために利用されるGen 2 様プロセスの概要を説明する。以下に説明するGen 2 様プロセス及びGen 3 プロセスを使用して、膵臓腫瘍コア生検サンプルP7058のコアからTIL産物を産生する。

20

【2009】

この研究は商用ベンダー、協力者、またはパートナーから調達した組織コア/生検腫瘍サンプルを利用している。同種PBMCフィーダー細胞は、2人以上の異なるドナーからプールされる。フィーダー細胞は最小限に操作され、CS10に懸濁した単核細胞からなる凍結保存マトリックス内のTIL培養に直接添加される。

30

【2010】

Gen 2 様プロセスの概要

0日目 - Gen 2 様（腫瘍処理）

Gen 2 様方法の腫瘍処理を、次のように実施する。腫瘍コア生検を受け取り、3回洗浄する。定規を使用して、組織コアの長さで理論上の質量を測定し、記録する。

【2011】

0日目 - Gen 2 様（プレREP）

Gen 2 様プロセスの0日目に、Pre-REPフェーズを次のように開始する。G-Rex100Mに「腫瘍ID、Gen 2、イニシャル、培地処方、及び日付」のラベルを付ける。（少なくとも24~30時間）37℃まで加温した0.5LのCM1+6000 IU/mL IL-2を添加する。6ウェルプレートを使用し、1、2、及び3とラベル付けされた3つのウェルに5mLの腫瘍洗浄バッファーを添加する。簡潔に、コア生検容器溶液の全ての内容物をペトリ皿（100mmまたは150mm）に移す。パストゥールピペットを使用してコア生検材料をウェル1に移すことにより、サンプルを3回洗浄する。3分間インキュベートする。次に、材料をウェル2に3分間移し、次に材料をウェル3に3分間移す。トランスファーピペットまたはピンセットを使用して、生検材料をウェル3から上記のステップで調製した0.5LのCM1+6000 IU/mL IL-2を含むラベルの付いたG-Rex100Mに直接添加する。G-Rex100Mを11日目まで37℃/5%CO<sub>2</sub>インキュベーターに配置する。

40

【2012】

50

## 3日目 - Gen 2様 (プレREP採取/活性化)

Gen 2様プロセスの3日目に、プレREP採取/活性化を次のように実施する。2 × 1 mL PBMCのバイアルを解凍し、37 に加温した48 mLのCM-1 + 6000 IU/mL IL-2にピペットで移す。血清学的ピペットでよく混合し、4 × 1 mLアリコートを取り出し、希釈せずに標準的な方法に従って解凍したフィーダーをカウントする。100 e 6 PBMCに必要な量を計算する： $(100 e 6 / \text{平均生細胞濃度} = 100 e 6 \text{ PBMCに必要な量})$ 。インキュベーターから培養物を含むG-Rep 100 Mフラスコを取り出し、BSCに配置する。上記から計算された量及び30 µLのストックOKT3 (30 ng/mL)を、500 mLのCM1 + 6000 IU/mL IL-2を含む各フラスコに添加する。1 LのQS総量：500 mL - 10 . 5 . 6で添加した量 = フラスコに添加したCM1 + 6000 IU/mL IL-2の総量。

## 【2013】

## 11日目 - Gen 2様 (REP)

Gen 2様プロセスの11日目に、REPフェーズは、Pre-REP TIL採取及びG-Rep 500 MCSへの播種を除いて、Gen 2の11日目のプロセスに従って開始する。Pre-REP TIL採取では、オープンシステムフラスコを使用する。インキュベーターからフラスコを取り出し、2 × 1 mLの上清のアリコートを代謝物分析のために取り出し、-80 で保存する。無菌の150 mLボトルを秤量し、重量を記録する。約900 mLの上清を吸引する。血清学的ピペットを使用して、Pre-REP TILを秤量した滅菌150 mLフラスコに移す。血清学的ピペットでよく混ぜ、細胞計数用に4 × 1 mLアリコートを得る。標準的な方法として、NC-200で無希釈で細胞計数を4回実施する。細胞計数を実施している間は、Pre-REP TILをインキュベーター内で維持する。

## 【2014】

必要に応じて、フラスコから適切な量を取り出して200 e 6 TIL (REPに播種する最大量)を残し、100 mLシリンジ及びアシュトンピペットを使用して、残りのTIL (200 e 6 TIL)を青いNISポート経由でEV-1000 Nバッグに移す。Pre-REP TILを含有するEV-1000 NバッグをG-Rep 500 MCSのREDラインに無菌的に結合し、TILを重力でフラスコに排出する。水気を切った後、赤線を外してヒートシールする。

## 【2015】

上記の方法に従って5 e 9フィーダーを解凍する。細胞計数を4回実施した後、必要に応じて量を調整し、EV1000 Nフィーダーバッグ中の5 e 9細胞を達成する。150 µLのOKT3をフィーダーバッグに添加する。フィーダーバッグをG-Rep 500 MCSの赤い線に滅菌的に結合し、5 e 9フィーダーを重力でG-Repに排出する。4 . 5 LのCM2 + 3000 IU/mL IL-2をG-Rep 500 MCSに添加する。

## 【2016】

## 16日目 - Gen 2様 (分割)

Gen 2様プロセスの16日目に、Gen 2の16日目のステップに従って分割ステップを実施する。2 × 1 mLの上清のアリコートを代謝物分析のために取り出し、-80 で保存する。Gen 2様プロセスの16日目は、次の例外を除いて、Gen 2の16日目のプロセスに従って実施する。1つのフラスコだけをスケールアップ/分割させる場合は、採取においていくつかの娘フラスコを追加してフルスケールのために推定する。例えば、5つのフラスコが必要であり、1つだけを次に進めた場合、最終産物のTVCに5を掛けて、予想されるフルスケールの収量を推定する。

## 【2017】

## 22日目 - Gen 2様 (採取)

Gen-2同様のプロセスの22日目に、Gen 2の22日目のプロセスに従って採取ステップを実施する。Gen 2様の22日目の細胞を採取し、LOVO細胞処理システムで処理し、30 × 1 mLクライオバイアルで凍結する (1 : 1 CS10 / PLLA 1% H

S A )。場合によっては、1つのフラスコのみが存在し、追加の娘フラスコを仮説収率のために推定する。10<sup>e6</sup>ポストLOVO細胞を、凍結前に同一性染色のために保存する。上澄み廃棄物を廃棄する前に、2×1mLの上澄みアリコートで代謝物分析のために取り出し、-80で保存する。

#### 【2018】

##### Gen3プロセスの概要

##### 0日目 - Gen - 3 (腫瘍処理)

Gen3法の腫瘍処理を、本明細書に概説されているように実施する。腫瘍コア生検を受け取り、3回洗浄する。定規を使用して、組織コアの長さと同理論上の質量を測定し、記録する。

#### 【2019】

##### 0日目 - Gen 3 (活性化)

Gen3の0日目を、概説されたプロセスに従って実施する(例えば、実施例5~8を参照)。37まで加温した500mLのDM+6000IU/mLIL-2を含むG-Rex100Mフラスコに上記のように残りの生検材料を割り当てる。使用するフラスコごとに、4×1mLの照射したPBMCのバイアルを37の水浴で解凍する。トランスファーピペットを使用して、PBMCを46mLの温かいDM+6000IU/mLIL-2を有する50mLコニカルチューブに移す。血清学的ピペットでよく混合し、4×1mLのアリコートを取り出して、本明細書に記載のプロトコルに従って、NC-200で1:10希釈でカウントする。250<sup>e6</sup>PBMCに必要な量を計算する:(250<sup>e6</sup> / 平均濃度 = 250<sup>e6</sup> PBMCに必要な量)。500mLDM+6000IU/mLIL-2及び腫瘍断片を含む各フラスコに前の手順から計算された量を添加する。15uLのストックOKT-3(1mg/mL)を、500mLDM+6000IU/mLIL-2、腫瘍断片、及びPBMCフィーダーを含む各フラスコに添加する。各フラスコに「腫瘍ID、Gen3、フラスコ番号、イニシャル、日付」のラベルを付ける。8日目まで37/5%8日目までCO<sub>2</sub>インキュベーターに配置する。

#### 【2020】

##### 7/8日目 - Gen 3 (再活性化)

Gen3プロセスの7/8日目を、例えば実施例5~9に記載されているように実施する。培養物を含むG-Rex100Mフラスコをインキュベーターから取り出し、BSC内に配置する。2×1mLの上清のアリコートを代謝物分析のために取り出し、-80で保存する。37に加温した500mLのDM+6000IU/mLIL-2をG-Rex100Mフラスコに添加する。37に加温した25mLのDM+6000IU/mLIL-2を50mLコニカルチューブに添加する。1×25mLPBMCのバッグを37の水浴で解凍し、バッグを血漿延長セットでスパイクし、シリンジで25mLを吸引し、準備した50mLコニカルチューブに分注する。1:10(900uLAIM-V中の100uLPBMC)または1:100(記載されているように1:10を作製し、100uLを別の900uLのAIM-Vに移す)のいずれかで細胞計数を4回実施し、標準的な方法に従って解凍したフィーダーをカウントする。500<sup>e6</sup>PBMCに必要な量を計算する:(500<sup>e6</sup> / 平均濃度 = 500<sup>e6</sup> PBMCに必要な量)。上記のステップで計算されたPBMCの量を、1LのDM+6000IU/mLIL-2及びコア生検を含むG-Rex100Mに添加する。30uLのストックOKT3(30ng/mL)をフラスコに添加する。フラスコを37/5%CO<sub>2</sub>インキュベーターに配置する。

#### 【2021】

##### 10/11日目 - Gen 3 (スケールアップ)

10/11日目のGen3プロセスのスケールアップを、例えば実施例5~10に記載されているように実施する。インキュベーターからフラスコを取り出し、2×1mLの上清のアリコートを代謝物分析のために取り出し、-80で保存する。液体移送セットをG-Rex500MCSのREDラインに滅菌的に結合し、液体移送セットをバクスターポンプに通し、BSC内のもう一方の端にアシュトンピペットを無菌的に接続する。約7

10

20

30

40

50

00 mLの培地をG - R e x 1 0 0 M C SからG - R e x 5 0 0 M C Sに移し、ポンプを停止し、旋回して細胞層を乱し、残りの細胞培養物をG - R e x 5 0 0 M C Sに移す。すべてのT I Lを移した後、G - R e xのR E Dラインを37 °Cまで加温した5 Lまたは10 LのD M + 3 K I U / m L I L - 2バッグに滅菌的に結合した。G - R e x 5 0 0 M C Sの5 Lマークまで培地を重力で排出する。排出が完了したら、フラスコをインキュベーターに戻す。

【2022】

16 / 17日目 - G e n 3 (採取)

G e n 3プロセスの16 / 17日目を、例えば実施例5 ~ 1に記載のように実施した。G e n 3の17日目の細胞を採取し、L O V O ( T I L採取5 c y )で処理し、C R Fプログラム# 1を使用して、30 x 1 mLクライオバイアルで凍結する(1% H S Aを有する1 : 1の比率C S 1 0 : P l a s m a l y t e)。場合によっては、0日目に播種した断片の数に応じて、1つまたは2つのフラスコしか採取用に存在しない。10 e 6ポストL O V O細胞を、凍結前に純度染色のために保存する。

10

【2023】

最終産物及び開始材料の特性評価

G e n 2様プロセス及びG e n 3のプロセスに従って製造された出発材料と最終的なT I L産物を評価することができる。アイデンティティ(% C D 4 5 + / C D 3 +)を、標準プロトコルを使用して凍結する前に、新鮮なT I L産物で測定する。例えば、インターフェロン 産生及びグランザイムB放出に関するT I L機能を測定するT I Lの刺激を、I F N - 放出に従って測定する。T I Lの刺激は、E L I S AによるグランザイムB放出に従って測定する。C D 1 0 7 a表現型、増殖表現型、分化パネルを使用したT I Lの表面抗原染色及び/または活性化/枯渇パネルを評価することができる。T C R v シーケンシングを実施することができる。テロメラーゼ活性とテロメア長を実施することができる。培養上清中の代謝物はC E D E X B i o - a n a l y z e rで測定することができる。

20

【2024】

期待される結果または判定基準

G e n 2様プロセスからのP r e - R E P細胞及び最終産物、ならびにG e n 3プロセスからの最終産物の予想される結果を表37及び38に示す。

30

【2025】

【表37】

表37. G e n 2様プロセスのP r e - R E P試験及び期待される結果

試験タイプ	方法	合格判定基準
細胞数/生存率	蛍光	>5×10e6 生細胞

【2026】

40

## 【表 3 8】

表 3 8. 最終産物試験及び判定基準 (Gen 2 と同様のプロセスと Gen 3 プロセス)

試験タイプ	方法	判定基準
リリース試験		
細胞生存率	蛍光	≥70%
総生細胞数	蛍光	1e9~150e9
アイデンティティー (%CD45+/CD3+)	フローサイトメトリー	Gen2 様: ≥90%CD45+CD3+すべての適応症の TIL Gen3: ≥90%CD45+CD3+非卵巣の TIL ≥85%CD45+CD3+卵巣の TIL
インターフェロン-ガンマ産生(刺激あり-刺激なし)	刺激と ELISA	≥500pg/mL

10

20

## 【2027】

いくつかの実施形態では、凍結最終産物試験を、Gen 2 様及び Gen 3 方法など、本明細書に記載の方法で製造された産物に対して実施するいくつかの実施形態では、試験は、以下の1つまたは複数の評価を含む：分化、活性化及び枯渇マーカー、グランザイム B、CD107A、TCRV 配列決定、テロメア長、テロメラーゼ活性、及び代謝産物。場合によっては、分化をフローサイトメトリーによって、例えば TIL 1 パネルのフローサイトメトリーによって評価する。場合によっては、活性化及び枯渇マーカーを、フローサイトメトリーによって、例えば TIL 2 パネルのフローサイトメトリーによって評価する。場合によっては、グランザイム B をビーズ刺激及び ELISA によって評価する。場合によっては、CD107A をマイトジェン刺激及び細胞内フローサイトメトリーによって評価する。場合によっては、TCRV シーケンシングをディープシーケンシングによって実施する。場合によっては、テロメアの長さを、TATアッセイを使用して測定する。場合によっては、テロメラーゼ活性を Q-TRAP によって決定する。場合によっては、テロメアの長さを、TATアッセイを使用して測定する。場合によっては、CEDEX 代謝物分析装置を使用して代謝物を測定する。

30

## 【2028】

実施例 9：例示的 GEN 3 プロセス実施例

0 日目、7 / 8 日目及び 10 / 11 日目の限定培地の調製

調製された IL - 2

限定培地バッチ量

・バッチ 1 = 3 LDM 1 @ 6000 IU / mL IL - 2 (0 日目及び 7 / 8 日目のために 14 日前に調製) ;

・バッチ 2 = 4 LDM 2 @ 3000 IU / mL IL - 2 (10 / 11 日目のために 14 日前に調製)

・DM 1 = 限定培地 1 ; DM 2 = 限定培地 2

・バッチ 1 DM 1 = 6000 IU / mL x 3000 mL = 18 x 10<sup>6</sup> IU

・バッチ 2 DM 2 = 3000 IU / mL x 4000 mL = 12 x 10<sup>6</sup> IU

## 【2029】

調製された IL - 2 : Akron プレフィルドシリンジ 1 mL 中 1 mg。

40

50

【表 3 9】

表 3 9. バッチ 1 : 3 L の DM1 を 6 0 0 0 I U で調製するための I L - 2 の計算。

A	B	C	D	E	F	G	H	I
各バッグに調製する分量	バッグあたりの IL-2 の最終濃度	調製するバッグの数	必要な総 IL-2 mg=mL $B(A * C)$	特異的活性 IU/mL (CoA)	各バッグに転送する IL-2 $(B * A) / E$ (小数点以下 1)	IL-2 の必要な総量 $F * C$	必要なシリンジの数	H を小数点以下 0 桁で四捨五入
1000mL	6000IU/mL	3	$18 \times 10^6$					

10

【 2 0 3 0】

【表 4 0】

表 4 0. バッチ 2 : 3 0 0 0 I U / mL で 4 L の限定培地を調製するための I L - 2 の計算。

A	B	C	D	E	F	G
各バッグに調製する分量	バッグあたりの IL-2 の最終濃度	調製するバッグの数	必要な総 IL-2 mg=mL $B(A * C)$	特異的活性 IU/mL (CoA)	各バッグに転送する IL-2 $(B * A) / E$ (小数点以下 1)	IL-2 の必要な総量 $F * C$
1000mL	3000IU/mL	4	$12 \times 10^6$			

20

30

【表 4 1】

表 4 1. 調製する G - R e x フラスコの数によるバッチ 2 オプション : チェックしたオプションを使用。

オプション	H	I	J	K	L
	処理する GREX フラスコの数	必要とする限定培地	調製する 1L バッグ数	バッチに必要な IL-2 の量 $(G * H)$	必要とする IL-2 シリンジ数 (K は整数に切り上げ)
A	1	4L	4		
B	2	8L	8		
C	3	12L	12		
D	4	16L	16		

40

50

## 【 2 0 3 1 】

調製された I L - 2 : A k r o n 凍結乾燥 1 m g。

## 【 表 4 2 】

表 4 2 バッチ 1 : 3 L の D M 1 を 6 0 0 0 I U で 調製 する ため の I L - 2 の 計 算。

A	B	C	D	E	F	G	H	I
各バッグに調製する分量	バッグあたりの IL-2 の最終濃度	調製するバッグの数	必要な総 IL-2 mg = mL B(A*C)	特異的活性 IU/mL (CoA)	各バッグに転送する IL-2 (B*A)/E (小数点以下 1)	IL-2 の必要な総量 F*C	必要なシリンジの数	H を小数点以下 0 桁で四捨五入
1000mL	6000IU/mL	3	18×10 <sup>6</sup>					

10

## 【 2 0 3 2 】

## 【 表 4 3 】

表 4 3 バッチ 2 : 3 0 0 0 I U / m L で 4 L の 限 定 培 地 を 調 製 する ため の I L - 2 の 計 算。

A	B	C	D	E	F	G
各バッグに調製する分量	バッグあたりの IL-2 の最終濃度	調製するバッグの数	必要な総 IL-2 mg = mL B(A*C)	特異的活性 IU/mL (CoA)	各バッグに転送する IL-2 (B*A)/E (小数点以下 1)	IL-2 の必要な総量 F*C
1000mL	3000IU/mL	4	12×10 <sup>6</sup>			

20

30

40

50

【表 4 4】

表 4 4. 調製する G-R e x フラスコの数によるバッチ 2 オプション：チェックしたオプションを使用。

オプション	H 処理する GREX フラスコの数	I 必要とする 限定培地	J 調製する 1L バッグ数	K バッチに必要な IL-2 の量 (G*H)	L 必要とする IL-2 シリンジ 数 (K は整数 に切り上げ)
A	1	4L	4		
B	2	8L	8		
C	3	12L	12		
D	4	16L	16		

10

20

【 2 0 3 3】

調製された I L - 2 : C e l l g e n i x 凍結乾燥 1 m g 。

【表 4 5】

表 4 5. バッチ 1 : 3 L の D M 1 を 6 0 0 0 I U で調製するための I L - 2 の計算。

A 各バッグに調製する分量	B バッグあたりの IL-2 の最終濃度	C 調製するバッグの数	D 必要な総 IL-2 mg=mL B(A*C)	E 特異的活性 IU/mL (CoA)	F 各バッグに転送する IL-2 (B*A)/E (小数点以下 1)	G IL-2 の必要な総量 F*C	H 必要なシリンジの数	I H を小数点以下 0 桁で四捨五入
1000mL	6000IU/mL	3	$18 \times 10^6$					

30

【表 4 6】

表 4 6. バッチ 2 : 3 0 0 0 I U / m L で 4 L の限定培地を調製するための I L - 2 の計算。

A 各バッグに調製する分量	B バッグあたりの IL-2 の最終濃度	C 調製するバッグの数	D 必要な総 IL-2 mg=mL B(A*C)	E 特異的活性 IU/mL (CoA)	F 各バッグに転送する IL-2 (B*A)/E (小数点以下 1)	G IL-2 の必要な総量 F*C
1000mL	3000IU/mL	4	$12 \times 10^6$			

40

50

## 【表 4 7】

表 4 7. 調製する G-R e x フラスコの数によるバッチ 2 オプション：チェックしたオプションを使用。

オプション	H 処理する GREX フラスコの数	I 必要とする 限定培地	J 調製する 1L バッグ 数	K バッチに必要な IL-2 の量 (G*H)	L 必要とする IL-2 シリンジ 数 (K は整数 に切り上げ)
A	1	4L	4		
B	2	8L	8		
C	3	12L	12		
D	4	16L	16		

10

20

## 【 2 0 3 4】

## 事前準備

既製の I L - 2 : シリンジに事前充填された A k r o n I L - 2 の場合は再構成は不要、ステップ 2 . 8 に進む； A k r o n I L - 2 凍結乾燥の場合は再構成に進む； C e l l g e n i x I L - 2 凍結乾燥の場合はステップ 2 . 5 に進み、再構成を進める。

## 【 2 0 3 5】

以下のものを B i o S a f e t y C a b i n e t ( B S C ) に移した： A k r o n I L - 2 粉末バイアル、ミニスパイク ( 1 )、注射用のボトル入り飲料水 ( 1 )、1 0 m L シリンジ ( 必要に応じて )、及び安全針 1 8 G ( 必要に応じて )。1 0 m L シリンジを使用して注射用水 ( W F I ) ボトルにスパイクし、1 m L の W F I を抜き取った。1 8 G ニードルをシリンジに接続し、1 m L W F I を 1 L - 2 のバイアルに移した。バイアルを 2 ~ 3 回逆さにして、すべての粉末が溶解するまでかき混ぜた。泡の形成を回避し、激しく混合しなかった。このステップを繰り返して、必要な数のバイアルを再構成した ( 必要に応じて新しいシリンジを使用した )。

30

## 【 2 0 3 6】

再構成するバイアルの数を記録した。以下のものを B S C に移した： C e l l g e n i x I L - 2 凍結乾燥バイアル、ミニスパイク ( 1 )、0 . 2 5 % 酢酸 ( H A c ) の 5 0 0 m L ボトル ( 1 )、1 0 m L シリンジ ( 必要に応じて )、P u m p m a t i c ピペット ( 1 )、及び安全針 1 8 G ( 必要に応じて )。

## 【 2 0 3 7】

1 0 m L シリンジとポンプマチックピペットを使用して、2 m L の H A c を抜き取った。1 8 G 針をシリンジに接続し、隔壁を通して 2 m L H A c をバイアルに移した。バイアルを 2 ~ 3 回逆さにして、すべての粉末が溶解するまでかき混ぜた。泡の形成を回避し、激しく混合しなかった。このステップを繰り返して、セクション 2 . 5 必要な数のバイアルを再構成した。

40

## 【 2 0 3 8】

必要なプレフィルドシリンジの数を B S C 移した。必要に応じて液体ディスペンサー。必要に応じてシリンジ。1 L バッグあたりの限定培地。C T S I m m u n e C e l l S R の解凍を確認した。

## 【 2 0 3 9】

50

調製する培地の1Lごとに、以下をBSCに移す。

- ・ 50mL CTS免疫細胞SR(1)
  - ・ 10mL ボトルゲンタマイシン硫酸塩、50mg/ml
  - ・ 1L CTS OpTmizer T-Cell Expansion SFM Basal Media 1Lバッグ(1)
  - ・ CTS OpTmizer T-Cell Expansion Supplement 26mLボトル(1)
  - ・ 1000mL Glutamaxボトル(1)
  - ・ 10mL 血清学的なピペット(2)
  - ・ 容器または50mLコニカルチューブ「CTS Immune Cell SR」(1) 10
  - ・ 容器または50mLコニカルチューブ「Glutamax」
  - ・ 調製用の2Lラボテナーバッグ(必要な場合)
  - ・ ボトル
  - ・ 60mLシリンジ(必要に応じて)
- 【2040】  
【表48】

表48. 以下の表に従って、限定培地1Lバッグを調製した。調製する適切な量をマーク：

オプション	処理日	必要とする限定培地(L)	調製する1Lバッグ総数	必要とするIL-2最終濃度(IU/mL)
A	バッチ1 (0日目または7/8日目)	3L	3	6000IU/mL
B	バッチ2 (10/11日目)	4L=1GREX フラスコ	4	3000IU/mL
		8L=2GREX フラスコ	8	
		12L=3GREX フラスコ	12	
		16L=4GREX フラスコ	16	

【2041】

【表49】

表49. 以下の容量表の指示に従って、限定培地の各1Lを調製した。

試薬	必要とする量(mL)
CTS OpTmizer T-Cell Expansion SFM BasalMedia	1000
CTSImmuneCellSR	30
CISOpTmizerT-CellExpansionSupplement	26
Glutamax	20
ゲンタマイシン	1

【2042】

Glutamax及びCTS Immune Cell SRとして必要な容器にラベル 50

を付けた。適切なサイズのピペットを使用して、20 mLのGlutamaxをボトルから取り出し、Glutamaxと表示された50 mLの容器に移した。調製された培地のバッグの数だけ繰り返した。30 mLのCTSSRを、CTSIimmune Cell SRと表示された50 mLコニカルチューブに移した。調製された培地のバッグの数だけ繰り返した。各CTSIimmune Cell SRコンテナに1 mLのゲンタマイシンを追加し、均質にした。

【2043】

CellgenixまたはAkronで再構成されたバイアルの場合、適切な容量のシリンジと18 G針を使用し、1 L定義培地バッグに必要な量のIL-2を取り出し、各CTSIimmune Cell SR容器に移して均質にした。AkronIL-2プレフィルドシリンジの場合、IL-2のセクション1で計算した量を各CTSIimmune Cell SR容器に移し、均質にした。流体ディスペンサーコネクタを1 mLシリンジに取り付け、ルアーロック接続によってプレフィルドAkronIL-2に取り付け、シリンジを取り外し、必要な量を各CTSIimmune Cell SR容器に分注し、均質にした。

10

【2044】

限定培地バッグの増殖セットを流体移送セットに取り付け、流体移送セットの反対側をポンプマチックピペットに接続した。CTSOptimizer T-Cell Expansion SFM Basal Mediaの最初の1 Lボトル内にピペットチップを配置した。Acaciaポンプに流体移送セットを配置した。以下に示すように、ポンプのパラメータを設定した。プログラム：量；速度：250 RPM；量：1000 mL。

20

【2045】

CTSOptimizer T-Cell Expansion SFM Basal Mediaの最初の1 Lボトルの全量を、限定培地バッグ(2 L Labtainer)に送り込んだ。ポンプマチックピペットをGlutamaxというラベルの付いた1つのチューブに移し、全量をバッグに送り込んだ。Immune Cell SRと表示されたチューブ1本と26 mLのサプリメントのボトル1本で、この手順を繰り返した。総転送量を記録した。バッグがいっぱいになったら、裏返して混ぜ合わせ、ラインが透明であることを確認した。チューブのクランプを閉じ、エクステンションセットラインを3回ヒートシールした。

30

【2046】

限定培地バッグのラベル付け後：バッグに4インチの血漿転送セットをスパイクした。ポンプマチックピペットに取り付けられた100 mLシリンジを使用して、ゲンタマイシン及びIL-2が添加されたCTSIimmune Cell SRコンテナから全量をシリンジに吸い込んだ。

【2047】

ポンプマチックピペットでシリンジをグルタマックスコンテナに移し、グルタマックスから全量をシリンジに吸い込んだ。ポンプマチックピペットでシリンジをCTSOptimizer Tセルに移した。増殖サプリメントボトル(26 mL)をシリンジに全量吸引した。限定培地バッグのルアーロックキャップを取り外し、シリンジから溶液全体を培地バッグに注入し、溶液全体がCTSSR、サプリメント、グルタマックス、ゲンタマイシン、及びIL-2を確実に含むように、シリンジを培地で3回洗い流し、バッグに添加した。

40

【2048】

シリンジを取り外し、エクステンションセットをルアーロック接続で接続し、クランプしてヒートシールを3回繰り返した。混合し、繰り返した。バッグを、使用するまで暗所で2~8 で保管した。

【2049】

プロセスGen3 - 0日目

予備操作

50

限定培地 ( C T S O p T m i z e r ) D M 1。限定培地とウォームパックのインキュベーション開始日時を記録した。培地とウォームパックを一晩 ( およそ 1 8 時間 ) 加温した。ゲンタマイシン ( 5 0 m g / m L ) ( 1 ) を使用した腫瘍洗浄培地の調製、5 0 0 m L H B S S のボトル ( 1 )、及び 5 m L 血清ピペット ( 1 )。

【 2 0 5 0 】

ゲンタマイシン 5 m L ( 5 0 m g / m L ) を 5 0 0 m L H B S S のボトルに添加した。5 0 0 m L ボトル腫瘍洗浄培地をラベルまたは手動で識別した。O K T 3 希釈に使用する 1 5 m L コニカルに 5 m L の腫瘍洗浄培地を添加した。使用するまで腫瘍洗浄培地を保管した。

【 2 0 5 1 】

以下のものを使用してフィーダーセルバッグを調製した：

- ・ 1 0 m L シリンジ ( 4 )
- ・ 原隊培地バッグ ( 1 L )
- ・ 予熱パック ( 2 )
- ・ E V 1 0 0 0 N バッグ ( 1 )
- ・ E V 3 0 0 0 N バッグ ( 1 )

【 2 0 5 2 】

すべてのクランプを閉じ、滅菌ウェルダを使用して調製した培地バッグをフィーダーセルバッグ # 1 に滅菌溶接した。5 0 0 m L ± 1 0 m L の培地を重力によってフィーダーセルバッグに移し、添加した量を記録した。1 g = 1 m L と仮定。元の長さのチューブをそのままに、フィーダーセルバッグ # 1 をヒートシールして取り出した。フィーダーセルバッグ # 1 を S S C へ移した。

【 2 0 5 3 】

フィーダー細胞の調製

フィーダーバッグを 3 7 の水浴で 3 ~ 5 分間解凍した。解凍の開始時刻と終了時刻を記録した。フィーダーセルバッグ # 1 をルアー接続の 1 つを使用して C C 3 に接続した。フィーダーセルバッグ # 2 をルアー接続の 1 つを使用して C C 3 に接続した。C C 3 マニホールド上のシリンジを 1 0 0 m L シリンジに交換した。C C 3 からのかからスパイクを有するフィーダーセルバッグをフィーダーバッグの単一のポートにスパイクした。活栓弁を回したのでフィーダーセルバッグ # 1 及びフィーダーセルバッグ # 2 はオフの位置にある。バルブは何が閉じているかを示す。

【 2 0 5 4 】

フィーダー細胞数と濃度調整。必要に応じて、各細胞分画サンプルを A I M - V で希釈して調製した ( 1 : 1 0 希釈を推奨 )。N C 2 0 0 の最適範囲は  $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$  細胞 / m L であった。4 . 5 m L の A I M - V を入れたコニカルチューブを 4 本調製した。細胞数ごとに 0 . 5 m L の C F を添加した。

【 2 0 5 5 】

サンプル 1 の細胞計数を実施した。N C - 2 0 0 で使用される希釈倍率を示す。生存 ( 生 ) 細胞濃度と生存率を以下に記録した。すべてのサンプルについて繰り返した。

【 2 0 5 6 】

フィーダー細胞数及び濃度及び生存率の決定。記録されたデータを使用して 4 つの計数の平均を計算： ( フィーダー 1 + フィーダー 2 + フィーダー 3 + フィーダー 4 ) / 4。生存可能なフィーダー細胞の総数を計算する。フィーダー細胞懸濁液の量 × 平均濃度。生存可能なフィーダー細胞の総数が少なくとも  $1 \times 10^9$  個の細胞である場合、フィーダー細胞濃度を調整するために次のステップに進んだ。生存可能なフィーダー細胞の総数 <  $1 \times 10^9$  個の細胞であった場合は、管理者に連絡した。

【 2 0 5 7 】

p 1 0 0 0 マイクロピペットを使用して、腫瘍洗浄培地 9 0 0 μ l を O K T 3 アリコート ( 1 0 0 μ L ) に移した。上下に 3 回ピペッティングして混合した。

【 2 0 5 8 】

10

20

30

40

50

フィーダーセルバッグ # 2 に  $1 \times 10^9$  個の細胞を追加するためフィーダーセルバッグ # 1 から除去するフィーダー細胞の量を計算した。  $1 \times 10^9$  / 平均生細胞濃度。

【2059】

フィーダーバッグを暖かいパックの上に置いたまま、フィーダーセルバッグ # 1 からフィーダーセルバッグ # 2 に移す量を決定した。新しい 100 ml シリンジに 50 ml の空気を吸引し、の現在のシリンジと交換した。フィーダーセルバッグ # 2 に空気を排出した。フィーダーセルバッグ # 1 を確実に混合させた。計算された量 (ステップ 5 . 9 ) をフィーダーセルバッグ # 1 からシリンジで取り出した。大量の場合は、追加のシリンジを使用した。フィーダーセルバッグ # 2 につながるクランプを開き、取り出した量をシリンジからフィーダーセルバッグ # 2 に移した。シリンジを逆さにして空気を注入し、ラインをクリアにした。

10

【2060】

フィーダーセルバッグ # 2 の N I S を消去した。18 G 針を取り付けた 1 ml シリンジを使用して、ステップ 5 . 8 で調製した O K T 3 を 0 . 6 ml 吸い上げた。針を取り外し、O K T 3 をフィーダーセルバッグ # 2 に N I S を通じて分注した。

【2061】

マニホールドからフィーダーセルバッグ # 2 を切り離した。将来の溶接のために十分なチューブを残してヒートシールした。フィーダーセルバッグ # 2 を限定培地バッグに滅菌溶接した。フィーダーセルバッグ # 2 を天秤にかけ、風袋を計った。

【2062】

2 L 2000 ml の総量に対する Q S に必要な量 - 移したフィーダー細胞懸濁液の量を計算した。すべてのクランプを開き、計算された量を移した、 $1 \text{ g} = 1 \text{ ml}$  と推測。必要な量が転送されたときにクランプする。空になったら、新しい培地バッグを無菌溶接して培地バッグを交換する。

20

【2063】

必要量がフィーダーセルバッグ # 2 に移されたら、フィーダーバッグを上に向け、空気でラインをクリアする。ヒートシールを 3 回行い、中央のシールを破り、約 12 インチのチューブを残した。このチューブは、G - R e x 100 M C S フラスコの赤い線に接続されていた。必要に応じて増殖セットを取り付けた。

【2064】

移されたフィーダーセルバッグ # 2 をインキュベーターへ移した。インキュベーターに配置した時間及びインキュベーター # を記録した。腫瘍処理開始日時を記録した。腫瘍の合計ホールドタイムが出荷用培地であると判断した。

30

【2065】

組織解剖

6 つのウェルプレートに「過剰腫瘍片」のラベルを付けた。4 つの 100 mm ペトリ皿のそれぞれに、「洗浄\_\_01」、「洗浄\_\_02」、「洗浄\_\_03」、「洗浄\_\_04」及び「保持」とラベルを付けた。過剰腫瘍片と表示された 6 つウェルプレートのすべてのウェルに 5 ml の腫瘍洗浄培地を添加した。洗浄\_\_01、洗浄\_\_02、洗浄\_\_03、及び保持とラベルがついた各 100 mm ペトリ皿に 50 ml の腫瘍洗浄培地を添加した。

40

【2066】

50 ml コニカルチューブ鉗子洗浄媒体を 1 つ、メス洗浄媒体を 1 つ、及び蓋ドロップ洗浄媒体を 1 つ、ラベルを付けた。4 本の 50 ml コニカルチューブに、断片チューブ 1 ~ 断片チューブ 4 のラベルを付けた。25 ml の腫瘍洗浄培地を、断片チューブ 1 ~ 断片チューブ 4 のラベルを付けた 50 ml コニカルチューブのそれぞれに移した。20 ml の腫瘍洗浄培地を、鉗子洗浄培地、メス洗浄培地、蓋滴洗浄培地とラベルがついた 50 ml コニカルチューブのそれぞれに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保ちさらに使用するために、腫瘍洗浄培地を B S C に保管した。

【2067】

解剖のみのために、メスと短い鉗子を「鉗子洗浄培地」及び「メス洗浄培地」のラベル

50

が付いた適切なチューブに入れた。腫瘍容器を B S C に移した。長いピンセットを使用して、腫瘍を検体ボトルから洗浄\_\_01のラベルが付いた100mmペトリ皿に移した。

【2068】

洗浄\_\_01中で3分間、周囲温度で腫瘍を培養した。出荷培地から腫瘍が取り除かれ、洗浄\_\_01に移された時間を記録した。

【2069】

検体ボトルに再び蓋をし、天秤に移した。検体ボトルの重量を記録し、腫瘍組織の重量差を計算した。

【2070】

10mLの腫瘍出荷培地を、腫瘍出荷培地とラベルの付いたチューブに移した。腫瘍出荷培地チューブに移した量を記録した。 10

【2071】

腫瘍出荷培地10mLを18G針の付いたシリンジに吸い込む。5mLの腫瘍出荷培地を嫌気性及び好気性滅菌ボトルに1つずつ播種した。

【2072】

各ペトリ皿に解剖1～解剖4のラベルを付けた。腫瘍インキュベーション1の停止時間を記録した(少なくとも3分間のインキュベーション後)。ピンセットを使用して、腫瘍を洗浄\_\_02のラベルの付いた100mmペトリ皿に移した。腫瘍を周囲温度で少なくとも3分間インキュベートした。腫瘍のインキュベーション開始時間を記録した。腫瘍のインキュベーション停止時間を記録した。 20

【2073】

ピンセットを使用して、腫瘍を Wash\_\_03 のラベルの付いた100mmペトリ皿に移し、腫瘍を周囲温度で少なくとも3分間インキュベートした。腫瘍の潜伏開始時間。腫瘍のインキュベーション開始時間を記録した。腫瘍のインキュベーション停止時間を記録した。洗浄が完了した後、組織が水和したままであることを確認するために、腫瘍を「保持」皿に移動させる必要がある。

【2074】

解剖プロセス全体でペトリ皿の蓋の下に定規を置いたままにした。長い鉗子を使用して、解剖1と表示されたペトリ皿に腫瘍を移した。腫瘍の長さを受け取った断片の数を測定して記録した。腫瘍の長さは、元の腫瘍の直径の合計として測定した。 30

【2075】

解剖皿の腫瘍の最初の解剖を、4つの中間片、または同等の体積の4つのグループに分けて実施した。切断中、各中間片の腫瘍構造を維持するように注意した。腫瘍が非常に小さい場合、腫瘍全体を一度に解剖することができる。組織の水和を維持するために、積極的に解剖されていない中間腫瘍片を保持皿に移した。解剖1～解剖4のラベルが付いたペトリ皿の各蓋に、10～20滴(約1mL)を添加して、プレートの端に近い洗浄バッファのプールを形成し、解剖された断片を保持する。解剖される各中間断片またはグループに対して繰り返す。オペレーターの裁量により、新鮮なメスとピンセットを使用することができる。腫瘍解剖の開始時間を記録した。

【2076】

解剖皿の蓋の下にある定規を参照として使用して、腫瘍を27mm<sup>3</sup>の断片(3×3×3mm)にやさしく解剖した。迅速に作業し、組織全体を断片に解剖した。脱水を防ぐために、解剖された断片を各皿内のバッファプールに移しながら解剖皿の蓋を1つずつ作業した。 40

【2077】

トランスファーピペット、メス、またはピンセットを使用して、得られた縦断片をカウントした。各皿の値を記録した。中間断片が60個の断片を産生しなかった場合、60個の断片に達するまで、次の中間断片を同じ皿で解剖することができる。

【2078】

蓋を交換し、必要に応じて2番目、3番目、及び4番目の中間断片の解剖に進めた。 50

## 【2079】

プロセスの操作中に蓋が交差しないように注意した。

## 【2080】

解剖手順全体で組織を常に水和状態に保つように注意した。断片を水和状態に保つためにそれらにバッファーを追加する必要がある場合は、トランスファーピペットを使用した。

## 【2081】

カウントされた最終断片の総数。注：生成された最終断片の数に応じて、最大4つのG-Rex100MCSフラスコを準備した。最大240個の断片が播種した。

## 【表50】

表50：最終断片の総数

オプション	断片の総数	播種用のフラスコ	プレフラスコ断片
A	30未満の断片	1	断片の総数/1
B	31～60断片	2	断片の総数/2
C	61～90個の断片	3	断片の総数/3
D	91～240断片	4	断片の総数/4

10

## 【2082】

上記の表を使用して、播種するフラスコの数及び播種する断片の数を決定する。鉗子、転送ピペット、またはメスを使用して、決定された数の断片を、表に従って断片チューブ1～断片チューブ4とラベルを付けた50mLコニカルチューブに移し、次の手順で各50mLチューブに移した断片を記録した。

20

## 【2083】

各断片チューブに追加する断片の数（つまり、発生した断片の数/セクション7.24の上記の表の播種するフラスコの数）を該当する各断片チューブに添加した。以下に、チューブごとの浮遊断片の数を記録した。「余剰腫瘍片」皿から利用可能な場合、浮遊断片の数に等しい追加の断片を添加した。腫瘍処理の解剖停止時間を記録した。

## 【2084】

断片チューブ1～断片チューブ4のコニカルチューブに良好な組織断片を保持しながら、BSCから不要なアイテムをすべて取り除いた。未使用の腫瘍をすべて廃棄した。

30

## 【2085】

フィーダー細胞懸濁液を含むG-REX100MCSフラスコを調製した。断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するG-Rex100MCSフラスコの数进行計算した。インキュベーターからフィーダーセルバッグ#2を取り出した。G-Rex100MCS#1の播種：外装パッケージを開封し、G-Rex100MCSをBSCに配置した；フィルターラインへのクランプを除く、G-Rex100MCSのすべてのクランプを閉じた；すべてのルアーロックが確実に固定されていることを確認した。GREX100MCSを1つずつ作業した。

40

## 【2086】

フィーダーセルバッグ#2をG-Rex100MCSフラスコの赤い線に合わせ滅菌溶接し、バッグを定期的に混合した。G-Rexフラスコを分析天秤に置き、風袋引きした。G-Rex100MCSフラスコ#1を腫瘍断片培養（0日目）とラベルを付け、フラスコをBSCに移した。

## 【2087】

G-Rex100MCS#2～#4の播種：追加のG-Rex100MCSフラスコについては、大きなフィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。フィーダーバッグをフラスコの赤い線に溶接した。必要に応じて、各フラスコに播種するために同じ操作を繰り返した。細胞懸濁液の添加量を記録した。G-Rex100MCSフラスコ#2を腫

50

瘍断片培養（0日目）とラベルを付け、フラスコをBSCに移した。G - R e x 1 0 0 M C S フラスコ # 1 ~ # 4 を腫瘍断片培養（0日目）とラベルを付けた。

G - R e x 1 0 0 M C S 腫瘍断片培養0日目（最大4日）G R E X 1 0 0 M C S フラスコの識別。

【2088】

G - R E X 1 0 0 M C S への腫瘍断片の追加を開始した。G - R e x 1 0 0 M C S を1つずつ作業した。フィーダー細胞懸濁液を含むG - R e x 1 0 0 M C S をBSCに移した。BSC内で、腫瘍断片培養（0日目）1のラベルが付いたG - R e x 1 0 0 M C S 及び50mLの断片チューブのラベルが付いたコニカルチューブのキャップを外した。開けた断片チューブ1を回転させながら、同時にG - R e x 1 0 0 M C S のキャップを少し持ち上げた。破片の入った培地をG - R e x 1 0 0 M C S に回転させながら添加した。G - R e x と蓋との位置が合うように注意し、キャップをしっかりと閉めた。G R e x 1 0 0 M C S に移した断片の数を記録した。G R e x 1 0 0 M C S で観測された浮遊断片の数を記録した。

10

【2089】

断片がG R E X フラスコの底の位置にきたら、1つの10mLシリンジを青いキャップN I S に接続し、7mLの培地を取り出した。7つの1mLアリコートを作成し、約5mLは増殖特性評価用であり、2mLは無菌サンプル用である。スポンサーから要求されるまで、増殖特性評価用の5つのアリコート（最終断片培養上清）を5~20で保存した。1mLの最終断片培養上清が入った、嫌気性B a c T / A l e r t ボトルと1つの好気性B a c T / A l e r t ボトルを接種させた。サンプリングしたフラスコごとに繰り返した。

20

【2090】

G - R e x 1 0 0 M C S ごとに繰り返した。

【2091】

G R E X 1 0 0 M C S フラスコをインキュベーターに配置した時間を記録した。インキュベーターの温度及びC O <sub>2</sub> の読み取り値を記録した。0日目処理の終了時刻を記録した。

【2092】

プロセスG e n 3 - 7 日目

限定培地1及びウォームパックのインキュベーション開始日時を記録した。培地及びウォームパックを一晩（約18時間）加温した。培地及びウォームパックのインキュベーションの終了時刻と日付を記録した。培地及びウォームパックは一晩温めましたか？いいえの場合は、管理者に連絡した。

30

【2093】

フィーダーセルバッグを調製し、処理開始を記録した。E V 1 0 0 0 N バッグをフィーダーセルバッグ#1及びバッグ#2とラベル付けした。フィーダーセルバッグ#1 & #2のすべてのクランプを閉じた。調製した培地バッグをフィーダーセルバッグ#1に滅菌ウェルダを使用して滅菌溶接した。処理中にフィーダーセルバッグ#1 & #2の未使用のチューブを止血した。フィーダーセルバッグ#1を分析天秤に配置し、風袋引きした。ラインをクランプし、I V ポールに培地バッグを掛けた。500mL ± 10mLの培地を重力によってフィーダーセルバッグ#1に移し、添加した量を記録した。1g = 1mLと仮定。

40

【2094】

元の長さのチューブをそのままに、フィーダーセルバッグ#1をヒートシールして取り出した。フィーダーセルバッグ#1をBSCへ移した。

【2095】

フィーダー細胞の調製解凍する凍結保存フィーダーセルバッグのロット番号を文書化した。2つの異なるロットが使用されていることを確認した。フィーダーセルバッグを37の水浴で3~5分間解凍した。解凍の開始時刻を記録した。解凍の終了時刻を記録した

50

。水浴からフィーダーセルバッグを取り出し、バッグが乾燥していることを確認した。

【2096】

フィーダーセルバッグ#1をマニホールド上のルアーコネクタの1つを使用してCC1に接続した。フィーダーセルバッグ#2をマニホールド上の他方のルアーコネクタの1つを使用してCC1に接続した。100mLのシリンジに20mLの空気を吸い込んだ。シリンジがオフの位置になるように活栓を動かした。CC1マニホールド上のシリンジを100mLシリンジに交換した。CC3からのからスパイクを有するフィーダーセルバッグの各々をフィーダーバッグの単一のポートにスパイクした。

【2097】

活栓弁を回して、フィーダーセルバッグ#1及び2をオフの位置にした。バルブは何が閉じているかを示した。 10

【2098】

フィーダーバッグラインのクランプを開けた。両方のフィーダーセルバッグの内容物を1回の吸引でシリンジに吸い上げた。回収された総量を記録した。フィーダーセルバッグ#1及びフィーダーセルバッグ#2を予熱パックの上に維持した。

【2099】

フィーダーバッグがオフの位置になるように活栓バルブを回転させ、フィーダーセルバッグ#1の方向にすべてのクランプを開いた。

【2100】

シリンジの中身を軽く混ぜながらフィーダーセルバッグ#1に分注した。活栓を回転させたのでフィーダーセルバッグ#1はオフの位置にあった。フィーダーセルバッグ#1に細胞をよく混合した。フィーダーセルバッグ#1のNISに10mLのシリンジを装着し、バッグを混合し、シリンジを少なくとも6mLの細胞で3回洗い流してから、1mLのサンプルを取り出した。サンプルをクライオバイアル1に移した。各サンプルに新しい10mLシリンジを使用して、サンプル2、3、及び4について繰り返した。 20

【2101】

フィーダー細胞懸濁液の量を計算した。

【2102】

フィーダー細胞数と濃度調整。必要に応じて、各細胞分画サンプルをAIM-Vで希釈して調製した(1:10希釈を推奨)。NC200の最適な濃度範囲は $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$  cells/mLであった。4.5mLのAIM-Vを入れたコニカルチューブを4本調製した。細胞数ごとに0.5mLの細胞分画を添加した。サンプルを混合し、各希釈チューブから500pLを新しいクライオバイアルチューブに移した。サンプルをよく混合し、細胞数を数えた。生存(生)細胞濃度と生存率を記録した。サンプル2、3、及び4について繰り返した。 30

【2103】

ステップ4.3にて記録されたデータを使用して4つの計数の平均を計算： $(\text{フィーダー}1 + \text{フィーダー}2 + \text{フィーダー}3 + \text{フィーダー}4) / 4$ 。生存可能なフィーダー細胞の総数を計算する。フィーダー細胞懸濁液の量(ステップ3.15)  $\times$  平均濃度。生存可能なフィーダー細胞の総数が少なくとも $2 \times 10^9$ 個の細胞である場合、フィーダー細胞濃度を調整するために次のステップに進んだ。 40

【2104】

フィーダーセルバッグ#2に $2 \times 10^9$ 個の細胞を追加するためフィーダーセルバッグ#1から除去するフィーダー細胞の量を計算した。 $2 \times 10^9 /$  平均生細胞濃度。

【2105】

p1000マイクロピペットを使用して、900uLのHBSSを100uLのOKT3アリコートに移した。上下に3回ピペティングして混合した。2つのアリコートを調製したフィーダーバッグを暖かいパックの上に置いたままで、フィーダーセルバッグ#1からフィーダーセルバッグ#2に移す量を決定した。新しい100mLシリンジに50mLの空気を吸引し、現在のシリンジと交換した。フィーダーセルバッグ#2に空気を排 50

出する。フィーダーセルバッグ# 1を確実に混合させた。計算された量をフィーダーセルバッグ# 1からシリンジで取り出した。フィーダーセルバッグ# 2につながるクランプを開き、取り出した量をシリンジからフィーダーセルバッグ# 2に移した。シリンジを逆さにして空気を注入し、ラインをクリアにした。必要に応じて、シリンジを取り外し、シリンジに空気を入れて、フィーダーセルバッグ# 2に分注した。フラスコの重力充填を容易にするために、十分な空気が利用可能であることを確認した。

【2106】

フィーダーセルバッグ# 2のNISを消去18G針が取り付けられた1mLシリンジを使用して、ステップ14.9で調製したアリコートの中の1つから0.6mLのOKT3を吸い上げた。針を取り外し、OKT3をフィーダーセルバッグ# 2にNISを通じて分注した。フィーダーセルバッグ# 2を逆さにし、培地がポートの近くにあることを確認し、シリンジを0.5mLのフィーダー細胞でフラッシュして確実にすべてのOKT3をバッグに添加した。合計1.2mLのOKT3をフィーダーセルバッグ# 2に分配するために、第2のアリコートで繰り返した。シリンジを0.5mLのフィーダー細胞産物でフラッシュして確実にすべてのOKT3をバッグに添加した。

10

【2107】

将来の溶接に使用するのに十分なチューブを残してフィーダーセルバッグ# 2をマニホールドからヒートシールした。フィーダーセルバッグ# 2を培地バッグに滅菌溶接した。フィーダーセルバッグ# 2を天秤に配置し、風袋引きした。可能であれば、2つの培地バッグを一度に溶接することができる。2L2000mLの総量に対するQSに必要な量 - 移したフィーダー細胞懸濁液の量を計算した。

20

【2108】

すべてのクランプを開き、計算された量を移した(1g = 1mLと推測)。必要な量が転送されたときにクランプする。培地バッグが空になったら、必要に応じて新しい培地バッグを無菌溶接して交換する。

【2109】

必要量がフィーダーセルバッグ# 2に移されたら、フィーダーバッグを上に向け、空気でラインをクリアする。クランプを閉じ、ヒートシールを3回行い、中央のシールを破り、約12インチのチューブを残した。このチューブは、G-REX100MCSフラスコの赤い線に接続されていた。

30

【2110】

フィーダーセルバッグ# 2をインキュベーターへ移した。インキュベーターに配置した時間を記録した。フィーダー細胞懸濁液を含むG-REX100MCSフラスコを調製した。0日目に生成されたG-REXフラスコの数に従って、処理するG-REX100MCSフラスコ数を記録した。インキュベーターからG-REXフラスコを取り出し、フラスコを取り出すたびにフラスコを取り出した日時を記録した。インキュベーターからフィーダーセルバッグ# 2を取り出した。

【2111】

フィーダー細胞懸濁液添加前の上清の除去。G-REX100MCSをBSCに移し、10mLシリンジ1本を青いキャップのNISに接続した。5mLの培地を吸い上げた。5つの1mLアリコートを作成した。スポンサーから要求されるまで、増殖特性評価用の5つのアリコート(前処理培養上清)を約-20で保存した。バイアルに適切なフラスコ番号のラベルを付けた。G-REX100MCSへのフィーダー細胞の播種を続けた。G-REX100MCSフラスコごとに手順を繰り返した。

40

【2112】

G-REX1の播種: G-REX100MCSのすべてのクランプが、フィルターラインへのクランプを除いて閉じていることを確認した。GREX100MCSを1つずつ作業した。フィーダーセルバッグ# 2をG-REX100MCSフラスコの赤い線に合わせ滅菌溶接した。ハングフィーダーセルバッグ# 2をIVポールにかけ、確実にバッグを定期的に混合した。G-REXフラスコを分析天秤に置き、風袋引きした。すべてのライン

50

のクランプを解除し、500 mLのフィーダーセルバッグ#2を重量でG-Rex 100 MCSフラスコ1に重力移動させた。1 g = 1 mLと仮定した。各フラスコに添加したフィーダー細胞分画の量を記録した。必要な量がG-Rexフラスコに移されたら、G-Rexに近いチューブのクランプを閉じて、フラスコへのフィーダーの追加を停止した。フィーダーバッグを逆さにし、チューブ内のフィーダーサスペンションがフィーダーバッグに戻るようにした。

#### 【2113】

G-Rex 100 MCS (#1) 7日目 - TIL培養 + フィーダー細胞とラベルを付けた。G-Rex 100 MCSをインキュベーターに移し、日時を記録した。G-Rex 2~4の播種：追加のG-Rex 100 MCSフラスコについては、大きなフィルターラインを除くすべてのクランプが閉じていることを確かめた。溶接フィーダーセルバッグ#2をレッドラインに溶接した。必要に応じて、各フラスコに播種するために繰り返した。細胞懸濁液の添加量を記録した。G-Rex 100 MCSを7日目 - TIL培養 + フィーダーセル及び最大4つのGREX 100 MCSフラスコとラベル付けした。時間を記録した。

10

#### 【2114】

プロセス Gen 3 - 11日目

TIL処理の調製

限定培地 (DM2) インキュベーションの開始日時を記録した。培地を一晩 (約18時間) 加温した。培地インキュベーションの終了時間と日付を記録した。TIL懸濁液をGREX 100 MCSからGREX 500 MCSに移した。処理開始時間を記録した。インキュベーターから第1のG-Rex 100 MCSフラスコを取り出し、BSCに移した。大きなフィルターラインを除いて、すべてのクランプが閉じていることを確認した。すべてのルアーロックが固定されていることを確認した。青いキャップのNISに10 mLのシリンジを1本接続し、7 mLの前処理培養上清を吸引した。

20

#### 【2115】

培養上清の前処理

7つの1 mLアリコートを作成し、5 mLは増殖特性評価用であり、2 mLは無菌サンプル用である。このサンプルは、フラスコを混合する前に各フラスコから採取する必要がある。フラスコごとに繰り返した。

30

#### 【2116】

マイコプラズマ上清回収：

新しいシリンジを使用して、青いキャップNISを使用して、各フラスコから適切な量の上清を取り出した。フラスコの数に応じて取り出す量については、以下を参照されたい。上清を、10/11日目マイコプラズマ上清というラベルの付いた15 mLコニカルチューブに移した。全部で10 mL取り出した。このサンプルは、フラスコを混合する前に各フラスコから採取する必要がある。セクション4で必要になるまで、BSCに15 mLコニカルチューブを保持した。

40

- ・フラスコ1個 = 10 mL
- ・フラスコ2個 = 5 mL / フラスコ
- ・フラスコ3個 = 3.3 mL / フラスコ
- ・フラスコ4個 = 2.5 mL / フラスコ

#### 【2117】

QCサンプル回収：

やさしく回転させてフラスコを慎重に混合し、細胞を懸濁させた。新しいシリンジを用いて、処理するフラスコの数に応じて以下の量を取り出し、50 mLコニカルチューブに添加した。各フラスコから取り出されたサンプルは別々に保管され、プールしていない。

- ・フラスコ1個 = 40 mL
- ・フラスコ2個 = 20 mL / フラスコ
- ・フラスコ3個 = 13.3 mL / フラスコ

50

・フラスコ 4 個 = 1 0 m L / フラスコ

【 2 1 1 8 】

各コニカルチューブを 1 0 / 1 1 日目 Q C サンプルフラスコ # のラベルを付けた。セクション 4 で必要になるまでインキュベーターに保存した。フラスコごとに繰り返した。

【 2 1 1 9 】

スポンサーから要求されるまで、各フラスコから増殖特性評価用の 5 つのアリコート ( 前処理培養上清 ) を約 2 0 で保存した。

【 2 1 2 0 】

嫌気性 B a c T / A l e r t ボトルと 1 つの好気性 B a c T / A l e r t ボトルを接種させ、各ボトルには、サンプリングされた各フラスコの無菌試験のために以前に回収された 1 m L の前処理培養上清が入っていた。G - R e x 5 0 0 M C S への細胞懸濁液の移動を続けた。

【 2 1 2 1 】

注：以降の手順は、B S C の外で複数の G - R e x 1 0 0 M C S フラスコに対して並行して実施することができる。各 G - R e x 1 0 0 M C S を、対応する番号を持つ独自の G - R e x 5 0 0 M C S に移した ( 例えば、G - R e x 1 0 0 M C S # 1 は G - R e x 5 0 0 M C S # 1 に移される ) 。

【 2 1 2 2 】

Y 型血液フィルターの入力ラインの 1 つに、I I L 懸濁液を含む G - R e x 1 0 0 M C S 上 L の透明な細胞採取ラインを滅菌溶接した。B S C 内で G - R e x 5 0 0 M C S を開けた。大きなフィルターラインを除くすべてのクランプが閉じていることを確認してから、B S C から G R E X 5 0 0 M C S を取り出し、フィルターの末端を G - R e x 5 0 0 M C S の赤ラインに溶接した。漏れを防ぐために、血液フィルターの未使用の入力ラインをヒートシールした。G - R e x 1 0 0 M C S からのクリアラインを G a t h e R e x 上の青回収クランプへ差し込んだ。G - R e x 5 0 0 M C S への細胞懸濁液の転送：G - R e x 5 0 0 M C S につながるすべてのクランプを解放した。細胞懸濁液を G - R e x 5 0 0 M C S フラスコに移した。液体の移動が始まったら、チャンバーが液体で完全に満たされるまで、血液フィルターの末端を持ち上げた ( 血液フィルターを垂直に上下逆さまに保持する ) 。フィルターが完全にプライミングされた後、ベンチに水平にセットすることができる。\* ラインを詰まらせる可能性があったため、腫瘍断片が G - R e x 1 0 0 M C S の外に移されることを防いだ。青い X を押して G - R e x 1 0 0 M C S の容量が 5 0 0 m l に減った時点で、フラスコを目盛りを使用して収集を停止した。優しくフラスコを回転させて培地に細胞を再懸濁させた。組織片が観察された場合は、フラスコを 4 5 ° の角度に傾け、回収ストローの反対側に沈降させた。細胞懸濁液の G R e x 5 0 0 M C S フラスコへの移動を再開した。G - R e x 1 0 0 M C S の容量が 3 0 0 m l ~ 2 0 0 m l に減ったとき、フラスコを目盛りを使用して収集を停止した。フラスコを回転させて、培地に細胞を再懸濁した。組織片が観察された場合は、フラスコを 4 5 ° の角度に傾け、収集ストローの反対側に沈降させた。細胞懸濁液の G - R e x 5 0 0 M C S フラスコへの移動を再開した。青い X を押して 1 0 0 M C S の容量が - 1 0 0 m l に減った時点で、フラスコを目盛りを使用して収集を停止した。フラスコを回転させて培地に細胞を再懸濁させた。組織片が観察された場合は、フラスコを 4 5 ° の角度に傾け、収集ストローの反対側に沈降させる。沈降したら、ゆっくりとフラスコを回収ストローの方に傾けて戻し、断片を反対側に残し、ストローの周りに培地が溜まるようにした。傾斜を維持し、G - R e x 5 0 0 M C S フラスコへの細胞懸濁液の移動を再開した。ラインに空気が入ったところで G a t h e R e x が止まった。血液フィルターを逆さまにする ( Y 部分を上にする ) 。すべての液体がフィルターとチューブから 5 0 0 M C S フラスコに移されるまで繰り返した。完了したら、すべてのクランプを閉じてヒートシールし、G - R e x 1 0 0 M C S を取り外した。G - R e x 1 0 0 M C S 及びフィルターアセンブリは廃棄することができる。

【 2 1 2 3 】

フラスコに G - R e x 5 0 0 M C S # 1 ~ # 4 とラベルを付けた：各 G - R e x 5 0 0

MCSでラベル付け手順を繰り返した。使用するまでG - R e x 5 0 0 M C Sを# 1インキュベーターに移動させ、次のG - R e x 1 0 0 M C S回収を続行した。G - R e x 2 ~ 4 : 追加のG - R e x 1 0 0 M C Sフラスコについて、G - R e x 1 0 0 M C SからG - R e x 5 0 0 M C SフラスコへのT I L懸濁液の移動について同じことを繰り返した。インキュベーターID及びG - R e x 5 0 0 M C Sをインキュベーターに配置した時間を記録した。

#### 【 2 1 2 4 】

##### 培地追加

注：次の手順は、各G - R e x 5 0 0 M C Sフラスコに対して並行して実施することができる。処理する各G - R e x 5 0 0 M C Sについて、インキュベーターから4 Lの培地を取り出した。各培地バッグを4 S 4 M 6 0 マニホールドの脚に溶接した。端子端のクランプが閉じていることを確認した。インキュベーターから5 0 0 M C Sフラスコを取り出し、5 Lの目盛りに印を付けた。マニホールドの末端を5 0 0 M C Sフラスコの赤いラインに溶接した。4つの培地バッグを吊るし、重力によって培地を移動させた。充填量が5 Lを超えないようにした。

10

#### 【 2 1 2 5 】

G R E X 5 0 0 M C Sをインキュベーターに移した。以下の適切なステップでインキュベーターにフラスコを配置した時間を記録した。各G - R e x 5 0 0 M C Sフラスコごとに手順を繰り返した。G - R e x 1 ~ 4 (及び追加のもの)を3 7 %、5 % C O 2のインキュベーターに配置した。インキュベーターID及び時間を記録した。すべてのフラスコを配置した後、インキュベーターの温度及びC O 2の読み取り値を記録した。

20

#### 【 2 1 2 6 】

##### QCサンプル調製

D 1 0 / 1 1 Q Cサンプルフラスコ#のラベルの付いたコニカルチューブをインキュベーターから取り出した。取り出した時間を記録した。5 m Lピペットを使用してサンプルをよく混合し、計数用に4つの0 . 5 m Lアリコートをして1 ~ 4とラベル付けされたクライオバイアルに移した。コニカルごとに繰り返した。計数用のすべてのサンプルが各フラスコにコニカルチューブから分注された後、「1 0 / 1 1日目プールしたQCサンプル」のラベルの付いた1つの新しい5 0 m Lコニカルチューブに体積をプールした。ピペットを使用して、プールしたサンプルをよく混合し、計数用にプールしたサンプルの4つの0 . 5 m Lアリコートをして1 ~ 4とラベル付けされたクライオバイアルに移した。N C - 2 0 0の生存率とC e l l C o u n t \_ l o v a n c eプロトコルを使用した。N C - 2 0 0を使用して、サンプル1の細胞計数を実施した。N C - 2 0 0で使用した希釈倍率を必ず示すこと。生存(生)細胞濃度と生存率を以下に記録した。サンプル2、3、及び4について繰り返した。

30

#### 【 2 1 2 7 】

フラスコ1(フラスコが1つだけの場合、プールされたサンプルはカウントされない)記録されたデータを使用して4回の計数の平均を計算： $(\text{フラスコ1 T I L 1} + \text{フラスコ1 T I L 2} + \text{フラスコ1 T I L 3} + \text{フラスコ1 T I L 4}) / 4$ 。フラスコ2ステップ4 . 7で記録されたデータを使用して4回の計数の平均を計算： $(\text{フラスコ2 T I L 1} + \text{フラスコ2 T I L 2} + \text{フラスコ2 T I L 3} + \text{フラスコ2 T I L 4}) / 4$ 。フラスコ3ステップ4 . 9で記録されたデータを使用して4回の計数の平均を計算： $(\text{フラスコ3 T O \_ 1} + \text{フラスコ3 T I L 2} + \text{フラスコ3 T I L 3} + \text{フラスコ3 T I L 4}) / 4$ 。フラスコ4ステップ4 . 11で記録されたデータを使用して4回の計数の平均を計算： $(\text{フラスコ3 T I L 1} + \text{フラスコ3 T I L 2} + \text{フラスコ3 T I L 3} + \text{フラスコ3 T I L 4}) / 4$ 。

40

#### 【 2 1 2 8 】

プールされた、ステップ4 . 13で記録されたデータを使用して4回の計数の平均を計算： $(\text{プールされた T I L 1} + \text{プールされた T I L 2} + \text{プールされた T I L 3} + \text{プールされた T I L 4}) / 4$ 。プールされたサンプル計数から総生存細胞数を計算した。フラスコが1つだけの場合は、フラスコ1計数を使用する。細胞懸濁液の体積(4 0 m L - 計数の

50

ために取り出した総体積) × 平均生存濃度。マイコプラズマ検査のための、 $1 \times 10^6$  個の細胞を取り出すために必要な体積を計算した。 $1 \times 10^6$  細胞 / 平均生存濃度 (ステップ 4.14 または 4.6)。計算された体積を取り出し、10 / 11 日目マイコプラズマ上清のラベルの付いたチューブに入れた。 $1 \times 10^6$  個の細胞が添加されたことを示すためにチューブに印を付けた。10 / 11 日目 QC サンプルチューブに残っている総生存細胞を計算した。TVC:  $1 \times 10^6$  個の細胞。 $10 \times 10^6$  細胞 / mL の濃度での凍結保存に必要な細胞分画 (CF) の体積を計算し細胞調製するバイアルの数を計算した。CS 10 の体積は、配合するバイアルの数と同じであった。最終体積は、各バイアルに 1 mL の CS 10 であった。遠心 10 / 11 日目 QC サンプルプールチューブとラベルの付いたコニカルチューブを 350 G で 5 分間、20 で遠心分離させた。

10

## 【2129】

上清を捨てた。計算どおりの適切な量の CS 10 を添加した。各チューブ最終濃度  $10 \times 10^6$  細胞 / mL、体積を 1.8 mL クライオバイアルに分注した; クライオバイアルあたり 1 mL。バイアルを D10 / 11 Retain とラベル付けした。分注したら、Mr. Frosty または同等内の -80 の冷凍庫に配置した。処理の終了時刻を記録した。

## IL-2 プロロイキンアリコートの調製

## 【2130】

PlasmaLyte A 中の 1% HAS の調製。16 mL の 25% HSA ストック溶液を 384 mL の PlasmaLyte A に添加し、無菌フィルターユニットに入れた。以下に体積を記録した。

20

## 【表 51】

表 51 : 体積

試薬	必要な体積
25%HAS	16mL
PlasmaLyteA	384mL
総体積	400mL

30

## 【2131】

注: 上記の体積は、最終濃度  $6 \times 10^4$  IU / mL での IL-2 バイアル 1 本を調製するのに十分である。0.22  $\mu$ m フィルターユニットを通して培地をフィルター処理した。PlasmaLyte A 中の 1% HSA とラベルを付けた。

## 【2132】

## rhIL-2 ストック溶液の調製

PlasmaLyte A 中の 1% HAS に rhIL-2 ストック溶液 ( $6 \times 10^2$  IU / mL 最終濃度) を調製した。18 G 針を 3 mL シリンジに取り付け、1.2 mL の WFI を吸い上げた。IL-2 のバイアルに注入したバイアルからシリンジを取り外していない。

40

## 【2133】

バイアルを 2 ~ 3 回逆さにして、すべての粉末が溶解するまでかき混ぜた。泡立つのを防ぐために振る、またはボルテックスはしていない。バイアルからシリンジを取り外さずに、溶液をバイアルから取り出して測定し、500 mL の滅菌ボトルに入れた。

## 【2134】

必要とする 1% HSA 希釈剤の量を計算した。注: 製造元の指示に従って、1.2 mL の WFI で再構成した後、各バイアルには  $18 \times 10^4$  IU / mL が含まれていた。

## 【2135】

500 mL 滅菌ボトルに IL-2 ワーキングストック  $6 \times 10^4$  IU / mL のラベルを付けた。再構成された IL-2 がすでに添加されている 500 mL 滅菌ボトルに計算した

50

1% H S A の量を入れた。よく混合させた。分注を容易にするために、必要に応じて適切な量を無菌標本カップに移した。I L - 2 ワーキングストック  $6 \times 10^4$  I U / m L のラベルを付けた。

【2136】

1 m L アリコート中の I L - 2 ワーキングストック  $6 \times 10^4$  I U / m L からの再構成された I L - 2 を、ラベルを付けたチューブに分注した。チューブにプロロイキン I L - 2、 $6 \times 10^4$  I U / m L のラベルを付け、- 80 で保存した。分注が完了したら、調製した 1 m L アリコートの数を記録した。

【2137】

プロセス Gen 3 - 16 / 17 日目

10 / 11 日目の予備的な無菌の検証をした。洗浄バッファの調製 (1% H A S P l a s m a l y t e A)。処理開始時刻を記録した。5 L ラボテナーを同定：「P l a s m a l y t e 1% H S A 洗浄バッファ」。

【2138】

H S A 及び P l a s m a l y t e を 5 L バッグに移して L O V O 洗浄バッファを作成した。各 H S A ボトルにミニスパイクでスパイクした。適切なサイズのシリンジを使用して、総量 125 m L の 25% H S A を延長ラインを介して 5 L バッグに移した。4 S - 4 M 60 コネクタセットのすべてのクランプを閉じた。各 P l a s m a l y t e バッグをスパイクした。4 S - 4 M 60 のオス端のうちの 1 つを A c a c i a ポンプブーツの入口ラインに溶接した。ポンプブーツの側面の 1 つを 5 L L a b t a i n e r に溶接した。ポンプへのラインを除いて、5 L バッグのすべてのクランプを閉じた。P l a s m a l y t e バッグを吊るし、全量を 5 L の L a b t a i n e r に注入した。

【2139】

5 L L a b t a i n e r バッグへのルアー接続を保持するバッグに取り付けられた 4 S 4 M 60 マニホールラインをヒートシールした。バッグを混合し、L O V O 洗浄バッファバッグを室温に保った。日付付きの L O V O 洗浄バッファのラベルを付けた。常温で 24 時間以内に期限が切れる。

【2140】

凍結保存用ブランクバッグの調製：シリンジを L O V O 洗浄バッファに接続し、50 m L の L O V O 洗浄バッファを取り出した。C S 750 バッグに移し、シリンジを使用してバッグ内の空気を除去した。ラインに赤いキャップを付けた。C S 750 バッグに、「L O V O 洗浄バッファを含むブランク」、バッチ記録のロット番号、イニシャル / 日付のラベルを付けた。

【2141】

I L - 2 調製 (プロロイキン)

I L - 2 を事前に調製した場合：L O V O 洗浄バッファバッグを混合し、適切なサイズのシリンジを使用して、40 m L の洗浄バッファを取り出し、「I L - 2  $6 \times 10^4$  I U / m L」チューブに移した。P l a s m a l y t e + 1% H S A に添加する再構成された I L - 2 の量を計算：再構成された I L - 2 の量 = ( I L - 2 の最終濃度  $\times$  最終量 ) / 比活性。比活性を記録した。I L - 2 の最終濃度：6 ) (  $10^4$  I U / m L。最終容量：40 m L 「推奨再構成容量」として記録された W F I の量を除去し、シリンジに 18 G 針を固定し、I L - 2 をバイアルに再懸濁した。18 G 針に接続された 1 m L シリンジを使用して、再構成された I L - 2 から必要な計算された初期量の I L - 2 を取り出し、「I L - 2  $6 \times 10^4$  I U / m L」チューブに移した。

【2142】

細胞収集

処理される G - R e x 500 フラスコの数記録した。採取されたフラスコの数記録した。採取するフラスコごとに 5 L の L a b t a i n e r が 1 つ必要であった。2 つ以上のフラスコを採取する場合は、2 つの E V 3000 N バッグを使用して細胞を採取した。細胞を収集するために使用したプライマリ E V 3000 N バッグの数を示した。必要な数

10

20

30

40

50

のEV3000Nバッグを準備し、細胞収集プール#のラベルを付けた。5Lバッグのすべてのクランプを閉じ、各Labtainerバッグにエクステンションセットを取り付けた。最後にエクステンションセットをヒートシールした。バッグに上清バッグフラスコ#のラベルを付けた。採取するフラスコごとに繰り返した。

**【2143】**

インキュベーターからG-Res500MCSフラスコを取り出し、Gatherexの隣のベンチトップ上に配置した。大きなフィルターラインを除いて、すべてのクランプが閉じていることを確認した。すべてのルアーロックが固定されていることを確認した。2つ以上の5L廃棄Labtainersバッグを使用する場合は、第2のGatherexポンプを同時に使用することができる。第1のG-Res500M-C Sの減容中に、次のフラスコの減容を準備することができる。G-Res500M-C Sフラスコからの赤い培地ラインを事前に調製した適切な上澄みバッグに滅菌溶接した。赤いスロットのGatherexポンプに赤いラインを配置し、GatherexラインをG-Resのフィルターラインに接続した。第1のG-Res500M-C Sフラスコの透明な収集ラインをセルコレクションプールEV3000バッグに滅菌溶接し、透明なラインをGatherexの青いスロットに配置した。第1のG-Res500M-C Sから4500mLの上清を取り除いた。上清を取り除いたら、上清バッグの上に「セルコレクションプール」バッグを配置した。G-Resフラスコを巡回させて、細胞を膜から切り離した。次のステップ中エッジを傾けたままにする。

10

**【2144】**

セルコレクションプールバッグにつながるクランプを解放した。細胞分画を採取するためにGatherexを開始した。G-Resの青いボタンを押した細胞懸濁液を収集しながらG-Resを静かに攪拌し、細胞を懸濁液中に保った。セルコレクションが停止したら、クランプを閉じる。すべてのクランプを解放し、ヒートシールした：G-Resフラスコの透明ライン；G-Resフラスコの赤いライン。すべてのG-Res500MCSフラスコを減容し採取するまで、必要に応じて繰り返した。

20

**【2145】**

QCサンプリング（マイコプラズマ試験を含む）：適切なサイズの容器1つをマイコプラズマプールサンプルのラベルを付けた。各「上清」バッグに増殖セットを無菌溶接した。最も代表的なサンプルを得るために、60mLシリンジを使用して、以下の表に従って合計「上清バッグ」から最大60mLの上清を取り除いた。複数のフラスコを採取した場合は、すべての上清をマイコプラズマプール容器に収集した。各上清15mLチューブに上清プールから10mLを分配した。2-8に保った（マイコプラズマ及びマイコプラズマ基準）。「上清-マイコプラズマ」及び「上清-マイコプラズマ基準」チューブをQCに移した。

30

**【2146】**

特性評価のための上清収集。各上清バッグから、5mLを取り出し、増殖特性評価のために1mLに分配した。スポンサーから要求されるまで、増殖特性評価用の5つのアリコート5~20で保存した。特性評価サンプルを、収集された上澄みフラスコ間で混合した。すべてのサンプルを収集した後、上清バッグを廃棄した。

40

**【2147】**

EV3000Nバッグに「LOVOソースバッグ」とラベルを付け、LOVOソースバッグ（新しいEV3000Nバッグ）をヒートシールで密閉し、接続を取り外した。BSCでy型血液フィルターを開き、すべてのクランプを閉じた。フィルターのアウトレットチューブをLOVOソースバッグに滅菌溶接した。フィルターの各インレットチューブを各細胞分画（CF）プールバッグに滅菌溶接した。濾過のためにCFプールバッグを吊るした。すべてのクランプを開き、血液フィルターを通して細胞を重力によってLOVOソースバッグに排出させた。フィルターを垂直に持ってプライミングした。細胞がバッグの底で凝固するのを防ぐ。

**【2148】**

50

すべての細胞がLOVOソースバッグに移されたら、すべてのクランプを閉じた。以前と同じ長さのチューブを維持するためにヒートシールした（ガイドとしてマークを使用する）。細胞懸濁液を含む完全なLOVOソースバッグを計量した。細胞分画体積（CF）を計算：（1gは1mlとみなされる）LOVOソースバッグの重量 - 乾燥重量。LOVOソースバッグをよく混ぜた。10mLシリンジを使用して、NISを介して1mLの細胞分画をホモジナイズして取り出し、第1にクライオバイアルに移した。残りの3つのクライオバイアルに新しい10mLシリンジを使用して、この手順を3回繰り返した。LOVOソースバッグをインキュベーターに配置した。LOVOソースバッグ内の細胞分画の残量を計算した。

#### 【2149】

自動細胞カウンターで細胞計数を実施した。4.5mLのAIM-Vを入れた15mLコニカルチューブを4本調製した。これらは事前に準備することができる。NC200の最適範囲は $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mL（1:10希釈を推奨）であった。1:10希釈について、以前に調製した4500pLのAIMVに、500pLのCFを添加した。最適な範囲を達成するために異なる希釈が必要な場合は、使用した希釈を書き記す。使用希釈倍率 = 10。NC-200を使用して、サンプル1の細胞計数を実施した。NC-200で使用した希釈倍率を必ず示すこと。生存（生）細胞濃度と生存率を以下に記録した。サンプル2、3、及び4について繰り返した。

#### 【2150】

4回の計数の平均： $(TIL01 + TIL02 + TIL03 + TIL04) / 4$ ；平均総生細胞濃度（生）；平均総生細胞濃度（生+死）；平均%生存率を計算した。TC（総細胞）pre-LOVO（生+死）= 平均総細胞濃度（TC conc pre LOVO）（ライブ+死）（ステップ4.44） $\times$  LOVOソースバッグの体積を計算した。TVC（総生細胞）pre-LOVO（生）= 平均総生細胞濃度（pre LOVO）（生）（ステップ4.44） $\times$  LOVOソースバッグの体積を計算した。

#### 【2151】

いくつかの実施形態では：TCが $> 5 \times 10^9$ 個の場合、 $5 \times 10^8$ 個の細胞を取り出し、MDA保持サンプルとして凍結保存した。 $5 \times 10^8 /$ 平均TC濃度（ステップ4.44）= 削除する量。TCが $5 \times 10^9$ 未満の場合、 $4 \times 10^6$ 個の細胞を取り出し、MDA保持サンプルとして凍結保存した。 $4 \times 10^6 /$ 平均TC濃度 = 削除する量。凍結保存ステップまでインキュベーターに保持した。

#### 【2152】

LOVOをロードする前にセルの除去が必要かどうかを確認。TVCは $150 \times 10^9$ 細胞以上ですか？（はい/いいえ）。はいの場合、続行する。いいえの場合、細胞の除去の必要はない。 $150 \times 10^9$ 生存細胞を保持するために除去する細胞数を計算：TVC pre-LOVO（ステップ4.45を参照）-  $5 \times 10^8$ または $4 \times 10^6$ またはN/A（ステップ4.46を参照）-  $150 \times 10^9$ 細胞。除去する細胞量を計算：除去する細胞数（ステップ4.48を参照） $\div$  平均生細胞濃度。計算された量の細胞懸濁液を除去し、細胞を廃棄物容器内に破棄した。LOVOソースバッグ内の細胞分画の残量を計算した。バッグの総残細胞を計算した。TC（総細胞）pre-LOVOを計算した。平均総細胞濃度（ステップ14.44を参照） $\times$  残量（ステップ4.52を参照）= 残TC pre-LOVO。必要に応じて、LOVOソースバッグをインキュベーターに配置する。インキュベーター番号とインキュベーターに配置した時間を記録した。必要に応じて、LOVOマニュアルの指示に従って、LOVO採取及びLOVOキャリブレーションに進めた。LOVO実行終了。LOVO実行が終了するまで、指示に従った。選択したプロファイルに基づいて、必要なCS10バッグの量を決定した。注：ブランクバッグを調製するには、CS10を50mL追加することが必要である。

#### 【2153】

必要なCS750凍結バッグの量を決定した。CS750バッグのジャンクション付近のすべてのクランプを閉じた。各CS750クライオバッグの同定：次の手順の指示に従

10

20

30

40

50

って、最終産物バッグにラベルを付けた。各DPバッグのバッグラベルをバッグの上部にある「パウチ」に挿入した。パウチの開いた部分を3回シールして、ラベルがずれないようにした。各DPバッグについて、ルアーのすぐ下のチューブの1つを密封し、クランプを取り外した。CC3の「スパイク」先端をCS10バッグ（CC3マニホールドの主張を維持する）に滅菌溶接した。CC3の未使用の「スパイク」vを保持する。CC3の「ルアー」先端をCS750バッグ（CC3マニホールドの主張を維持する）に滅菌溶接した。

#### 【2154】

すべての組み立てが完了したら、接合部近くの各CS750クライオバッグの未使用のチューブをシールした。必要に応じて、アセンブリをジップロックバッグに入れ、FCFポストLOVOバッグがLOVOキットから取り外されるまで冷蔵庫に入れることができる。以前にラベル付けされたCS10及びCS750バッグを使用したすべてのマニホールドアセンブリは、事前に行うことができ、使用するまで冷蔵庫に保管することができる。適切なサイズのシリンジを使用して50mLのCS10を5吸い上げた。シリンジをLOVO洗浄バッファ（セクション8で事前に準備）を含むCS750バッグブランクに接続し、50mLのCS10を注入した。スパイクポートレベルの下のチューブをトリプルヒートシールした。第2のシールポイントで切断した。CS750バッグを「LOVO洗浄バッファ及びCS10ロット#含有ブランク、イニシャル/日付でのラベルを再度付けた。CRFに配置するまで、ブランクバッグをコールドパック上で保持した。

10

IL-2 添加

20

#### 【2155】

使用されるプロセスに対応する追加するIL-2の体積を選択した。体積を次のように計算した： $\text{保持量} \times 2 \times 300 \text{ IU/mL} = \text{必要とする } 1 \text{ L-2 の IU}$ 。必要とする  $1 \text{ L-2 の IU} / 6 \times 10^4 \text{ IU/mL} = \text{FCF Post LOVO}$  バッグに追加する  $1 \text{ L-2}$  の量。ステップ3.2~3.6で作成したIL-2チューブを使用する場合：3mLシリンジに18G針を接続する。調製した  $1 \text{ L-2 } 6 \times 10^4 \text{ IU/mL}$  コニカルチューブからIL-2の体積を吸い上げた。以前に調製したIL-2アリコートを使用する場合：適切なシリンジと針を使用して、 $1 \text{ L-2 } 6 \times 10^4 \text{ IU/mL}$  のラベルの付いたアリコートチューブから計算された量を吸い上げる。針を取り外し、ポストLOVOバッグのNISを介してIL-2をFCFポストLOVOバッグに移す。

30

#### 【2156】

ラインを空気でクリアにした。すべてのIL-2が添加され、ラインに何も残っていないことを確認する。1L-2をポストLOVOバッグに添加したら、図の残りのスパイクチューブコネクタの1つに溶接して、FCFポストLOVOバッグをCC3に取り付ける。CC3マニホールドのクランプを維持した。

#### 【2157】

最終調合

50mLチューブに「FCF Retain」のラベルを付けた。当する場合はエンドトキシン基準、D16または17IFN-Retain、D16または17QC試験、及び該MDA保持用のラベルを準備する。DPバッグ、Post Lov oバッグ+IL-2及びCS10バッグをコールドパックの上に配置した。

40

#### 【2158】

100mLシリンジをCC3マニホールドに接続した。CS10バッグにつながるクランプを開いた。決定したCS10の量を吸い上げた。添加する量を再度確認した。CS10の量をFCF Post LOVOバッグに分注した。添加した量を記録した。ラインをクリアにした。やさしく混合した。CS10を添加した時間を記録した。

#### 【2159】

説明されているように、使用したプロファイルに従って、DPバッグごとに添加するFCF量を選択した。説明されているように、使用したプロファイルに対応するDPバッグごとに除去するRetain容量をマークした。

50

## 【 2 1 6 0 】

D P バッグ # 1 : 一度に1つのバッグを操作した。ベンチに向かってストップコックが下向きになるようシリンジを向けることによって、すべての量を正しく測定するように注意する。

## 【 2 1 6 1 】

F C F 量 : シリンジを取り外し、新しいものに交換した。細胞産物をよく混合した。使用するプロセスに応じて、適切な量の F C F 産物を吸い上げる。それを D P バッグ # 1 に注入した。添加した F C F 量を記録した。

## 【 2 1 6 2 】

R e t a i n 量 : 細胞産物をよく混合した。D P バッグ # 1 から D P バッグ # 1 に存在する空気を吸いあげた。使用するプロセスに応じて、適切な R e t a i n 量を吸い上げる。シリンジを逆さにして、空気でラインをクリアにした。D P バッグのクランプを閉じた。R e t a i n 5 0 m L チューブに R e t a i n 量を注入した。添加した R e t a i n 量を記録した。必要に応じて、追加のシリンジを使用して、ラインから空気を取り除く。

10

## 【 2 1 6 3 】

D P バッグ # 2 ~ # 4 : D P バッグ # 2 を繰り返した。F C F 量 : 添加した F C F 量を記録した。R e t a i n 量 : 除去した R e t a i n 量を記録した。F C F P o s t L O V O バッグの残りの量を 1 0 m L シリンジですべて吸い上げ、F C F P o s t L O V O バッグのラベルの付いたチューブに移した。

## 【 2 1 6 4 】

止血剤を使用して、すべての D P バッグのラインをクランプした。B S C からすべてのアセンブリを取り出した。クライオバッグを水平面に配置した。スパイクポートレベルの下のチューブをトリプルヒートシールした。第 2 のシールポイントで切断した。クライオバッグからチューブを取り外した。シールするクライオバッグごとにこれらの手順を繰り返した。

20

## 【 2 1 6 5 】

各 D P バッグの目視検査に進んだ。ラベルのバッチ番号が I D バッチと一致しているか ; バッグに目に見える漏れがないか ; バッグに異常な大きな細胞塊がないか ; バッグに異常な観察がなかったか、を確認する。検査後、各 D P バッグをコールドパック上または、2 ~ 8 でカセットに入れた。カセットを閉じる前に、ポートを覆うためにガーゼが配置されていることを確認した。

30

## 【 2 1 6 6 】

M D A リテンションバイアルの調製。

「M D A リテンション」のラベルが付いたチューブを 4 0 0 × g で 5 分間、2 0 でフルブレーキとフルアクセラレーションで遠心分離させた。B S C では、上清を吸引した。チューブの底を軽くたたいて残りの液体で細胞を再懸濁させた。後で C S 1 0 培地を添加するために、チューブを取っておいた。

## 【 2 1 6 7 】

細胞凍結保存

速度制御冷凍庫 ( C R F ) チャンバーを 7 0 % I P A で消毒した。以下の表 5 2 に従ってクライオバイアルを調製及び充填した。

40

【表 5 2】

サンプル ID	数及び量
参照バイアル*	8×0.5mL
エンドトキシニンリテイン*	2×0.12mL
IFN アッセイリテイン*	7×0.5mL
サテライトバイアル**	≤20×0.5mL

\*サンプルを F C F リテインのラベルの付いたチューブから採取した。 \*\*サテライトバイアルは、F C F P o s t L O V O バッグのラベルの付いたチューブ内の産物から調製した。

10

## 【 2 1 6 8 】

サンプルが前のステップで指定されたように分注された後、F C F リテインとラベル付けされたチューブは、さらなるサンプリングのために保存された。F C F リテインは破棄しなかった。

## 【 2 1 6 9 】

分注した M D A リテンションバイアル：該当する場合は、適切な量の 0 8 1 0 培地を M D A リテンションチューブに加え、5つのラベル付き M D A リテンションクライオバイアルに分注する。時間を記録した。チャンパー温度を記録し、サンプル温度を記録する。サンプル温度が  $8 \pm 1$  に達するのを待ち、チャンパー温度が  $4 \pm 1$  に達するのを待ってから、R u n を再度押す（R U N の横にライトが表示され、W A I T の横にあるライトが消える）。開始時刻を記録した。実行の開始後、オペレーターはプロファイルがステップ 2 に続くことを確認する必要があった（20 / 分 C ~ - 4 5 ）。C S 1 0 の追加時間。経過時間を計算した。凍結プロファイルが完了したら（凍結実行には約 1 時間 3 0 分かかる）、すぐに D P 及びクライオバイアルを L N 2 タンクに移した。C R F 実行の終了時刻を記録した。

20

## 【 2 1 7 0 】

1 0 m L シリンジに 1 8 G 針を固定し、5 . 4 m L のリテインを吸引した。最初に嫌気性 B a c T A l e r t ボトルに 2 . 5 m L を注入し、次に好気性 B a c T A l e r t ボトルに 2 . 5 m L を注入した。微生物学オーダーのために Q C に移した。1本の嫌気性及び1本の好気性の B a c T A l e r t ボトルに接種した。B a c T A l e r t ボトルの接種時間を記録した。

30

## 【 2 1 7 1 】

Q C 試験用に次のサンプルを分注し、Q C に移した。細胞数（4 × 0 . 5 m L バイアル）；F C F リテインチューブ（該当する Q C テスト用に保存していた残り）。5 m L ピペットを使用して、2 m L のリテインを吸引し、細胞計数と生存率試験のために 0 . 5 m L を4つのクライオバイアルに分注した。注：リテインサンプルは 2 ~ 8 に保持した。計数される F C F サンプルの希釈液を調整した。（1 : 1 0 0 希釈を推奨）N C 2 0 0 の最適範囲は  $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$  細胞 / m L であった。N C - 2 0 0 で使用している希釈倍率を示した。生存（生）細胞濃度と生存率を以下に記録した。すべてのサンプルについて繰り返した。4回の計数の平均：（T I L 0 1 + T I L 0 2 + T I L 0 3 + T I L 0 4）÷ 4 を計算した。平均総生細胞濃度（生）。平均総細胞濃度（生 + 死）。平均 % 生存率。T V C （総生細胞数）F C F （生）= 平均総生細胞濃度（F C F ）（生）× F C F の量（バッグの数 × バッグの体積）を計算した。

40

## 【 2 1 7 2 】

現在のプロセス G E N 3 中の T I L 集団による I F N - 分泌の測定

1 1 日目及び 1 7 日目の現在のプロセス G e n 3 中の T I L による I F N - 分泌。次の表は、現在の G e n 3 プロセス中の様々な日の T I L 集団による I F N - 分泌の測定結果を示している。

50

## 【表 5 3】

表 5 3 : 測定値

ロット番号	処理日	結果
W329020208240	17 日目	18051.61pg/mL
	11 日目	20377.25pg/mL

実施例 10 : 実施例 9 から更新されたプロセス G E N 3

## 【 2 1 7 3 】

10

この実施例では、更新されたプロセス G e n 3 (更新されたプロセス G e n 3) について説明し、これには、実施例 9 と同じ手順が含まれるが、次の例外 / 変更を条件としている。

## 【 2 1 7 4 】

実施例 9 : (限定培地タイプ 1 (D M 1) の培地処方には、追加の抗酸化剤または還元剤は含まれていない。

・更新されたプロセス G e n 3 : 限定培地タイプ 1 (D M 1) への B - メルカプトエタノールの最終濃度 5 5  $\mu$ M での添加、例えば、1 mL の B - M E (ストック 5 5 m M) を 1 L の D M 1 培地に添加することによる。

## 【 2 1 7 5 】

20

実施例 9 : プロセス G e n 3 の 1 サイクルで、D M 1 用は 3 つのバッグのみ、D M 2 用は最大 1 6 個のバッグが作成された。

・更新されたプロセス : 更新されたプロセス G e n 3 の 1 サイクルで D M 1 及び / または D M 2 用に任意の数のバッグを作成することができる。

## 【 2 1 7 6 】

実施例 9 : 1 5 m L コニカルチューブにアリコートを作成。

・更新されたプロセス G e n 3 : 5 0 m L コニカルチューブにアリコートを作成。

## 【 2 1 7 7 】

実施例 9 : フィーダーの調製に E V 3 0 0 0 バッグのみを使用。

・更新されたプロセス G e n 3 : フィーダー細胞の調製にチャーターメディカルバッグも使用可能。

30

## 【 2 1 7 8 】

実施例 9 : フィーダーセルハーネスに C C 3 を使用。

・更新されたプロセス G e n 3 : フィーダーセルハーネスに代替品 (C C 1、C C 2、チャータープーリングハーネスセットなど) も使用可能。

## 【 2 1 7 9 】

実施例 9 :  $1 \times 10^9$  個の総生存フィーダー細胞が必要。

・更新されたプロセス G e n 3 :  $1.25 \times 10^9$  個の総生存フィーダー細胞が必要。

## 【 2 1 8 0 】

実施例 9 : 必要な O K T - 3 の最終量が 0 . 6 m L 。

40

・更新されたプロセス G e n 3 : 必要な O K T 3 の最終量が 0 . 7 5 m L 。

## 【 2 1 8 1 】

実施例 9 : フィーダーセルバッグ # 2 での最終量が 2 0 0 0 m L 。

・更新されたプロセス G e n 3 : フィーダーセルバッグ # 2 での最終量が  $2 5 0 0 \text{ m L} \pm 2 5 \text{ m L}$  。

## 【 2 1 8 2 】

実施例 9 : 潜在的な汚染物質を除去するために、受け入れる腫瘍を 3 回洗浄した。洗浄は、それぞれ 5 0 m L の洗浄パufferを含む一連の 3 つの 1 0 0 m m ペトリ皿で実施した。腫瘍は、4 . 5 インチのピンセットを使用して、1 つの洗浄皿から次の洗浄皿に移した。各洗浄は 3 分以上行った。

50

・更新されたプロセス Gen 3 : 3つの個別の100~150 mL ボトルで腫瘍洗浄を実行し、それぞれに50~100 mLの洗浄バッファーが含まれている。8インチの滅菌鉗子を使用して、腫瘍輸送容器から腫瘍を取り出し、第1の洗浄ボトルに移す。ボトルを閉じ、静かに回転させて腫瘍を攪拌する。腫瘍は洗浄ボトルに3~5分間留まる。1回目の洗浄後、腫瘍を新しい8インチの滅菌鉗子で2番目の洗浄ボトルに移し、洗浄ステップを繰り返す。3回目の洗浄は、上記と同じ方法で完了する。

## 【2183】

実施例9 : Lid Drops 洗浄培地チューブに20 mLを添加。

・更新されたプロセス Gen 3 : Lid Drops 洗浄培地チューブに30 mLを添加。

## 【2184】

実施例9 : 許容される最終断片の最大数は240。

・更新されたプロセス Gen 3 : 最終断片の最大合計数が200に減少。

## 【2185】

実施例9 : 許容されるフラスコの最大数は0日目に4つであり、合計240個の最終断片が4つのフラスコに分割した。

・更新されたプロセス Gen 3 : 0日目に最大5つのフラスコ、合計200個の最終断片を5つのフラスコに分割する。

## 【2186】

実施例9 : フラスコあたりの断片の最大数は60 : オプション A = 断片 30 = 播種1のフラスコ ; オプション B = 31 断片 60 = 播種2のフラスコ ; オプション C = 61 断片 90 = 播種3のフラスコ ; オプション D = 91 断片 240 = 播種4のフラスコ。

・更新されたプロセス Gen 3 : フラスコあたりの断片の最大数は40 : オプション A = 断片 30 = 播種1のフラスコ ; オプション B = 31 断片 50 = 播種2のフラスコ ; オプション C = 51 断片 75 = 播種3のフラスコ ; オプション D = 76 断片 100 = 播種4のフラスコ ; オプション E = 101 断片 200 = 播種5のフラスコ。

## 【2187】

実施例9 : 4つの50 mL コニカルチューブに断片チューブ用のラベルを付けた。

・更新されたプロセス Gen 3 : 5つの50 mL コニカルチューブに断片チューブ用のラベルを付けた。

## 【2188】

実施例9 : 4つのペトリ皿に、解剖1~解剖4のラベルを付けた。

・更新されたプロセス Gen 3 : 5つのペトリ皿に、解剖1~解剖5のラベルを付けた。

## 【2189】

実施例9 : 解剖1~解剖4のラベルが付いたペトリ皿の各蓋に、10~20滴(約1 mL)を添加して、プレートの端の近くに洗浄バッファーのプールを形成し、解剖された断片を保持した。プロセスを解剖される各中間断片またはグループに対して繰り返した。

・更新されたプロセス Gen 3 : 解剖1~解剖5のラベルが付いたペトリ皿の各蓋に、約20~30滴を添加して、プレートの端の近くに4つの等しいサイズのプールを形成し、オペレーターが各グループで10個のフラグメントを最大40個まで数えることができるようにする。

## 【2190】

実施例9 : 解剖1~解剖4の断片の総数ごとに最大4つのチェックボックス。

・更新されたプロセス Gen 3 : 解剖1~解剖5の断片の総数ごとに最大5つのチェックボックス。

## 【2191】

実施例9 : 追加の断片がチューブごとに追加された後、最終的な断片数の記録はない。

・更新されたプロセス Gen 3 : 2番目のテーブルに行を追加して、フローターをカウントせず、チューブあたりの断片の総数を取得し、次にフローターを含めずすべてのフラスコをカウントして断片の総数を取得する。

10

20

30

40

50

## 【 2 1 9 2 】

実施例 9 : 各フラスコに 5 0 0 ± 2 m L を追加する。

- ・更新されたプロセス Gen 3 : 各フラスコに 5 0 0 ± 1 0 m L を追加する。

## 【 2 1 9 3 】

実施例 9 : 培地及びウォームパックのインキュベーションの終了時刻と日付を記録する

。

- ・更新されたプロセス Gen 3 : 限定培地 1 及びウォームパックのインキュベーションの開始日時を記録する。

## 【 2 1 9 4 】

実施例 9 : G R E X 1 0 0 フラスコは 4 本まで使用可能。

10

- ・更新されたプロセス Gen 3 : G R E X 1 0 0 フラスコは 5 本まで使用可能。

## 【 2 1 9 5 】

実施例 9 : 増殖特性評価にはフラスコごとに 5 m L 必要であり、5 本の別個のチューブに分注。

- ・更新されたプロセス Gen 3 : 増殖特性評価にはフラスコごとに 3 m L 必要であり、3 本の別個のチューブに分注。

## 【 2 1 9 6 】

実施例 9 : 最大 4 つのフラスコ無菌サンプルチェックボックス。

- ・更新されたプロセス Gen 3 : 最大 5 つのフラスコ無菌サンプルチェックボックス。

## 【 2 1 9 7 】

実施例 9 : 細胞懸濁液を G R E X 1 0 0 から G R E X 5 0 0 に移す ( 最大 4 つのフラスコ ) 。

20

- ・更新されたプロセス Gen 3 : 細胞懸濁液を G R E X 1 0 0 から G R E X 5 0 0 に移す ( 最大 5 つのフラスコ ) 。

## 【 2 1 9 8 】

実施例 9 : G R E X 1 0 0 の N I S を使用して、プロセスの開始時に各フラスコから細胞計数サンプルを個別に採取する。細胞計数サンプルを採取したら、G a t h e r e x を使用して細胞懸濁液全体を G R E X 1 0 0 から G R E X 5 0 0 フラスコに移す。

- ・更新されたプロセス Gen 3 : 1 ) 細胞を掻き回すことなく、上清を適切な L a b t a i n e r バッグに移して、c を使用して 1 0 0 M C S の体積を約 5 0 0 m L に減らす。2 ) G a t h e r e x からフラスコを外し、B S C に移す。3 ) B S C 内で、残留物を回転させて均一な懸濁液になるようにフラスコを慎重に混合し、N I P ( 4 × 1 m L ) を使用して細胞計数のサンプルを採取する。4 ) 天秤を使用して G - R e x の重量を量り、記録する。5 ) G a t h e r e x を使用して、細胞懸濁液を最終の G R E X 5 0 0 フラスコに移す。6 ) 回収した使用済み培地で G R E X 1 0 0 フラスコを逆洗し、使用済み培地を G R E X 5 0 0 フラスコに移す。7 ) D M 2 培地を G R E X 5 0 0 に 5 L まで追加する。8 ) 空の G - R e x を秤量し、重量差から移した懸濁液の体積を計算する。

30

## 【 2 1 9 9 】

実施例 9 : サンプルをフラスコ最大 4 個まで得る : フラスコ 1 個 = 1 0 m L

- ・フラスコ 2 個 = 5 m L / フラスコ
- ・フラスコ 3 個 = 3 . 3 m L / フラスコ
- ・フラスコ 4 個 = 2 . 5 m L / フラスコ
- ・更新されたプロセス Gen 3 : サンプルをフラスコ最大 5 個まで得る : フラスコ 1 個 = 1 2 m L
- ・フラスコ 2 個 = 6 m L / フラスコ
- ・フラスコ 3 個 = 4 m L / フラスコ
- ・フラスコ 4 個 = 3 m L / フラスコ
- ・フラスコ 5 個 = 2 . 4 m L / フラスコ

40

## 【 2 2 0 0 】

実施例 9 : 増殖特性評価にはフラスコごとに 5 m L 必要であり、5 本の別個のチューブ

50

に分注。

・更新されたプロセス Gen 3：増殖特性評価にはフラスコごとに 3 mL 必要であり、3 本の別個のチューブに分注。

【 2 2 0 1 】

実施例 9：B a c T 試験に最大 4 個のフラスコ。

・更新されたプロセス Gen 3：B a c T 試験に最大 5 個のフラスコ。

【 2 2 0 2 】

実施例 9：最大 4 個のフラスコに培地添加。

・更新されたプロセス Gen 3：最大 5 個のフラスコに培地添加。

【 2 2 0 3 】

実施例 9：各培地バッグを 4 S 4 M 6 0 マニホールドの脚に溶接。

・更新されたプロセス Gen 3：4 S 4 M 6 0 への代替供給も使用可能。

【 2 2 0 4 】

実施例 9：N / A。

・更新されたプロセス Gen 3：フラスコがインキュベーターに入れられた時点から日付を削除する。処理日はフロントページに記録されているので不要。S M 0 9 0 9 1 9。

【 2 2 0 5 】

実施例 9：余分な細胞についての指示なし。

・更新されたプロセス Gen 3：1) 必要なサンプルを、myco用に  $1 \times 10^6$  細胞、フロー用に  $5 \times 10^6$  細胞、及び再刺激用に  $1 \times 10^6$  細胞に変更する。2) TVC が必要な  $1.6 \times 10^6$  細胞よりも少ない場合は、管理者に連絡する。3) 余分な細胞を凍結する指示を追加し、過剰分について約  $10^6$  細胞/mL の濃度でアリコートを作成できるようにする。TVC を  $10^6$  で割り、使用する CS 10 の体積を得る。バイアルあたりの細胞数が常に  $10^6$  細胞超となるように、最も近い mL に切り捨てる。

【 2 2 0 6 】

実施例 9：フィーダー細胞の調製に EV 3 0 0 0 バッグのみを使用。

・更新されたプロセス Gen 3：フィーダー細胞の調製にチャーターメディカルバッグも使用可能。

【 2 2 0 7 】

実施例 9：最終的な TVC 値を報告するための指示なし。

・更新されたプロセス Gen 3：10 / 11 日目に COA で報告される最終的な TVC 値は、プールされた細胞数サンプルである。

【 2 2 0 8 】

実施例 9： $2 \times 10^9$  個の総生存フィーダー細胞が必要。

・更新されたプロセス Gen 3： $2.5 \times 10^9$  個の総生存フィーダー細胞が必要。

【 2 2 0 9 】

実施例 9：フィーダーセルバッグ # 1 からフィーダーセルバッグ # 2 へ取り出すフィーダーセル数は  $2 \times 10^9$  細胞であった。

・更新されたプロセス Gen 3：フィーダーセルバッグ # 1 からフィーダーセルバッグ # 2 へ取り出すフィーダーセルの数は  $2.5 \times 10^9$  である。

【 2 2 1 0 】

実施例 9：必要な OKT - 3 の量は、 $30 \text{ ng / mL}$  の合計  $1.2 \text{ mL}$  だった。

・更新されたプロセス Gen 3：必要な OKT - 3 の量は、 $30 \text{ ng / mL}$  の合計  $1.5 \text{ mL}$  である。

【 2 2 1 1 】

実施例 9：QS までの総量は  $2.0 \text{ L}$  であった。

・更新されたプロセス Gen 3：QS までの総量は  $2.5 \text{ L}$  である。

【 2 2 1 2 】

実施例 9：最大 GREX 1 0 0 フラスコ 4 個が可能。

・更新されたプロセス Gen 3：最大 GREX 1 0 0 フラスコ 5 個が可能。

10

20

30

40

50

## 【 2 2 1 3 】

実施例 9：増殖特性評価にはフラスコごとに 5 mL 必要であり、5 本の別個のチューブに分注。

・更新されたプロセス Gen 3：増殖特性評価にはフラスコごとに 3 mL 必要であり、3 本の別個のチューブに分注。

## 【 2 2 1 4 】

実施例 9：4 S 4 M 6 9 及び C C 3 には、代替供給物は使用されなかった。

・更新されたプロセス Gen 3：4 S 4 M 6 9 及び C C 3 に、代替供給物が使用可能。

## 【 2 2 1 5 】

実施例 9：ソースバッグとして E V 3 0 0 0 を使用。

・更新されたプロセス Gen 3：細胞懸濁液を大量に収集する場合は、チャーターメディカル E X p a k 5 L バッグをオプションとして追加。

10

## 【 2 2 1 6 】

実施例 9：5 L の L a b t a i n e r を使用済み培地の収集に使用。

・更新されたプロセス Gen 3：4 つ以上のフラスコを回収する場合は、使用済み培地収集用に 1 0 L の l a b t a i n e r バッグをオプションとして追加。

## 【 2 2 1 7 】

実施例 9：最大 4 個のフラスコを採取。

・更新されたプロセス Gen 3：最大 5 個のフラスコを採取。

## 【 2 2 1 8 】

実施例 9：マイコプラズマサンプル用に最大 4 個のフラスコを採取。

・更新されたプロセス Gen 3：マイコプラズマサンプル用に最大 5 個のフラスコを採取

20

## 【 2 2 1 9 】

実施例 9：増殖特性評価にはフラスコごとに 5 mL 必要であり、5 本の別個のチューブに分注。

・更新されたプロセス Gen 3：増殖特性評価にはフラスコごとに 3 mL 必要であり、3 本の別個のチューブに分注。

## 【 2 2 2 0 】

実施例 9：p r e L O V O バッグがインキュベーターに置かれ、インキュベーターから取り出された時間を記録する指示がない。

・更新されたプロセス Gen 3：p r e L O V O バッグがインキュベーターに置かれ、インキュベーターから取り出される時間を記録する。

30

## 【 2 2 2 1 】

実施例 9：L O V O 処理の時間を記録する指示がない。

・更新されたプロセス Gen 3：L O V O の開始と終了の時間を記録する。

## 【 2 2 2 2 】

実施例 9：最終調合をすぐに開始できない場合に p o s t L O V O バッグを配置するための温度に関する指示がない。

・更新されたプロセス Gen 3：L O V O 完了後すぐに最終調合を開始できない場合は、p o s t L O V O バッグを 2 ~ 8 度に保ち、時間が 1 5 分を超えた場合は直ちに I o v a n c e チームに連絡する。

40

## 【 2 2 2 3 】

実施例 9：ウォッシュアウト%（小数点以下 1 桁）を記録した。

・更新されたプロセス Gen 3：ウォッシュアウト%（小数点以下 4 桁）を記録する。

## 【 2 2 2 4 】

実施例 9：保持された Q C サンプルを最終 D P バッグから個別に採取し、5 0 m L 標準チューブにプールした。

・更新されたプロセス Gen 3：リテイン Q C サンプルは、各 D P バッグに必要な量が充填された直後に製剤バッグ（p o s t - L O V O バッグ）から採取される。適切なサイズ

50

のシリンジで R e t a i n 量を採取し、50 mL コニカルチューブに移す。

【2225】

実施例 9 : 1 : 10 希釈液を、500 uL のサンプルと 4500 uL の A I M - V を使用して調製した。

・更新されたプロセス G e n 3 : 500 uL サンプルと 4500 uL の A I M - V の仕様を削除。

【2226】

実施例 11 : 第 2 世代プロセス G E N 3

フィーダー細胞スープを使用して T I L - G E N 3 を活性化するための提案された研究 - 第 1 フェーズ及び第 2 フェーズ。

この実施例は、別個の容器内でフィーダー培養物を培養し、次いでフィーダー培養物の培地（細胞培養上清）を使用して T I L を活性化するプロセスを試験する実施形態を提供する。

【2227】

この方法は、セルコレクションでフィーダーバックグラウンドなしで、スケールアップの日と採取時に T I L 生産のより決定的な測定を可能にする。このような方法は、本明細書に記載されており、例えば図 1 E ~ 1 G に示されている。

【2228】

この方法では、ロットが採取に成功するかどうかを事前に見積もることもできる。最終的な細胞数は、フィーダーバックグラウンドなしで T I L からのみになる。

【2229】

この方法により、スケールアップの日に生存率が向上する可能性があり、リンパ球枯渇のスケジュールを立てるリスクが軽減される可能性がある。

【2230】

全体として、プロセスのこの実施形態は、フィーダーバックグラウンドが低減されるか、まったくない。

G e n 3 R E P 図

【2231】

図 2 1 は、第 2 世代 G e n 3 プロセスの実施形態を示している。

【2232】

図 1 E ~ 1 G は、第 2 世代の G e n 3 プロセスのフローチャートの概要を示している。

【2233】

実施例 12 : 凍結保存 T I L 細胞療法の例示的産出

この例では、現在の適正組織慣行及び現在の適正製造基準に従う、G - R e x フラスコでの T I L 細胞療法プロセスの例示的な c G M P 製造について説明する。

10

20

30

40

50

## 【表 5 4】

表 5 4. プロセス拡大の例示的な計画

推定日(播種後)	活性	対象基準	想定される容器	推定合計容量(mL)
0	腫瘍解剖	G-Rex100MCS あたり ≤50 の望ましい腫瘍断片	G-Rex100MCS フラスコ 1 個	≤1000
11	REP 播種	G-Rex500MCS あたり 5~200×10 <sup>6</sup> 個の生細胞	G-Rex500MCS フラスコ 1 個	≤5000
16	REP 分割	G-Rex500MCS あたり 1×10 <sup>9</sup> 生細胞	G-Rex500MCS フラスコ 5 個以下	≤25000
22	採取	利用可能なセルの合計	CS-750 バッグ 3~4 個	≤530

10

20

## 【表 5 5】

表 5 5. フラスコ容量

フラスコタイプ	作業容量/フラスコ (mL)
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

30

## 【 2 2 3 4 】

## 主要プロセス情報

## 0 日目 C M 1 培地の準備

B S C 内で、試薬を R P M I 1 6 4 0 培地ボトルに加えた。次の試薬 t をボトルごとに加えた：熱不活化ヒト A B 血清 ( 1 0 0 . 0 m L ) ; G l u t a M a x ( 1 0 . 0 m L ) ; 硫酸ゲンタマイシン、5 0 m g / m L ( 1 . 0 m L ) ; 2 - メルカプトエタノール ( 1 . 0 m L ) 。 B S C から不要な材料を除去した。B S C から培地試薬を渡し、配合洗浄培地の調製のために B S C にゲンタマイシン硫酸塩及び H B S S を残した。I L - 2 アリコートを解凍した。1 . 1 m L の I L - 2 アリコート ( 6 × 1 0 <sup>6</sup> I U / m L ) ( B R 7 1 4 2 4 ) 1 つをすべての氷が溶けるまで解凍した。

40

## 【 2 2 3 5 】

I L - 2 ストック溶液を培地に移した。B S C で、1 . 0 m L の I L - 2 ストック溶液を用意した C M 1 0 日目培地ボトルに移した。C M 1 0 日目培地ボトル 1 本及び I L - 2 ( 6 × 1 0 <sup>6</sup> I U / m L ) 1 . 0 m L を加えた。G - R e x 1 0 0 M C S を B S C に渡した。G - R e x 1 0 0 M C S ( W 3 0 1 3 1 3 0 ) を無菌で B S C に渡した。すべての完全な C M 1 0 日目培地を G - R e x 1 0 0 M C S フラスコにポンプで送った。組織片コニカルまたは G R e x 1 0 0 M C S 。

## 【 2 2 3 6 】

## 0 日目 腫瘍洗浄培地の調製

50

B S C 内で、5.0 mL ゲンタマイシン ( W 3 0 0 9 8 3 2 または W 3 0 1 2 7 3 5 ) を 1 × 5 0 0 mL H B S S 培地 ( W 3 0 1 3 1 2 8 ) ボトルに添加した。ボトルごとに以下を加えた：H B S S ( 5 0 0 . 0 mL ) ; 硫酸ゲンタマイシン、5 0 mg / mL ( 5 . 0 mL ) 。 1 L 0 . 2 2 ミクロンフィルターユニット ( W 1 2 1 8 8 1 0 ) を介して、調製されたゲンタマイシンを含有する H B S S を濾過した。

【 2 2 3 7 】

0 日目 腫瘍処理

腫瘍を得た。Q A R から腫瘍サンプルを入手し、処理のために 2 ~ 8 のスイートにすぐに移した。腫瘍洗浄培地を分配した。腫瘍洗浄 1、8 インチのピンセット ( W 3 0 0 9 7 7 1 ) を使用した腫瘍を検体ボトルから取り出し、準備した「洗浄 1」ディッシュに移した。続いて、腫瘍洗浄 2 及び腫瘍洗浄 3 を行った。

10

【 2 2 3 8 】

腫瘍を測定した。腫瘍を評価した。全腫瘍領域の > 3 0 % が壊死性及び / または脂肪組織であるかどうかを観察した。該当する場合：解剖をクリーンアップする。腫瘍が大きく、組織の外側の > 3 0 % が壊死性 / 脂肪組織であることが観察された場合、壊死性 / 脂肪組織をメス及び / または鉗子の組み合わせを使用して腫瘍の内部構造を維持しながら除去することにより「クリーンアップ解剖」を実施した。

【 2 2 3 9 】

腫瘍を解剖する。メス及び / または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍材料を適切なサイズの断片 ( 最大 6 個の中間断片 ) に切り分けた。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を約 3 × 3 × 3 mm の大きさの小片に解剖した。乾燥を防ぐための中間断片を保存した。

20

【 2 2 4 0 】

中間断片の解剖を繰り返した。所定の数の断片を収集した。望ましい組織が残っている場合は、「有利な中間断片」6 ウェルプレートから追加の有利な腫瘍片を選択して、最大 5 0 個のドロップを満たす。

【 2 2 4 1 】

コニカルチューブを調製した。腫瘍片を 5 0 mL コニカルチューブに移した。G - R E X 1 0 0 M C S 用に B S C を調製した。インキュベーターから G - R E X 1 0 0 M C S を取り出した。G - R e x 1 0 0 M C S フラスコを無菌的に B S C に入れた。G - R e x 1 0 0 M C S フラスコに腫瘍断片を追加した。均等に断片を分散した。

30

【 2 2 4 2 】

G - R e x 1 0 0 M C S を次のパラメータでインキュベートした：G - R e x フラスコをインキュベート：温度 L E D ディスプレイ：3 7 . 0 ± 2 . 0 ; C O 2 率：5 . 0 ± 1 . 5 % C O 2 。計算：インキュベーション時間；下限 = インキュベーション時間 + 2 5 2 時間；上限 = インキュベーション時間 + 2 7 6 時間。

【 2 2 4 3 】

1 1 日目 - 培地の調製

インキュベーターを監視した。インキュベーターを監視した。インキュベーターのパラメータ：温度 L E D ディスプレイ：3 7 . 0 ± 2 . 0 ; C O 2 率：5 . 0 ± 1 . 5 % C O 2 。3 × 1 0 0 0 mL R P M I 1 6 4 0 培地 ( W 3 0 1 3 1 1 2 ) ボトル及び 3 × 1 0 0 0 mL A I M - V ( W 3 0 0 9 5 0 1 ) ボトルをインキュベーターで 3 0 分加熱した。インキュベーターから R P M I 1 6 4 0 培地を取り出した。R P M I 1 6 4 0 培地を調製した。培地を濾過する。I L - 2 ( 6 × 1 0 6 I U / mL ) ( B R 7 1 4 2 4 ) の 3 × 1 . 1 mL アリコートを解凍した。インキュベーターから A I M - V 培地を取り出した。A I M - V に I L - 2 を加えた。1 0 L の L a b t a i n e r バッグ及びリピーターポンプトランスファーセットを無菌的に B S C に移した。1 0 L の L a b t a i n e r 培地バッグを調製した。B a x a ポンプを用意した。1 0 L の L a b t a i n e r 培地バッグを調製した。培地を 1 0 L の L a b t a i n e r にポンプで送った。L a b t a i n e r バッグからポンプマチックを取り外した。

40

【 2 2 4 4 】

50

培地を混合した。バッグを穏やかに揉んで混合した。サンプル計画に従って培地をサンプリングする。20.0 mLの培地を取り除き、50 mLコニカルチューブに入れた。細胞数希釈チューブを調製した。BSC内で「細胞数希釈用」及びロット番号がラベル付けされたAIM-V培地4.5 mLを4つの15 mLコニカルチューブに添加した。試薬をBSCから2~8に移した。1 Lのトランスファーパックを調製した。BSC外で、(調整した「完全CM2 11日目培地」)バッグに付属のトランスファーセットに1 Lトランスファーパックを溶接した。フィーダーセルトランスファーパックを調製した。完全なCM2 11日目培地をインキュベートした。

#### 【2245】

##### 11日目-TIL採取

前処理テーブル。インキュベーターのパラメータ：温度LEDディスプレイ：37.0 ± 2.0 ; CO<sub>2</sub>率：5.0 ± 1.5 % CO<sub>2</sub>。インキュベーターからG-REX100 MCSを取り出した。300 mLのトランスファーパックを調製した。トランスファーパックをG-Rex100 MCSに溶接した。TIL採取及びTIL採取の開始(nitiation)用にフラスコを調製した。TIL採取した。Gatherexを使用して、細胞懸濁液を血液フィルターを通して300 mLのトランスファーパックに移した。接着細胞の膜を調査した。フラスコ膜をすすいだ。G-Rex100 MCSのクランプを閉めた。すべてのクランプが閉じていることを確認する。TIL及び「上澄み」トランスファーパックをヒートシールした。TIL懸濁液の量を計算した。サンプリング用に上澄みトランスファーパックを調製した。Bac-Tサンプルを取り出した。BSC内で、1 Lの「上清」トランスファーパックからおよそ20.0 mLの上清を吸い上げ、滅菌済みの50 mLコニカルチューブに分注した。サンプルプランごとにBacTを接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製した50 mLのBacTとラベルの付いたコニカルから1.0 mLのサンプルを取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

#### 【2246】

TILをインキュベートした。必要になるまで、TILトランスファーパックをインキュベーターに入れた。細胞計数と計算を実行した。実施した細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率 ÷ 2。生存細胞濃度 ÷ 2。上限及び下限の数を決定した。下限：平均生細胞濃度 × 0.9。上限：平均生細胞濃度 × 1.1。両方の数が許容範囲内であることを確認した。実施した4回の計数すべてから平均生細胞濃度を決定した。

#### 【2247】

TIL懸濁液の調整量は、細胞計数サンプルを除去した後のTIL懸濁液の調整量を計算した。総TILセル量(A)。除去された細胞計数サンプルの量(4.0 mL)(B)調整された総TIL細胞量  $C = A - B$ 。

#### 【2248】

計算された総生存TILセル。平均生細胞濃度\*：全体積；総生細胞数： $C = A \times B$ 。フローサイトメトリーの計算：総生存TIL細胞数が  $4.0 \times 10^7$  以上の場合、フローサイトメトリーサンプルの  $1.0 \times 10^7$  細胞を得るための体積を計算した。フローサイトメトリーに必要な総生細胞数： $1.0 \times 10^7$  細胞。フローサイトメトリーに必要な細胞量：生細胞濃度を  $1.0 \times 10^7$  細胞Aで割った値。  $2.0 \times 10^8$  生細胞に等しいTIL懸濁液の量を計算。必要に応じて、除去するTIL細胞の過剰量を計算して、余分なTILを除去し、必要に応じてTILをインキュベーターに入れた。必要に応じて、計算された合計過剰TILを除去した。凍結のための標的細胞濃度で過剰なTIL細胞に追加するCS-10培地の計算量は  $1.0 \times 10^8$  細胞/mLである。必要に応じて、余分なTILを遠心分離した。コニカルチューブを観察し、CS-10を添加した。バイアルを充填した。1.0 mLの細胞懸濁液を適切なサイズのクライオバイアルに分注した。SOP-00242に従って、適切なサイズのクライオバイアルに残りの量を分注した。容量が0.5 mLの場合、容量が0.5 mLになるまでCS10をバイアルに追加する。

#### 【2249】

サンプルのTIL凍結保存

10

20

30

40

50

凍結保存用に  $1 \times 10^7$  個の細胞を得るために必要な細胞の量を計算した。凍結保存のためにサンプルを除去した。T I L をインキュベーターに入れた。

【 2 2 5 0 】

サンプルの凍結保存

コニカルチューブを観察し、C S - 1 0 をゆっくりと添加し、添加した 0 . 5 m L の C S 1 0 の量を記録した。

【 2 2 5 1 】

1 1 日目 - フィーダー細胞

フィーダー細胞を得た。L N 2 フリーザーから少なくとも 2 つの異なるロット番号を持つフィーダー細胞のバッグ 3 つを得た。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴またはクライオサームを準備した。フィーダー細胞を  $37.0 \pm 2.0$

10

の水浴またはクライオサームで、約 3 ~ 5 分または氷がちょうど消えるまで解凍した。培地をインキュベーターから取り出した。解凍フィーダー細胞プールした。フィーダー細胞をトランスファーパックに追加した。フィーダー細胞をシリンジからトランスファーパックに分注した。プールされたフィーダー細胞とラベルの付いたトランスファーパックを混合した。トランスファーパック内のフィーダー細胞懸濁液の総量を計算した。

【 2 2 5 2 】

細胞計数サンプルを除去した。各サンプルに個別の 3 m L シリンジを使用して、ニードルレス注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液トランスファーパックから  $4 \times 1.0$  m L の細胞計数サンプルを取り出した。ラベルの付いたクライオバイアルに各サンプルを分配した。細胞計数と増倍率の決定選択プロトコルを実施し、増倍率を入力した。実施した細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限と下限を決定し、制限内であることを確認する。

20

【 2 2 5 3 】

フィーダー細胞懸濁液の量を調整した。細胞計数サンプルを除去した後のフィーダー細胞懸濁液の調整量を計算した。総生存フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を得た。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。4 番目のフィーダーセルバッグをジップトップバッグに入れ、 $37.0 \pm 2.0$  の水浴またはクライオサームで約 3 ~ 5 分解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した ( B )。フィーダー細胞の新しい総量を計算した。フィーダー細胞をトランスファーパックに添加した。

30

【 2 2 5 4 】

必要に応じて希釈液を調製し、4 . 5 m L の A I M - V 培地を 4 本の 1 5 m L コニカルチューブに添加した。細胞計数を準備した。各サンプルに個別の 3 m L シリンジを使用して、ニードルレス注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液トランスファーパックから  $4 \times 1.0$  m L の細胞カウントサンプルを取り出した。細胞計数と計算を実行した。実施した 4 回の計数すべてから平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液を調製し、セルカウントサンプルを取り出した後の調製したフィーダー細胞懸濁液を計算した。総フィーダー細胞量から 4 . 0 m L を差し引いたものを取り出した。 $5 \times 10^9$  個の生存フィーダー細胞を得るために必要なフィーダー細胞懸濁液の量を計算した。過剰フィーダー細胞体積を計算した。除去する余分なフィーダー細胞の体積を計算した。余分なフィーダー細胞を除去した。1 . 0 m L シリンジと 1 6 G ニードルを使用して、0 . 1 5 m L の O K T 3 を吸引し、O K T 3 を添加した。フィーダー細胞懸濁液トランスファーパックをヒートシールした。

40

【 2 2 5 5 】

1 1 日目 G - R e x 充填及び播種

G - R e x 5 0 0 M C S をセットアップした。インキュベーターから「完全 C M 2 1 1 日目培地」を取り出し、培地を G - R e x 5 0 0 M C S に送り込んだ。4 . 5 L の培地を G - R e x 5 0 0 M C S にポンプで注入し、フラスコに印を付けたラインまで満たした。必要に応じてフラスコをヒートシールし、インキュベートした。フィーダー細胞懸濁液

50

トランスファーパックを G - R e x 5 0 0 M C S に溶接した。G - R e x 5 0 0 M C S にフィーダーセルを添加した。ヒートシールした。T I L サスペンショントランスファーパックをフラスコに溶接した。G - R e x 5 0 0 M C S に T I L を追加した。ヒートシールし、G - R e x 5 0 0 M C S を  $37.0 \pm 2.0$  でインキュベートした、CO<sub>2</sub>率：  $5.0 \pm 1.5\%$  CO<sub>2</sub>。

【2256】

インキュベーションウィンドウを計算した。16日目にインキュベーターから G - R e x 5 0 0 M C S を取り出す適切な時間を決定するために計算を実施した。下限：インキュベーション時間 + 108時間。上限：インキュベーション時間 + 132時間。

【2257】

11日目 過剰 T I L 凍結保存

適用：凍結した過剰な T I L バイアル。凍結する前に C R F が設定されていることを確認した。凍結保存を実施する。バイアルを速度制御冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結が完了したら、バイアルを C R F から適切な保存容器に移す。バイアルを適切な保管場所に移した。L N 2 の保管場所を記録した。

【2258】

16日目 培地の調製

A I M - V 培地を予熱した。培地バッグ1、2、及び3の培地が加温された時間を計算した。すべてのバッグが12~24時間加温されていることを確認した。上清用に10Lの L a b t a i n e r をセットアップした。ルアーコネクタを使用して、液体ポンプトランスファーセットの大径端を10Lの L a b t a i n e r バッグのメスポートの1つに取り付けた。上清とラベル用に10Lの L a b t a i n e r をセットアップした。上清用に10L L a b t a i n e r をセットアップした。B S C から取り外す前に、すべてのクランプが閉じていることを確認した。注：T I L 採取中に上清バッグを使用し、これは、培地の調製と同時に実施され得る。

【2259】

I L - 2 を解凍した。C T S A I M V 培地1袋あたり I L - 2 (  $6 \times 10^6$  I U / m L ) ( B R 7 1 4 2 4 ) の  $5 \times 1.1$  mL アリコートをしてすべての氷が溶けるまで解凍した。100.0 mL の G l u t a M a x を分注した。G l u t a M a x に I L - 2 を添加した。配合用に C T S A I M V 培地バッグを調製した。配合用に C T S A I M V 培地バッグを調製した。B a x a ポンプを実施する。培地を作成する準備をした。G l u t a M a x + I L - 2 をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度 L E D ディスプレイ：  $37.0 \pm 2.0$  ; CO<sub>2</sub>率：  $5.0 \pm 1.5\%$  CO<sub>2</sub>。完全な C M 4 16日目の培地を加温した。希釈物を調製した。

【2260】

16日目 R E P 分割

パラメータを監視した：温度 L E D ディスプレイ：  $37.0 \pm 2.0$  ; CO<sub>2</sub>率：  $5.0 \pm 1.5\%$  CO<sub>2</sub>。インキュベーターから G - R e x 5 0 0 M C S を取り出した。T I L 懸濁液として1Lトランスファーパックを調製し、ラベルを付け、1Lを秤量した。G - R e x 5 0 0 M C S の減容。約4.5Lの培養上清を G - R e x 5 0 0 M C S から10Lに移した。T I L 採取用にフラスコを調製した。上澄みを除去した後、すべてのクランプを赤い線まで閉じた。T I L 採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を回転させて細胞を解放し、すべての細胞が分離していることを確認した。

【2261】

T I L 収集。T I L サスペンショントランスファーパックにつながるすべてのクランプをリリースした。G a t h e R e x を使用して、細胞懸濁液を T I L サスペンショントランスファーパックに移した。注：すべてのセルと培地が収集されるまで、傾斜したエッジを維持すること。接着細胞の膜を調査した。フラスコ膜をすすいだ。G - R e x 5 0 0 M C S のクランプを閉めた。T I L を含むトランスファーパックをヒートシールした。上澄みを含む10L L a b t a i n e r をヒートシールした。細胞懸濁液を含むトランスフ

10

20

30

40

50

アーパックの重量を記録し、懸濁液の容量を計算した。サンプル取り出し用のトランスファーパックを調製した。細胞上清から試験サンプルを取り出した。

【 2 2 6 2 】

無菌性 & B a c T テストサンプリング：調製した 1 5 m L のコニカル標識 B a c T から 1 . 0 m L のサンプルを取り出した。細胞計数サンプルを取り出した。B S C 内で、各サンプルに別々の 3 m L シリンジを使用して、「T I L 懸濁液」トランスファーパックから 4 × 1 . 0 m L の細胞カウントサンプルを取り出した。マイコプラズマのサンプルを取り出した。3 m L シリンジを使用して、T I L 懸濁液トランスファーパックから 1 . 0 m L を取り出し、調製した「マイコプラズマ希釈液」のラベルの付いた 1 5 m L のコニカルに入れた。

10

【 2 2 6 3 】

播種用のトランスファーパックを調製した。T I L をインキュベーターに配置した。B S C から細胞懸濁液を取り出し、必要になるまでインキュベーターに入れた。細胞計数と計算を実行した。最初に細胞懸濁液 0 . 5 m L を調製した A I M - V 培地 4 . 5 m L に加えることにより、1 : 1 0 希釈にし、細胞計数サンプルを希釈した。実施した細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限と下限を決定した。注：希釈は、予想される細胞濃度に基づいて調整することができる。実施した 4 回の計数すべてから平均生細胞濃度を決定した。T I L 懸濁液の量を調整した。細胞計数サンプルを除去した後の T I L 懸濁液の調整量を計算した。総 T I L 細胞量から 5 . 0 m L を差し引いたものを試験用に取り出した。

20

【 2 2 6 4 】

総生存 T I L セルを計算した。シードするフラスコの総数を計算した。注：シードする G - R e x 5 0 0 M C S フラスコの最大数は 5 であった。播種するフラスコの計算数が 5 を超えた場合、利用可能な細胞懸濁液の全量を使用して 5 つだけが播種された。

【 2 2 6 5 】

継代培養のためのフラスコの数を計算する。調製したバッグに加えて、必要な培地バッグの数を計算した。計算どおりに必要な G - R e x - 5 0 0 M フラスコ 2 つごとに、「C M 4 1 6 日目培地」の 1 0 L バッグを 1 つ調整した。追加の培地を調製し、加温しながら、第 1 の G R E X - 5 0 0 M フラスコ（複数可）の播種を進めた。決定された追加の培地バッグの計算された数を調製し、加温した。G - R e x 5 0 0 M C S を充填した。培地をポンピングする準備をし、4 . 5 L の培地を G - R e x 5 0 0 M C S にポンピングした。ヒートシールした。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しい G - R e x 5 0 0 M C S フラスコに追加する T I L 懸濁液の目標量を計算した。計算されたフラスコ数が 5 つを超える場合、細胞懸濁液の全量を使用して、5 つのみに播種した。播種用にフラスコを調製した。インキュベーターから G - R e x 5 0 0 M C S を取り外した。ポンピング用に G - R e x 5 0 0 M C S を調製した。大きなフィルターラインを除いて、すべてのクランプを閉じた。インキュベーターから T I L を取り外した。播種用の細胞懸濁液を調製した。「T I L 懸濁液」トランスファーパックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。T I L サスペンションバッグをはかりに乗せた。

30

【 2 2 6 6 】

フラスコを T I L 懸濁液で播種した。計算された T I L 懸濁液の量をフラスコにポンプする。ヒートシールした。残りのフラスコを充填した。インキュベーターを監視した。インキュベーターのパラメータ：温度 L E D ディスプレイ：3 7 . 0 ± 2 . 0 ; C O 2 率：5 . 0 ± 1 . 5 % C O 2 。フラスコをインキュベートした。2 2 日目にインキュベーターから G - R e x 5 0 0 M C S を取り除く時間範囲を決定した。

40

【 2 2 6 7 】

2 2 日目 洗浄バッファの調製

1 0 L の L a b t a i n e r 培地バッグを調製した。B S C 内で、ルアー接続を介して 4 インチのプラズマトランスファーセットを 1 0 L の L a b t a i n e r バッグに取り付けた。1 0 L の L a b t a i n e r 培地バッグを調製した。B S C の外に移動させる前に

50

、すべてのクランプを閉じた。注：採取する G - R e x 5 0 0 M C S フラスコ 2 つごとに 1 0 L の L a b t a i n e r バッグを 1 つ用意した。P l a s m a l y t e を 3 0 0 0 m L バッグに送り込み、ポンプを逆にしてバッグの位置を操作することにより、3 0 0 0 m L O r i g e n バッグから空気を除去した。3 0 0 0 m L バッグにヒトアルブミン 2 5 % を添加した。1 2 0 . 0 m L のヒトアルブミン 2 5 % を最終的な量として得る。

【 2 2 6 8 】

I L - 2 希釈液を調製した。1 0 m L のシリンジを使用して、L O V O 洗浄バッファバッグのニードルレス注入ポートを使用して、5 . 0 m L の L O V O 洗浄バッファを取り出した。L O V O 洗浄バッファを 5 0 m L コニカルチューブに分注した。C R F プランクバッグ L O V O ウォッシュバッファを分注した。1 0 0 m L シリンジを使用して、ニードルレス注入ポートから 7 0 . 0 m L の L O V O 洗浄バッファを吸い上げた。1 . 1 m L の I L - 2 (  $6 \times 10^6$  I U / m L ) 1 つをすべての氷が溶けるまで解凍した。I L - 2 を調製した。5 0  $\mu$  L の I L - 2 ストック (  $6 \times 10^6$  I U / m L ) を「I L - 2 希釈液」のラベルの付いた 5 0 m L コニカルチューブに添加した。凍結保存準備。最終産物の凍結保存のためにプレコンディショニングするために、5 つの凍結カセットを 2 ~ 8 に置いた。

10

【 2 2 6 9 】

細胞計数希釈液を調製した。B S C 内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」のラベルが付いた 4 . 5 m L の A I M - V 培地を 4 つの別々の 1 5 m L コニカルチューブに添加した。細胞計数を準備した。4 つのクライオバイアルにバイアル番号 ( 1 ~ 4 ) のラベルを付けた。バイアルを使用する B S C 下で保管した。

20

【 2 2 7 0 】

2 2 日目 T I L 採取

インキュベーターを監視した。インキュベーターのパラメータ温度 L E D ディスプレイ :  $37 \pm 2 . 0$  、C O 2 率 :  $5 \% \pm 1 . 5$  % 。インキュベーターから G - R e x 5 0 0 M C S フラスコを取り出した。T I L コレクションバッグを調製し、ラベルを付けた。余分な接続を封印した。減容 : 約 4 . 5 L の G - R e x 5 0 0 M C S からの上清を上清バッグへ移した。

【 2 2 7 1 】

T I L 採取用のフラスコを調製した。T I L の収集を開始した。フラスコを激しくたたき培地を回転させ細胞を解放した。すべての細胞が分離していることを確認した。T I L の収集を開始した。T I L サスペンションコレクションバッグにつながるすべてのクランプを解放した。T I L 採取。G a t h e R e x を使用して、T I L 懸濁液を 3 0 0 0 m L コレクションバッグに移した。接着細胞について膜を調査した。フラスコ膜をすすいだ。G - R e x 5 0 0 M C S のクランプを閉じ、すべてのクランプが閉じていることを確認した。細胞懸濁液を L O V O ソースバッグに移した。すべてのクランプを閉じた。ヒートシールした。4  $\times$  1 . 0 m L の細胞計数サンプルを取り出した。

30

【 2 2 7 2 】

細胞計数を実施した。N C - 2 0 0 及びプロセスノート 5 . 1 4 を利用して、細胞計数と計算を実施した。最初に細胞懸濁液 0 . 5 m L を調製した A I M - V 培地 4 . 5 m L に加えることにより、細胞計数サンプルを希釈した。これで 1 : 1 0 希釈を得た。実施した細胞計数の平均生存率、生存細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限と下限を決定した。実施した細胞計数の平均生存率、生存細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。L O V O ソースバッグを計量した。総生存 T I L 細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

40

【 2 2 7 3 】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアーサンプルポートを介して 1 つの上清バッグから 1 0 . 0 m L を取り出し、1 5 m L コニカルに入れた。

【 2 2 7 4 】

L O V O

50

「T I L G - R e x 採取」プロトコルを実施し、最終産物の目標量を決定した。使い捨てキットを搭載した。濾液バッグを取り外した。濾過容量を入力した。ベンチトップに液容器を配置した。P l a s m a L y t e を取り付けた。P l a s m a L y t e が取り付けられていることを確認し、P l a s m a L y t e が動いていることを確認した。ソース容器をチューブに取り付け、ソースコンテナが取り付けられていることを確認した。P l a s m a L y t e が動いていることを確認した。

【 2 2 7 5 】

最終調合と充填

目標量 / バッグ計算。ブランクバッグを調合するための C S - 1 0 及び L O V O 洗浄バッファの量を計算した。C R F ブランクを調製した。

10

【 2 2 7 6 】

最終産物に追加する I L - 2 の量を計算した。所望の最終 I L - 2 濃度 ( I U / m L ) - 3 0 0 I U / m L 。 I L - 2 ワーキングストック :  $6 \times 10^4$  I U / m L 。接続装置を組み立てた。4 S - 4 M 6 0 を C C 2 細胞接続に滅菌溶接した。C S 7 5 0 C r y o b a g s を準備したハーネスに滅菌溶接した ( プロセスノート 5 . 1 1 に従って ) 。 C S - 1 0 バッグを 4 S - 4 M 6 0 のスパイクに溶接した。I L - 2 で T I L を調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「 I L - 2  $6 \times 10^4$  」アリコートから決定された I L - 2 の量を取り出した。調合 T I L バッグにラベルを付けた。調合 T I L バッグを装置に添加した。C S 1 0 を添加した。シリンジを切り替えた。約 1 0 m L の空気を 1 0 0 m L シリンジに吸い上げ、装置の 6 0 m L シリンジを交換した。C S 1 0 を添加した。C S - 7 5 0 バッグを調製した。細胞を分注した。

20

【 2 2 7 7 】

最終産物バッグから空気を除去し、R e t a i n を得た。最後の最終産物バッグがいっぱいになったら、すべてのクランプを閉じた。約 1 0 m L の空気を新しい 1 0 0 m L シリンジに吸い上げ、装置上のシリンジを交換した。R e t a i n を 5 0 m L のコニカルチューブに分注し、チューブに「 R e t a i n 」及びロット番号のラベルを付けた。各バッグの空気除去手順を繰り返す。

【 2 2 7 8 】

目視検査を含め、凍結保存用の最終産物を調製した。凍結保存まで、冷凍バッグをコールドバックまたは 2 ~ 8 で保持した。

30

【 2 2 7 9 】

細胞計数サンプルを取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、2 . 0 m L の R e t a i n を取り出し、細胞計数に使用する 1 5 m L コニカルチューブに入れた。細胞計数と計算を実行した。注 : 希釈が十分であることを確認するために、1 つのサンプルのみを適切な希釈に希釈した。適切な希釈係数に追加のサンプルを希釈し、計数を続行した。実施した細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限と下限を決定した。注 : 希釈は、予想される細胞濃度に基づいて調整することができる。生細胞濃度と生存率の平均値を決定した。計数の上限と下限を決定した。I F N - を計算した。最終産物バッグをヒートシールした。

【 2 2 8 0 】

40

以下の例示的なサンプルプランに従ってサンプルをラベル付け及び収集した。

## 【表 5 6】

表 5 6 : サンプルプラン

サンプル	容器の数	それぞれに追加するサンプル量	容器タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0mL	15mL コニカル
エンドトキシン	2	1.0mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
IFN-g	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
フロー サイメトリ	1	1.0mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌	2	1.0mL	Bac-T ボトル
QC Retain	4	1.0mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5mL	2mL クライオバイアル

10

20

## 【 2 2 8 1】

無菌性 & B a c T。サンプリングのテスト。B S C 内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から 1 . 0 m L のサンプルを取り出し、嫌気性ボトルに接種した。好気性ボトルについて上記を繰り返した。

## 【 2 2 8 2】

最終産物の凍結保存

速度制御冷凍庫を準備した。C R F が設定されていることを確認した。C R F プローブをセットアップした。最終産物とサンプルを C R F に入れた。4 ± 1 . 5 に達するのに必要な時間を決定し、C R F 実行に進んだ。C R F が完了し、保管した。実行の完了後に C R F を停止した。C R F からカセットとバイアルを取り出した。保管のために、カセットとバイアルを気相 L N 2 に移した。

30

後処理の概要

後処理：最終製剤

## 【 2 2 8 3】

( 2 2 日目 ) フローサイトメトリーによる 2 2 日目の R E P での C D 3 + 細胞の決定。

## 【 2 2 8 4】

( 2 2 日目 ) グラム染色法 ( G M P ) 。

40

## 【 2 2 8 5】

( 2 2 日目 ) ゲルクロット L A L アッセイ ( G M P ) による細菌エンドトキシン試験。

## 【 2 2 8 6】

( 1 6 日目 ) B a c T 無菌アッセイ ( G M P ) 。

## 【 2 2 8 7】

( 1 6 日目 ) T D - P C R ( G M P ) によるマイコプラズマ D N A 検出。

## 【 2 2 8 8】

許容される外観属性。

## 【 2 2 8 9】

50

( 2 2 日 目 ) B a c T 無 菌 ア ッ セ イ ( G M P ) ( 2 2 日 目 ) 。

【 2 2 9 0 】

( 2 2 日 目 ) I F N - ガ ン マ ア ッ セ イ 。

【 2 2 9 1 】

上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明と見なすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。

10

【 2 2 9 2 】

すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。

【 2 2 9 3 】

本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

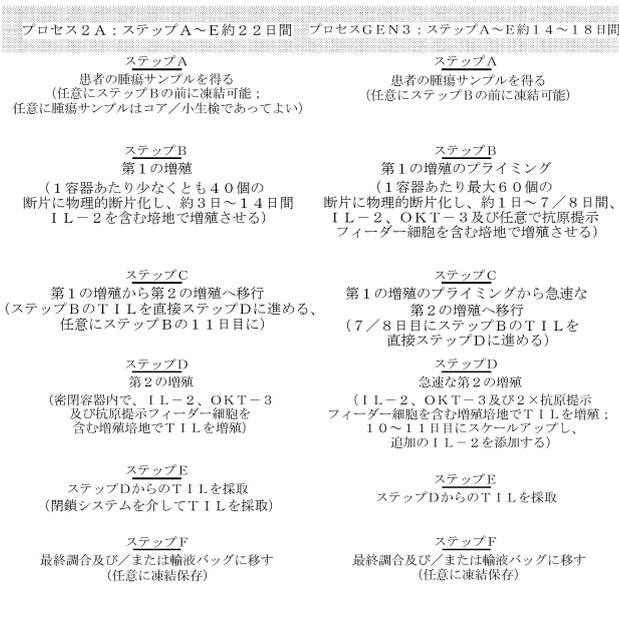
20

【 2 2 9 4 】

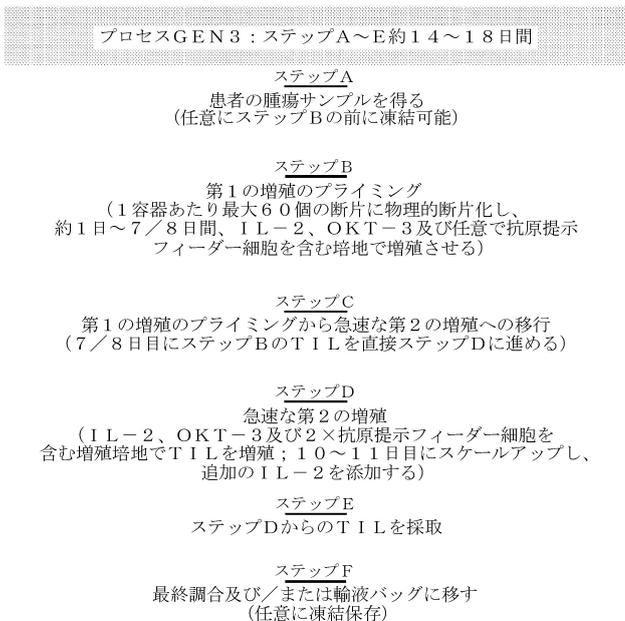
本出願の多くの変更及び類型は、当業者には明らかなように、その趣旨及び範囲から逸脱することなく行われ得る。本明細書に記載の特定の実施形態及び例は、例示としてのみ提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を有する均等物の完全な範囲も併せて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるものである。

【 図 面 】

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



30

40

50

【 図 1 C 】

実施形態 GEN3. 0 : ステップA～E約14～18日間	実施形態 GEN3. 1 対照 : ステップA～E 約14～18日間	実施形態 GEN3. 1 試験/F : ステップA～E 約14～18日間
<b>ステップA</b> 患者の腫瘍サンプルを得る (任意にステップBの前に凍結可能)	<b>ステップA</b> 患者の腫瘍サンプルを得る (任意にステップBの 前に凍結可能)	<b>ステップA</b> 患者の腫瘍サンプルを得る (任意にステップBの 前に凍結可能)
<b>ステップB</b> 第1の増殖のプライミング (1容器あたり最大60個の 断片に物理的断片化し、 約1日～7/8日間、IL-2 含む培地で増殖させる)	<b>ステップB</b> 第1の増殖のプライミング (1容器あたり最大60個の 断片に物理的断片化し、 約1日～7/8日間、 IL-2、及びOKT-3を 含む培地で増殖させる)	<b>ステップB</b> 第1の増殖のプライミング (1容器あたり最大60個の 断片に物理的断片化し、 約1日～7/8日間、 IL-2、OKT-3及び 抗原提示フィーダー細胞を 含む培地で増殖させる)
<b>ステップC</b> 第1の増殖のプライミングから 急速な第2の増殖への移行 (7/8日目にステップBの TILを直接ステップDに進める)	<b>ステップC</b> 第1の増殖のプライミングから 急速な第2の増殖への移行 (7/8日目にステップBの TILを直接ステップD に進める)	<b>ステップC</b> 第1の増殖のプライミングから 急速な第2の増殖への移行 (7/8日目にステップBの TILを直接ステップD に進める)
<b>ステップD</b> 急速な第2の増殖 (IL-2、OKT-3及び 抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地でTILを増殖； 10～11日目にスケールアップし、 追加のIL-2を添加する)	<b>ステップD</b> 急速な第2の増殖 (IL-2、OKT-3及び 2×抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地でTILを増殖； 10～11日目にスケールアップし、 追加のIL-2を添加する)	<b>ステップD</b> 急速な第2の増殖 (IL-2、OKT-3及び 2×抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地でTILを増殖； 10～11日 にスケールアップし、 追加のIL-2を添加する)
<b>ステップE</b> ステップDからのTILを採取	<b>ステップE</b> ステップDからのTILを採取	<b>ステップE</b> ステップDからのTILを採取
<b>ステップF</b> 最終調査及び/ または輸液バッグに移す (任意に凍結保存)	<b>ステップF</b> 最終調査及び/ または輸液バッグに移す (任意に凍結保存)	<b>ステップF</b> 最終調査及び/ または輸液バッグに移す (任意に凍結保存)

【 図 1 D 】

修正されたGen2様プロセス：ステップA～E約22日間
<b>ステップA</b> 患者の腫瘍サンプルを得る (任意にステップBの前に凍結可能； 任意に腫瘍サンプルはコア/小生検であってよい)
<b>ステップB1</b> 初期培養 1容器あたり最大60個の断片、または最大10個のコア/ 小生検に物理的断片化し、IL-2を含む培地で3日間増殖させる
<b>ステップB2</b> 第1の増殖のプライミング IL-2、OKT-3及び抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地でTILを8日間増殖させる
<b>ステップC</b> 第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行 (11日目にステップBのTILを直接ステップDに進める)
<b>ステップD</b> 急速な第2の増殖 (体積が減少、IL-2、OKT-3及び50×抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地でTILを増殖；16日目にスケールアップし、追加のIL-2を添加する)
<b>ステップE</b> ステップDからのTILを採取
<b>ステップF</b> 最終調査及び/または輸液バッグに移す (任意に凍結保存)

10

20

【 図 1 E 】

第2世代プロセスGEN3 (A) : ステップA～E約14～18日間
<b>ステップA</b> 患者の腫瘍サンプルを得る (任意にステップBの前に凍結可能)
<b>ステップB</b> 第1の増殖のプライミング (1容器あたり最大60個の断片に物理的断片化し、約1日～7/8日間、 IL-2、及び抗原提示フィーダー細胞 (APC) の 培養物から得た培養上清を含む培地で増殖させる)
<b>ステップC</b> 第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行 (7/8日目にステップBのTILを直接ステップDに進める)
<b>ステップD</b> 急速な第2の増殖 (IL-2、OKT-3及び2×抗原提示フィーダー細胞を 含む増殖培地でTILを増殖；10～11日目にスケールアップし、 追加のIL-2を添加する)
<b>ステップE</b> ステップDからのTILを採取
<b>ステップF</b> 最終調査及び/または輸液バッグに移す (任意に凍結保存)

【 図 1 F 】

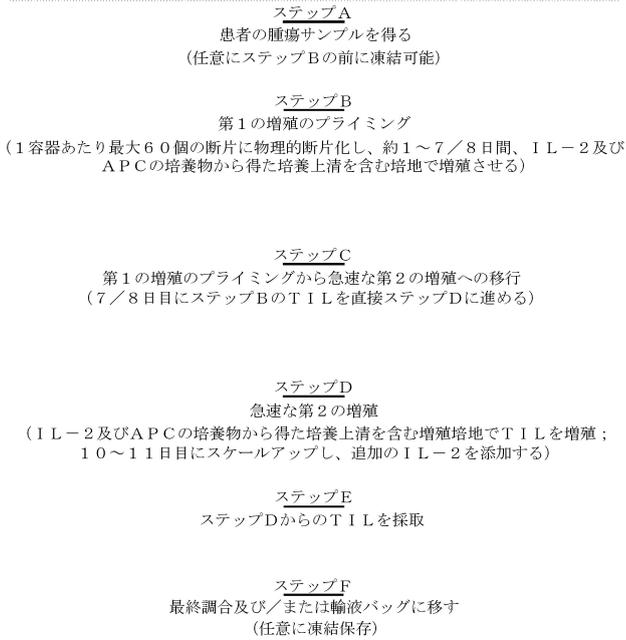
第2世代プロセスGEN3 (B) : ステップA～E約14～18日間
<b>ステップA</b> 患者の腫瘍サンプルを得る (任意にステップBの前に凍結可能)
<b>ステップB</b> 第1の増殖のプライミング (1容器あたり最大60個の断片に物理的断片化し、約1日～約7/8日間、IL-2、 OKT-3、及びAPCを含む培地で増殖させる)
<b>ステップC</b> 第1の増殖のプライミングから急速な第2の増殖への移行 (7/8日目にステップBのTILを直接ステップDに進める)
<b>ステップD</b> 急速な第2の増殖 (IL-2及びAPCの培養物から得た培養上清を含む増殖培地でTILを増殖； 10～11日目にスケールアップし、追加のIL-2を添加する)
<b>ステップE</b> ステップDからのTILを採取
<b>ステップF</b> 最終調査及び/または輸液バッグに移す (任意に凍結保存)

30

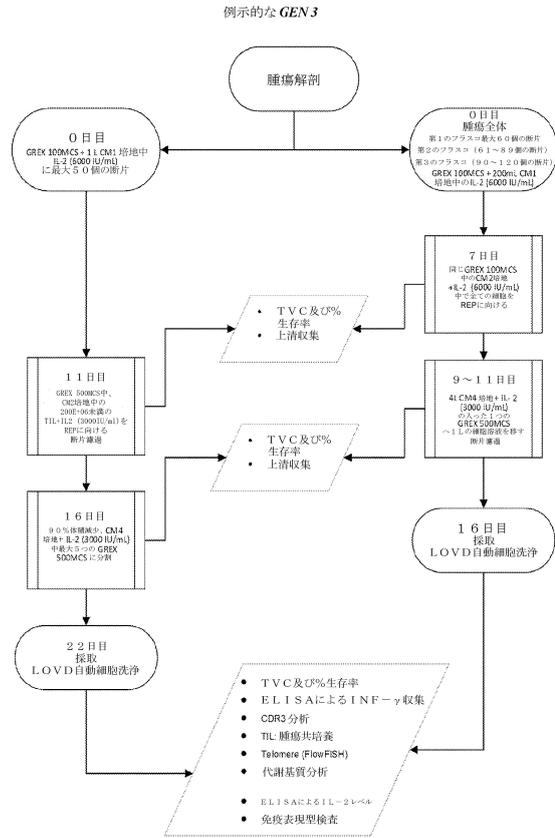
40

【 図 1 G 】

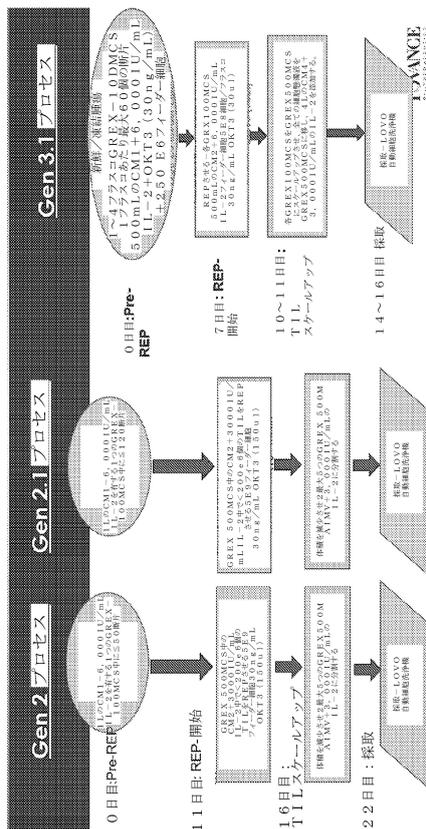
第2世代プロセスGEN3 (C) : ステップA~E 14~18日間



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0 最適化
Pre-REP-0日目	≤50個の断片 / 1G-Rex 1.00MCS - 11日間	≤180個の断片 / 3-G-Rex, 事前調合CM1加温培地 1.00MCS - 11日目	断片または凍結腫瘍 1G-Rex 培地中増殖 ≤30個, 最大60個の断片を有する完全培養物 1.00MCS (最大4G-Rex) 培地中増殖 + 追加された培地 7日間, Pre-REP (1~4フラスコ) 培地中増殖 + OKT3 - 3 (3.0 ng/ml)
REP開始	REPを始める-11日目 <200E6 TIL 1つのG-Rex 500MCS 中に事前調合CM2加温培地	REPを始める-11日目 <200E6 TIL 1つのG-Rex 500MCS 中に事前調合CM2加温培地	REPを始める, 7日目, 全ての細胞TIL, 同じG-Rex 100MCS (1.00MCS 最大4G-Rex), 標準培地または最適培地 (無血清), 補欠フィードバック
TIL増殖またはスケールアップ	1~5 G-Rex 500MCS 分注 16日目	2~5 G-Rex 500MCS 事前調合CM4加温培地 分注 16日目	G-Rex 100MCSからTIL懸濁液を G-Rex 500MCSに移す, 標準培地または最適培地 (無血清), 10日または11日目にスケールアップ
採取	採取 22日目 LOVD自動細胞洗浄機	採取 22日目 LOVD自動細胞洗浄機 (5洗浄サイクル)	14または16日目に採取 LOVD自動細胞洗浄機 (5洗浄サイクル)
最終調合	凍結保存液物 LN中300 IU/ml IL-2 + 9,000 IU/ml CM1 複数のアリコート	凍結保存液物 LN中300 IU/ml IL-2, CS10 複数のアリコート	凍結保存液物 LN中300 IU/ml IL-2, CS10 複数のアリコート
プロセス時間	22日間	22日間	16日間

10

20

30

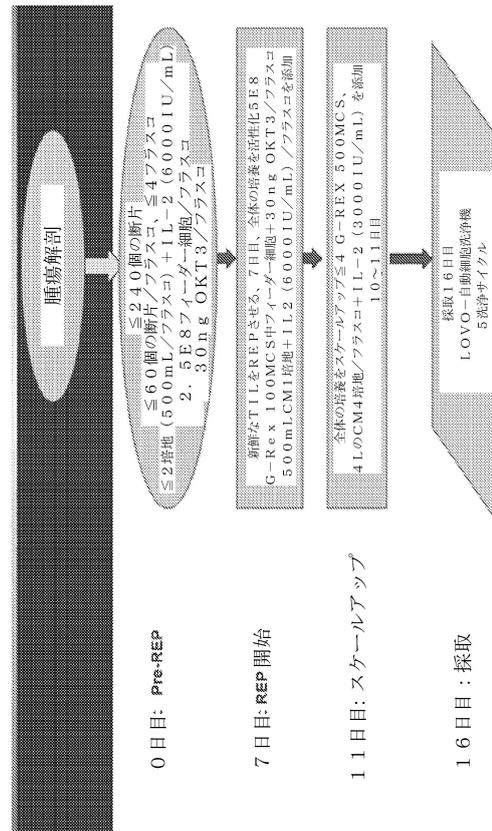
40

50

【 図 5 】

プロセス日	条件	Gen 3.1	500 mL
0 日目 pre REP 開始	培地 CM1 IL-2 (6000 IU/mL) OKT-3 (30ng/mL) フィーダー (250 E+06)		+
7 日目 REP 開始	培地 CM2 IL-2 (6000 IU/mL) OKT-3 (30ng/mL) 7 日目に追加される フィーダー 7 日目に追加される 日目の総フィーダー	Gen 3.1	500 mL +
9 ~ 11 日目 スケールアップ	Gen 3.1 G-REX10MCSからTIL 懸濁液を1つのG-REX500MCS (成水3つのG-REX500MCS)へ移す	Gen 3.1	Yes
16 日目 採取	LOVO-自動細胞洗浄機		Yes

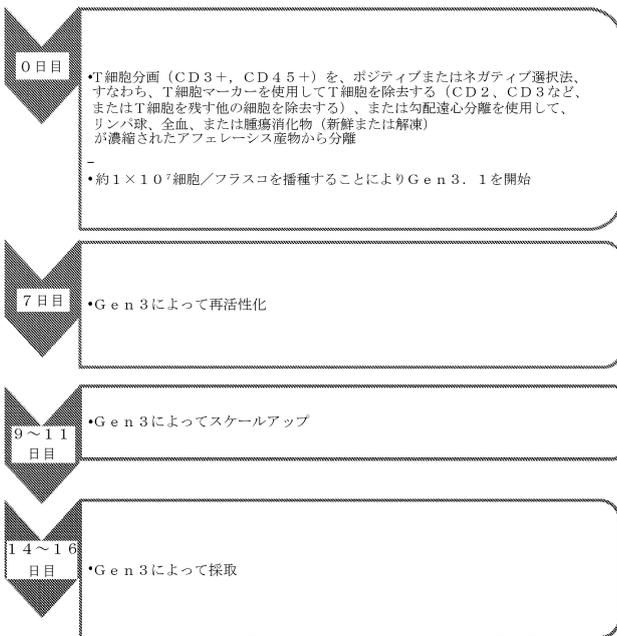
【 図 6 】



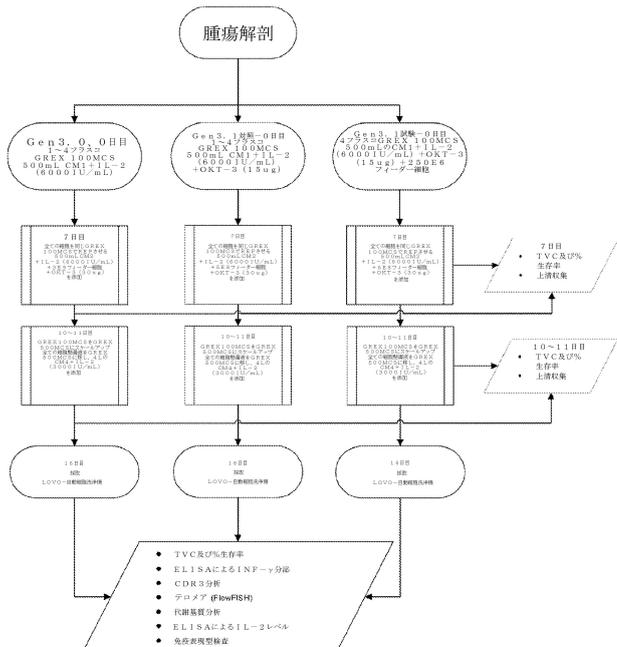
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】



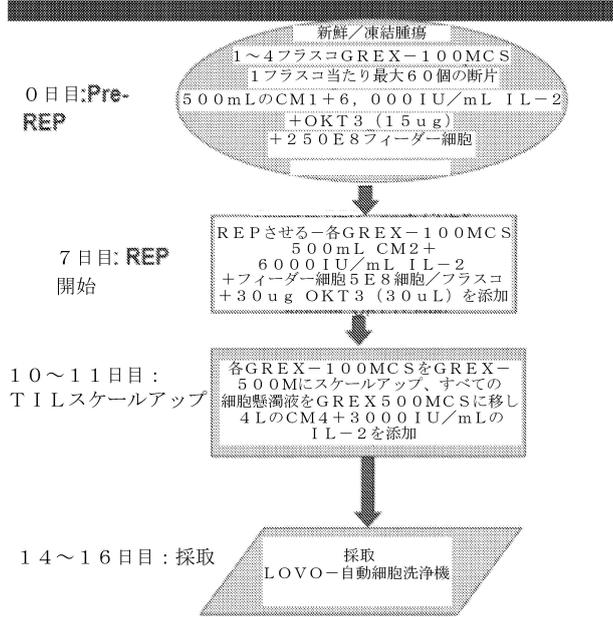
30

40

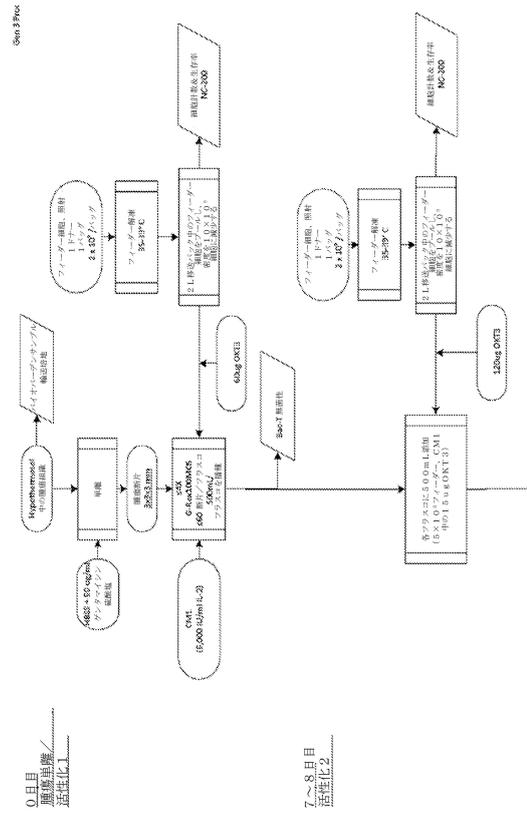
50



【 図 1 2 】



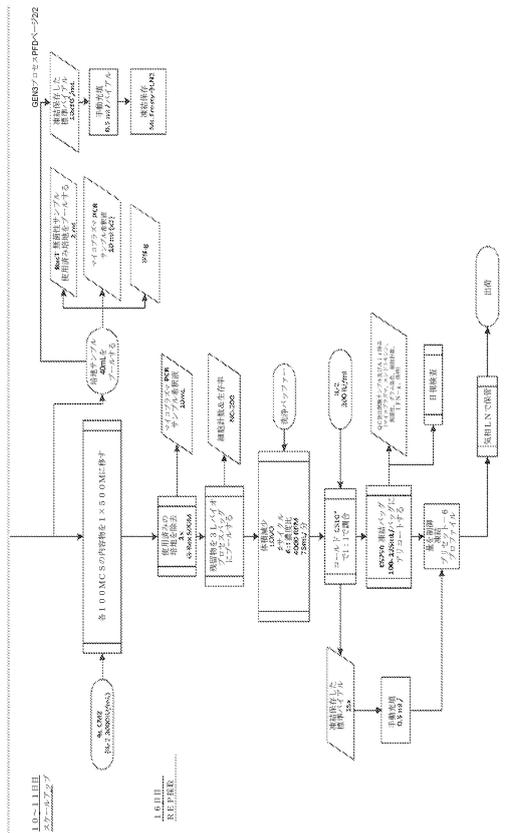
【 図 1 3 A 】



10

20

【 図 1 3 B 】



【 図 1 4 】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Pre-REP-0日目	<60個の断片/1G-Rex 100MCS-14日目	<180個の断片/3G-Rex 100MCS-14日目 事前調合CM1加温培地	新鮮または凍結腫瘍 <30個 G-Rex 500MCSに凍結保存された断片を混合し、100MCS (最大4G-Rex) 事前調合された加温培地-7日目、Pre-REP, フィーダー-250e6細胞+OKT-3 (15ug)
REP開始	REPさせる-11日目 <200e6 TIL 1G-Rex 500MCS	REPさせる-11日目 <200e6 TIL 500MCS 中に事前調合CM2加温培地	REPさせる、7日目、全ての腫瘍TILを同じG-Rex 500MCSに移植し、G-Rex 500MCSに移植した腫瘍は、事前調合された加温培地 (無血清) 移植フィーダー-500e6細胞+OKT3 (30ug/mL)
TIL増殖またはスケールアップ	1~5G-Rex 500MCS 分別16日目	2~5G-Rex 900MCS 事前調合CM4加温培地 分別16日目	G-REX 100MCSからTIL懸濁液をG-REX 500MCSに移す、標準培養または限定培地 (無血清)、10または11日にスケールアップ
採取	採取22日目 LOVO-自動細胞洗浄機	採取22日目 LOVO-自動細胞洗浄機 (5洗浄サイクル)	1.4または1.6日に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 (5洗浄サイクル)
最終調合	凍結保存産物 LN-中3000IU/mL LN-中3000IU/mL 濃度のアリコート	凍結保存産物 LN-中3000IU/mL LN-中3000IU/mL 濃度のアリコート	凍結保存産物 LN-中3000IU/mL LN-中3000IU/mL 濃度のアリコート
プロセス時間	22日間	22日間	1.6日間

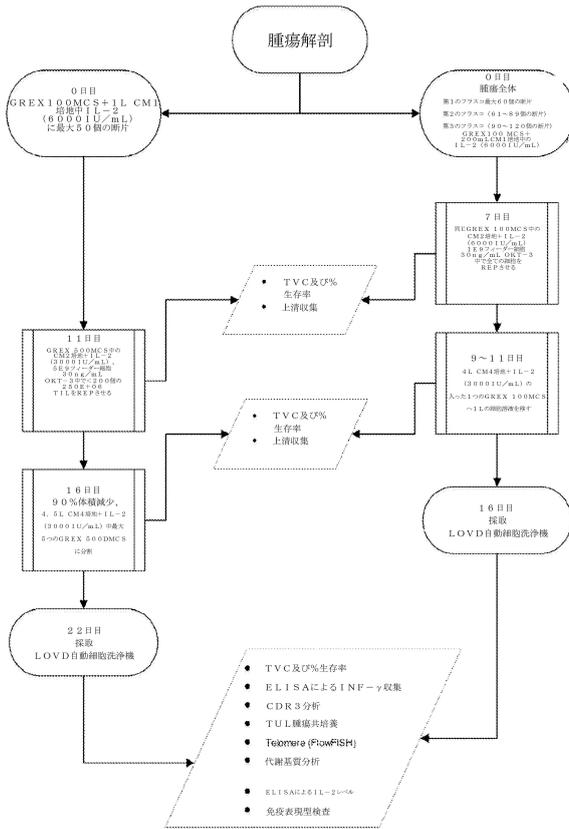
30

40

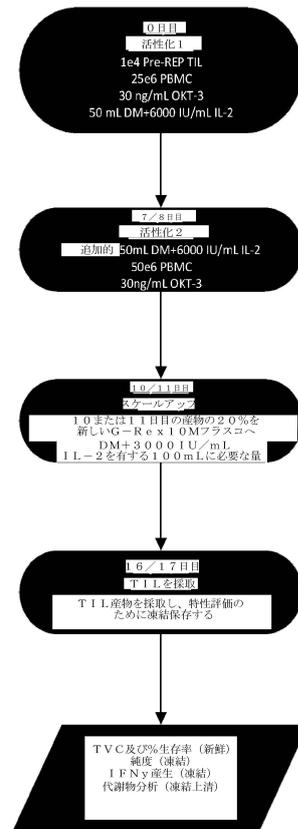
50



【 図 19 】



【 図 20 】



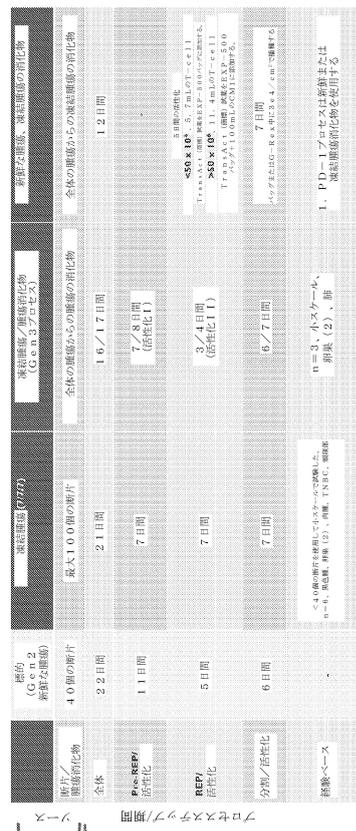
10

20

【 図 21 】

プロセス日	Gen 3.0 現在のプロセス	Gen 3.0+ 0日目の フィーダースープ	Gen 3.0+ 7/8日目の フィーダースープ	Gen 3.0+ 0日目及び7/8 日目のフィー ダースープ	フィーダースープ#1	フィーダースープ#2
1-3日	無	無	無	無	500×6フィーダースープ+ IL-2 (6000 IU/mL) + OLT-3 30 ng/mL + G-CSF 1000 フラスコ中の 1 L 総量の培養で培養する	無
0日目	4断片 IL-2 (6e3 IU/mL) 50 mL DM1 培地 GreX10M 25e6 フィーダ ースープ OKT-3 (30ng/mL)	4断片 IL-2 (6e3 IU/mL) 25 mL DM1 培地 GreX10M +25 mL of フィーダ ースープ フィーダ ースープ#1 (1-3日目) からのみ	4断片 IL-2 (6e3 IU/mL) 50 mL DM1 培地 GreX10M 25e6 フィーダ ースープ フィーダ ースープ#1 (1-3日目) からのみ	4断片 IL-2 (6e3 IU/mL) 50 mL DM1 培地 GreX10M +25 mL フィーダ ースープ フィーダ ースープ#2 (1-3日目) からのみ	スープを収集し、所定の量A およびBを添加する。 追加の試験用 (次のセクション) にスープを収集する。	無
4日目	無	無	無	無	追加の試験用 (次のセクション) にスープを収集する。	1e7フィーダースープ#1 培地+ IL-2 (6000 IU/mL) + OKT-3 30 ng/mL + GREX10 M フラスコ中の TIL 総量の培養で培養する
7/8日	50 mL DM1 培地 +IL-2 (6e3 IU/mL) +50 e6フィーダ ースープ OKT-3 (30 ng/mL) を添加する	50 mL DM1 培地 +IL-2 (6e3 IU/mL) +50 e6フィーダ ースープ OKT-3 (30 ng/mL) を添加する	25 mL DM1 培地 +IL-2 (6e3 IU/mL) +25 mL of フィーダースープ フィーダースープ#1 (1-3日目) からのみ を添加する	25 mL DM1 培地+ IL-2 (6e3 IU/mL) +25 mL of フィーダースープ フィーダースープ#2 (1-3日目) からのみ を添加する	追加の試験用 (次のセクション) にスープを収集する。	スープを収集し、 所定の量AおよびB を添加する。 追加の試験用 (次のセクション) にスープを収集する。
10/11日	細胞培養物の20% 及びDM+3000 IU/mL IL-2を 含有する100 mL にGreX10M プラスコへ移す	細胞培養物の20% 及びDM+3000 IU/mL IL-2を 含有する100 mL にGreX10M プラスコへ移す	細胞培養物の20% 及びDM+3000 IU/mL IL-2を 含有する100 mL にGreX10M プラスコへ移す	細胞培養物の20%及び DM+3000 IU/mL IL-2を 含有する100 mLに GreX10Mプラスコへ移す	追加の試験用 (次のセクション) にスープを収集する。	追加の試験用にスープを 収集する。
18/17日	採取 (TVC及び% 生存率)	採取 (TVC及び% 生存率)	採取 (TVC及び% 生存率)	採取 (TVC及び% 生存率)	無	追加の試験用にスープを 収集する。

【 図 22 】

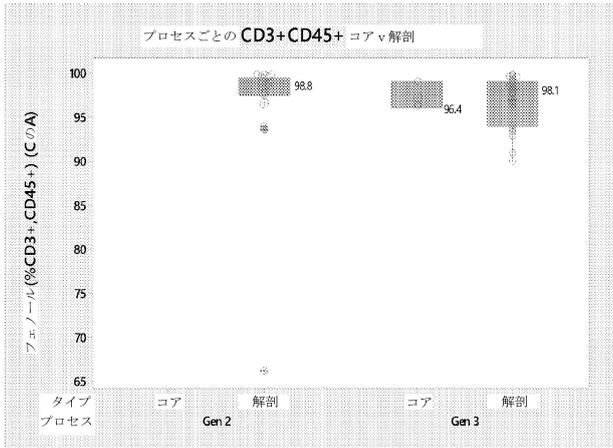


30

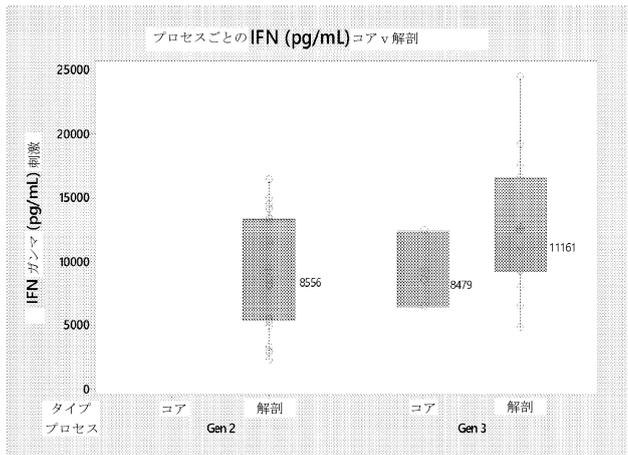
40

50

【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



10

【 図 2 5 】

Gen 2 評価	Gen 2 腫瘍プロセス			Gen 3 プロセス		
	PT21010	PT21011	P7055	P7058	P7058	PT21009
コア数	8	2	3	5	5	3
採取したTVC (11日目)	31,466	510,466	47,366	52,466	NA	NA
接種したTVC	31,466	200,466	47,366	52,466	NA	NA
採取したTVC (フル-LOVO)	27,169	N/A	18,469	30,569	12,869	21,269
採取したTVC (フル-LOVO)	5,297	50,722	28,897	21,900	10,600	10,000
LOVO 回収%	94.1	N/A	91.3	102	85.2	96.7
倍加した細胞数	9.3	6.6	7.8	9.2	-	-
REP 生存率%	94.0%	96.9%	93.3%	93.4%	71.3%	88.0%
CD45+CD3+	> 90%	99.7%	99.4%	99.8%	97.4%	99.8%
IFN $\gamma$ (pg/mL)	11,290	4,938	6,640	5,977	9,003	12,332
IFN $\gamma$ (pg/mL) (複製された)	N/A	2,088	10,519	30,958	41,967	14,125
CD4+CD107A% (複製された)	N/A	6.8%	69.9%	39.9%	34.7%	42.0%
CD8+CD107A% (複製された)	N/A	42.4%	83.9%	42.0%	75.9%	60.9%

【 図 2 6 】

Gen 2 腫瘍プロセス	Gen 2 腫瘍プロセス			Gen 3 プロセス		
	PT21010	PT21011	P7055	P7058	P7058	PT21009
NK細胞 (CD3+CD56+CD16+) (%)	0.2	1.0	0.1	0.2	2.9	0.3
巨細胞 (CD3+CD119+) (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
HLA (CD14+) (%)	1.3	0.8	0.9	1.2	0.4	0.4
TCR $\alpha\beta$ (%)	91.9	92.7	90.9	95.1	90	93.4
TCR $\alpha\beta$ (%)	1.8	1.3	2.2	1.5	0.8	0.3
TCR $\alpha\beta$ +CD4+ (%)	0.9	7.9	92.2	89.2	70.6	81.4
TCR $\alpha\beta$ +CD8+ (%)	77.5	20.1	6.3	10.3	19.7	16.5
NAIVE-CCR7+CD45RA+ (%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TEMH-CCR7+CD45RA+ (%)	99.8	98.8	98.4	96.8	96.6	97.3
TCM-CCR7+CD45RA+ (%)	0.2	0.1	1.5	0.1	1.2	2.1
TEFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+ (%)	0.0	0.2	0.0	0.0	2.0	0.6

20

30

40

50

【 図 2 7 】

特性評価 (注) CD137+ に限定)	Gen.2 群 / プロセス				Gen.3 / プロセス				
	PT21010	PT21011	P7055	P7058	PT21010	PT21011	P7055	P7058	
黒色腫小分子の抗原的負 (n=6 からの範囲)									
CD27+ (%)	1.4	1.1	0.5	0.8	5.2	2.3	0.5		
CD28+ (%)	90.9	91.4	96.0	93.9	82.7	84.6	93.7		
CD56+ (%)	3.2	2.9	6.1	5.1	12.6	10.2	1.9		
CD57+ (%)	17.7	65.1	31.2	20.7	2.9	3.9	14.8		
BTLA+ (%)	99.4	99.5	99.2	99.6	92.1	97.1	99.2		
CD25+ (%)	4.0	6.0	19.1	2.9	71.4	46.7	11.6		
CD69+ (%)	29.7	36.0	33.7	40.7	40.4	34.3	22.3		

【 図 2 8 A 】

CD4+	Gen.2 群 / プロセス				Gen.3 / プロセス				
	PT21010	PT21011	P7055	P7058	PT21010	PT21011	P7055	P7058	
CD27+ (%)	25.2	1.9	2.2	2.0	33.7	14.6	2.6		
CD28+ (%)	97.3	95.4	96.7	95.0	88.0	88.7	95.4		
CD57+ (%)	4.7	64.0	30.1	21.9	2.1	3.6	15.1		
KLRG1+ (%)	3.4	31.0	5.6	7.0	4.4	3.6	3.2		
2B4+ (%)	5.1	1.5	10.5	1.3	2.3	1.4	1.3		
BTLA+ (%)	98.3	99.3	99.1	99.4	89.6	96.2	99.1		
CD25+ (%)	7.8	5.2	17.7	2.3	73.6	43.6	9.7		
CD69+ (%)	27.9	37.8	35.5	42.7	40.1	34.9	24.5		
CD95+ (%)	99.6	99.4	99.7	99.1	99.5	98.8	99.7		
LAG3+ (%)	0.3	0.1	1.2	0.1	3.1	1.0	0.8		
PDI+ (%)	1.2	10.6	2.2	4.1	7.9	5.3	6.1		
TIGIT+ (%)	3.1	8.2	22.4	6.1	23.6	11.3	8.1		
TIM3+ (%)	76.8	68.5	73.5	81.8	93.2	92.7	88.8		

10

20

【 図 2 8 B 】

CD8+	Gen.2 群 / プロセス				Gen.3 / プロセス				
	PT21010	PT21011	P7055	P7058	PT21010	PT21011	P7055	P7058	
CD27+ (%)	4.9	10.1	3.5	6.4	3.6	7.4	6.2		
CD28+ (%)	96.6	94.4	98.0	97.1	86.5	90.6	92.0		
CD57+ (%)	14.1	61.2	14.1	6.0	5.0	3.2	3.5		
KLRG1+ (%)	10.0	48.4	13.2	10.4	8.7	5.4	8.0		
2B4+ (%)	3.0	1.8	12.5	2.1	2.9	0.5	0.2		
BTLA+ (%)	99.6	99.7	99.8	99.4	97.8	98.4	99.0		
CD25+ (%)	2.0	3.0	13.0	2.4	48.4	39.8	15.8		
CD69+ (%)	41.2	45.5	53.1	65.1	63.7	57.0	38.3		
CD95+ (%)	92.9	94.3	91.0	93.0	93.4	89.1	91.3		
LAG3+ (%)	3.1	0.4	2.6	1.8	5.2	4.2	8.4		
PDI+ (%)	0.1	2.0	0.3	7.5	9.1	1.6	2.1		
TIGIT+ (%)	51.7	85.8	96.8	91.5	94.3	94.0	87.7		
TIM3+ (%)	98.2	95.4	97.2	96.9	99.1	99.2	98.2		

30

40

50

【配列表】

2023523855000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/030623

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12N5/0783 A61K35/17 A61P35/00 C12Q1/6886 G01N33/566 C12Q1/68 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N A61K A61P C12Q G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/081473 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 3 May 2018 (2018-05-03) cited in the application	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309
Y	claims 1-5	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309
	-----	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 August 2021		Date of mailing of the international search report 13/10/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Paresce, Donata

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

5

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/030623

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/081789 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 3 May 2018 (2018-05-03)	154, 156-161, 171, 173-218, 279-281, 283-309
Y	claims 1-47	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309
X	----- WO 2018/081784 A1 (H LEE MOFFITT CANCER CT & RES [US]) 3 May 2018 (2018-05-03)	154, 156-161, 171, 173-218, 279-281, 283-309
Y	claim 1	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309
X	----- WO 2019/210131 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) cited in the application	154, 156-161, 171, 173-218, 279-281, 283-309
Y	page 1; claim 1	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309
	----- -/--	

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2021/030623

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/100023 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 23 May 2019 (2019-05-23)	154, 156-161, 171, 173-218, 279-281, 283-309
Y	claim 1	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309
X,P	----- WO 2020/131547 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 25 June 2020 (2020-06-25)  the whole document -----	1-25, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309

10

20

30

40

5

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2021/030623

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
- 2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2021/030623

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

1-25(completely); 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281  
283-309(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

10

- 1. claims: 1-25(completely); 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309(partially)

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(a) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor resected from a subject by processing a tumor sample obtained from the subject into multiple tumor fragments;(b) performing a priming first expansion by culturing the first population of TILs in a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and optionally comprising either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3, to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed for a first period of about 1 to 7 or 1 to 8 days to obtain the second population of TILs, wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(c) performing a rapid second expansion by contacting the second population of TILs with a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and either APCs and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed for a second period of about 1 to 11 days to obtain the third population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs; and(d) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (c).

---

20

- 2. claims: 26(completely); 32-49, 91-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309(partially)

30

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(a) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor resected from a subject by processing a tumor sample obtained from the subject into multiple tumor fragments;(b) performing a priming first expansion by culturing the first population of TILs in a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and optionally either antigen-presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3 to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed in a container comprising a first gas-permeable surface area, wherein the priming first expansion is performed for first period of about 1 to 7 to 1 to 8 days to obtain the second population of TILs, wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(c) performing a rapid second expansion by supplementing the cell culture medium of the second population of TILs with additional IL-2, optionally OKT-3, and either APCs and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the number of APCs added in the rapid second expansion is at least twice the number of APCs added in step (b), wherein the rapid second expansion is performed for a second period of about 1 to 11 days to obtain the third population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed in a container comprising a second gas-permeable surface area;(d) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (c); and(e) transferring the harvested TIL population from step (d) to an infusion bag.

10

---

3. claims: 27, 28(completely); 32-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309(partially)

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(a) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor resected from a subject by processing a tumor sample obtained from the subject into multiple tumor fragments;(b) performing a priming first expansion by culturing the first population of TILs in a first TIL cell culture comprising a first cell culture medium, IL-2, and either:i) a first culture supernatant obtained from a first culture of antigen-presenting feeder cells (APCs), wherein the first culture supernatant comprises OKT-3, orii) APCs and OKT-3, wherein the priming first expansion is performed by culturing the first TIL cell culture in a first container comprising a first gas-permeable surface area for a first period of about 1 to 7 or 1 to 8 days to obtain a second population of TILs, and wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(c) performing a rapid second expansion by supplementing the first TIL cell culture with additional first cell culture medium, IL-2, and either:i) a second culture supernatant obtained from a second culture of APCs, wherein the second culture supernatant comprises OKT-3, orii) APCs and OKT-3; to form a second TIL cell culture, wherein the rapid second expansion is performed by culturing the second TIL cell culture for a second period of about 1 to 11 days to obtain a third population of TILs, and wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs; wherein the first TIL cell culture does not comprise both the first culture supernatant and APCs; wherein the second TIL cell culture does not comprise both the second culture supernatant and supplemental APCs; and wherein either the first TIL cell culture does not comprise APCs and/or the second TIL cell culture does not comprise supplemental APCs;(d) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (c); and(e) transferring the harvested TIL population from step (d) to an infusion bag.

20

30

40

---

4. claims: 29(completely); 32-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270,

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

277-281, 283-309(partially)

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(a) performing a priming first expansion by culturing a first population of TILs, said first population of TILs obtainable by processing a tumor sample from a tumor resected from a subject into multiple tumor fragments, in a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and optionally either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3 to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed in a container comprising a first gas-permeable surface area, wherein the priming first expansion is performed for first period of about 1 to 7/8 days to obtain the second population of TILs, wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(b) performing a rapid second expansion by contacting the second population of TILs to a cell culture medium of the second population of TILs with additional IL-2, optionally OKT-3, and either APCs and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the number of APCs in the rapid second expansion is at least twice the number of APCs in step (a), wherein the rapid second expansion is performed for a second period of about 1 to 11 days to obtain the third population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed in a container comprising a second gas-permeable surface area; and(c) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (b).

10

20

30

5. claims: 30, 31(completely); 32-127, 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309(partially)

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(a) performing a priming first expansion by culturing a first population of TILs in a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and optionally comprising either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3, to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed for a first period of about 1 to 7 or 1 to 8 days to obtain the second population of TILs, wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(b) performing a rapid second expansion by contacting the second population of TILs with a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and either APCs and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed for a second period of about 1 to 11 days to obtain the third

40

50

International Application No. PCT/ US2021/ 030623

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs; and(c) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (b).

10

---

6. claims: 128-153(completely); 154, 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309(partially)

A method for treating a subject with cancer, the method comprising administering expanded tumor infiltrating lymphocytes (TILs) comprising:(a) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor resected from a subject by processing a tumor sample obtained from the subject into multiple tumor fragments;(b) performing a priming first expansion by culturing the first population of TILs in a cell culture medium comprising IL-2, optionally OKT-3, and optionally either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3 to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed in a container comprising a first gas-permeable surface area, wherein the priming first expansion is performed for about 1 to 7 or 1 to 8 days to obtain the second population of TILs;(c) performing a rapid second expansion by supplementing the cell culture medium of the second population of TILs with additional IL-2, OKT-3, and either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the number of APCs added to the rapid second expansion is at least twice the number of APCs added in step (b), wherein the rapid second expansion is performed for about 1 to 11 days to obtain the third population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed in a container comprising a second gas-permeable surface area;(d) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (c);(e) transferring the harvested TIL population from step (d) to an infusion bag; and(f) administering a therapeutically effective dosage of the TILs from step (e) to the subj ect.

20

30

---

7. claims: 155, 162-170, 172(completely); 156-161, 171, 173-218, 270, 277-281, 283-309(partially)

A therapeutic population of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) prepared from tumor tissue of a patient, wherein the therapeutic population of TILs provides for increased efficacy, increased interferon-gamma production, and/or increased polyclonality.

40

---

8. claims: 219-269(completely); 270, 277-281, 283-309(partially)

A method of expanding T cells comprising:(a) performing a

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

priming first expansion of a first population of T cells obtained from a donor by culturing the first population of T cells to effect growth and to prime an activation of the first population of T cells;(b) after the activation of the first population of T cells primed in step (a) begins to decay, performing a rapid second expansion of the first population of T cells by culturing the first population of T cells to effect growth and to boost the activation of the first population of T cells to obtain a second population of T cells; and(c) harvesting the second population of T cells.

10

---

9. claims: 271(completely); 273-275, 277-281, 283-309(partially)

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(i) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor sample obtained from one or more small biopsies, core biopsies, or needle biopsies of a tumor in a subject by culturing the tumor sample in a first cell culture medium comprising IL-2 for about 3 days;(ii) performing a priming first expansion by culturing the first population of TILs in a second cell culture medium comprising IL-2, OKT-3, and either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3 to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed in a container comprising a first gas-permeable surface area, wherein the priming first expansion is performed for first period of about 7 or 8 days to obtain the second population of TILs, wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(iii) performing a rapid second expansion by supplementing the second cell culture medium of the second population of TILs with additional IL-2, OKT-3, and either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the number of APCs added in the rapid second expansion is at least twice the number of APCs added in step (ii), wherein the rapid second expansion is performed for a second period of about 11 days to obtain the third population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed in a container comprising a second gas-permeable surface area;(iv) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (iii); and(v) transferring the harvested TIL population from step (iv) to an infusion bag.

20

30

40

---

10. claims: 272(completely); 273-275, 277-309(partially)

A method for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs comprising:(i) obtaining and/or receiving a first population of TILs from a tumor sample obtained from one or more small biopsies, core

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

biopsies, or needle biopsies of a tumor in a subject by culturing the tumor sample in a first cell culture medium comprising IL-2 for about 3 days;(ii) performing a priming first expansion by culturing the first population of TILs in a second cell culture medium comprising IL-2, OKT-3, and either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a first culture of APCs comprising OKT-3 to produce a second population of TILs, wherein the priming first expansion is performed for first period of about 7 or 8 days to obtain the second population of TILs, wherein the second population of TILs is greater in number than the first population of TILs;(iii) performing a rapid second expansion by contacting the second population of TILs with a third cell culture medium comprising IL-2, OKT-3, and either antigen presenting cells (APCs) and/or culture supernatant from a second culture of APCs comprising OKT-3, to produce a third population of TILs, wherein the rapid second expansion is performed for a second period of about 11 days to obtain the third population of TILs, wherein the third population of TILs is a therapeutic population of TILs; and(iv) harvesting the therapeutic population of TILs obtained from step (iii).

10

20

---

11. claims: 276(completely); 277-309(partially)

A method of expanding T cells comprising:(i) performing a priming first expansion of a first population of T cells from a tumor sample obtained from one or more small biopsies, core biopsies, or needle biopsies of a tumor in a donor by culturing the first population of T cells to effect growth and to prime an activation of the first population of T cells;(ii) after the activation of the first population of T cells primed in step (a) begins to decay, performing a rapid second expansion of the first population of T cells by culturing the first population of T cells to effect growth and to boost the activation of the first population of T cells to obtain a second population of T cells; and(iv) harvesting the second population of T cells.

30

---

12. claims: 310-426

Methods for expanding tumor infiltrating lymphocytes (TILs) into a therapeutic population of TILs, tumor infiltrating lymphocyte (TIL) compositions and methods of treating a subject with cancer with a therapeutic population of TILs.

40

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/030623

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2018081473 A1	03-05-2018	AU 2017347851 A1	02-05-2019		
		BR 112019008305 A2	06-08-2019		
		CA 3041678 A1	03-05-2018		
		CN 110099998 A	06-08-2019		
		EP 3532607 A1	04-09-2019		
		JP 2019532652 A	14-11-2019		
		KR 20190066073 A	12-06-2019		
		MA 46669 A	04-09-2019		
		SG 112019033310 A	30-05-2019		
		US 11058728 B1	13-07-2021		
		US 2018228841 A1	16-08-2018		
		US 2020299644 A1	24-09-2020		
		US 2021252062 A1	19-08-2021		
		US 2021252063 A1	19-08-2021		
		US 2021260121 A1	26-08-2021		
WO 2018081473 A1	03-05-2018				
WO 2018081789 A1	03-05-2018	AU 2017347942 A1	30-05-2019		
		BR 112019008560 A2	17-09-2019		
		CA 3041673 A1	03-05-2018		
		CN 110312790 A	08-10-2019		
		EP 3532608 A1	04-09-2019		
		JP 2019531744 A	07-11-2019		
		KR 20190071802 A	24-06-2019		
		MA 46668 A	04-09-2019		
		SG 112019038255 A	30-05-2019		
		TW 201831690 A	01-09-2018		
		US 2018127715 A1	10-05-2018		
		US 2019345445 A1	14-11-2019		
		WO 2018081789 A1	03-05-2018		
		WO 2018081784 A1	03-05-2018	EP 3532078 A1	04-09-2019
				US 2019262400 A1	29-08-2019
WO 2018081784 A1	03-05-2018				
WO 2019210131 A1	31-10-2019	AU 2019257749 A1	22-10-2020		
		BR 112020021660 A2	02-02-2021		
		CA 3098303 A1	31-10-2019		
		CN 112368003 A	12-02-2021		
		EP 3784254 A1	03-03-2021		
		JP 2021521846 A	30-08-2021		
		KR 20210005138 A	13-01-2021		
		MA 52533 A	03-03-2021		
		SG 11202010319R A	27-11-2020		
		TW 202014195 A	16-04-2020		
		US 2021130779 A1	06-05-2021		
		WO 2019210131 A1	31-10-2019		
		WO 2019100023 A1	23-05-2019	AU 2018368786 A1	18-06-2020
BR 112020009663 A2	10-11-2020				
CA 3082484 A1	23-05-2019				
CN 111601883 A	28-08-2020				
CR 20200251 A	17-07-2020				
EP 3710576 A1	23-09-2020				
JP 2021503281 A	12-02-2021				
KR 20200100060 A	25-08-2020				
PH 12020550642 A1	22-03-2021				
SG 11202004457X A	29-06-2020				

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2021/030623

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		TW 201932594 A	16-08-2019
		US 2020277573 A1	03-09-2020
		US 2021309968 A1	07-10-2021
		WO 2019100023 A1	23-05-2019
-----			
WO 2020131547 A1	25-06-2020	CA 3123392 A1	25-06-2020
		EP 3898949 A1	27-10-2021
		WO 2020131547 A1	25-06-2020
-----			

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 31/675(2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 31/7076(2006.01)	A 6 1 K 31/7076	
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	

(32)優先日 令和3年2月5日(2021.2.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/162,441

(32)優先日 令和3年3月17日(2021.3.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TZ,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. ジップロック

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 4 0 7 0 ，サン カルロス ，スカイウェイ ロード 9 9 9 ，スイート 1 5 0 ，アイオバンス バイオセラピューティクス ，インコーポレイテッド内

(72)発明者 モレーノ ，マリッツァ ，リーンラフ

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 4 0 7 0 ，サン カルロス ，スカイウェイ ロード 9 9 9 ，スイート 1 5 0 ，アイオバンス バイオセラピューティクス ，インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 4B065 AA90X BB19 BB32 BB40 BD09 CA44  
4C084 AA02 BA44 DA14 MA02 NA05 ZA011 ZA012 ZA591 ZA592 ZA661  
ZA662 ZA811 ZA812 ZA891 ZA892 ZB261 ZB262 ZC75  
4C086 AA01 DA38 EA18 MA02 MA03 MA04 NA05 ZA01 ZA59 ZA66  
ZA81 ZA89 ZB26 ZC75  
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 MA02 MA65 NA05 NA14 ZA01  
ZA59 ZA66 ZA81 ZA89 ZB26 ZC75  
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA20